

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINTENDENCIA

COMERCIO



No. 13-299760- -00000-0000

Fecha: 2013-12-24 14:02:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCREACI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 221

222

EXPEDIENTE-----

TITULO: ANTICUERPOS

SOLICITANTE OXFORD BIOTHETAPEUTICS LKTD

DOMICILIO REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA

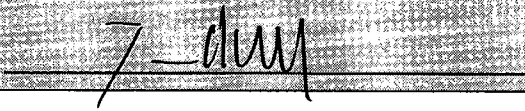
APODERADO JUAN CARLOS URIBE RESTREPO

FECHA DICIEMBRE 24-2013

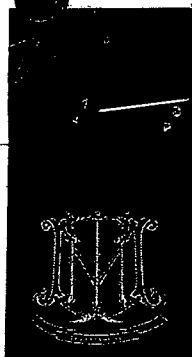
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-299760- -00000-0000 Fecha: 2013-12-24 14:02:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCREACI Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 221 e radicación
---	---

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/ US2012/044703	Fecha 28/06/2012
Publicación Internacional No.		WO 2013/003625 A2	Fecha 03/01/2013
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
ANTICUERPOS			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
C07K 16/28 (2006.01)			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN 94A MILTON PARK, ABINGDON, OXON OX14 4RY (GB)		No. TELÉFONO	
CIUDAD ABINGDON		CORREO ELECTRÓNICO	
DEPARTAMENTO/ESTADO OXON		NACIONALIDAD O	
PAÍS DE RESIDENCIA REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE		LUGAR DE CONSTITUCIÓN REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE	
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. ROHLFF		CHRISTIAN	REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA
2. TERRETT		JONATHAN, ALEXANDER	REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA
3.			
4.			
5.			
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA	OXON	ABINGDON	94A MILTON PARK, ABINGDON, OXON OX14 4RY (GB)
2. ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	CALIFORNIA	SAN JOSE	5941 OPTICAL COURT, SAN JOSE, CA 95138 (US)
3.			
4.			
5.			
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
URIBE RESTREPO		JUAN CARLOS	C.C. 79.159.313 T.P. 54.493
DIRECCIÓN CALLE 93B No. 12-48, Piso 4o. BOGOTÁ, D.C., COLOMBIA		No. TELÉFONO 6019660	
CIUDAD BOGOTÁ. D.C. COLOMBIA		CORREO ELECTRÓNICO tum@tumnet.com	
PAÍS COLOMBIA		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		USA	61/502,167	28/06/2011
2. ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		USA	PCT/US2012/044451	27/06/2012
3.				
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐				
Universidades públicas o privadas ☐				
Entidades sin ánimo de lucro ☐				
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☒ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.				
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N°	Fecha	
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)				
				
17	ANEXOS			
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica		
1. ☒ Descripción N° de folios:		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.		
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 31		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del invento al solicitante o a su causante.		
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios:		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas		
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas		
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.		
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.		
		Universidades públicas o privadas		
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación		
		Entidades sin ánimo de lucro		
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.		
		☐ Hoja de información complementaria.		
		☐ Otros, especificar		
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.		
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.		

- | | |
|--|---|
| | <p>16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.</p> <p>17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.</p> |
|--|---|



TRIANA, URIBE & MICHELSEN

REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

Christian ROHLFF

in representation of

Oxford Biotherapeutics Ltd.

domiciled in

94a Milton Park

Abingdon,

Oxon

OX14 4RY

GB

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint **FERNANDO TRIANA**, tpa. No. 45.265 c.c. No. 79.154.036; **LAURA MICHELSEN**, tpa. No. 67.897 c.c. No. 39.783.287; **JUAN CARLOS URIBE**, tpa. No. 54.493 c.c. No. 79.159.313 and **JUAN PABLO TRIANA**, tpa. 63.077 c.c. No. 79.487.222; domiciled at Calle 93 B No. 12-48 P. 4, Bogotá, D.C., Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property and intellectual matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second or third alternate representative is to replace the first or second one, or when the second or third is to replace the principal one. In such cases, the principal representative, shall state his intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia,

REPRESENTACIÓN Y PODER

Yo (nosotros), abajo suscrito(s)

CHRISTIAN ROHLFF

en representación de

OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD

domiciado(s) en

94A MILTON PARK

ABINGDON, OXON, OX14 4RY

GRAN BRETAÑA

por el presente nombro (nombramos) a **FERNANDO TRIANA**, tpa. No. 45.265 c.c. No. 79.154.036; **LAURA MICHELSEN**, tpa. No. 67.897 c.c. No. 39.783.287; **JUAN CARLOS URIBE**, tpa. No. 54.493 c.c. No. 79.159.313 y **JUAN PABLO TRIANA**, tpa. 63.077 c.c. No. 79.487.222; domiciliados en la Calle 93 B No. 12-48 P. 4, Bogotá, D.C., Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1ro. del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquel. La misma regla se aplicará cuando el segundo y tercer representantes suplentes hayan de reemplazar al primero, al segundo o al principal. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, o tercer suplente en su caso, o todos ellos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia,



TRIANA, URIBE & MICHELSEN

or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in cases of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second or third alternate in their turn cases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second or third alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first or second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, I (we) grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) intellectual property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before national and/or international arbitration tribunals in all matters concerning the following:

- a) Obtainment of patents, layout-designs of integrated circuits, utility models and industrial designs; the registration of marks and trade slogans; the deposit of commercial names and trade emblems; the obtainment of the declaration and authorization of denominations of origin; renewal, payment of the annuity fees, assignment, license, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of commercialization agreements and licenses of use of the above rights; b) Protection of trade secrets; c) Obtainment of plant variety protection; d) Obtainment of functioning licenses, health registrations and sale licenses and any other petition before the sanitary or administrative authorities; e) Protection to the consumers and actions against restrictive commercial practices and competence promotion;

o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo o tercer suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero o segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad intelectual y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo(amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento nacionales y/o internacionales en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, de los esquemas de trazado de circuitos integrados, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas y de lemas comerciales; el depósito de nombres comerciales y enseñanzas; la obtención de la declaración y de la autorización de denominaciones de origen; su renovación, pago de anualidades de mantenimiento, traspaso, licencia, cambio de nombre o domicilio; cancelación voluntaria; y el registro de acuerdos de comercialización y de licencias de uso de esos derechos; b) Protección de secretos empresariales c) Obtención de la protección para variedades vegetales; d) Obtención y tramitación de todo lo relacionado con licencias de funcionamiento, registros sanitarios, licencias de venta y cualquier otra petición ante las autoridades sanitarias o administrativas; e) Protección del consumidor y



TRIANA, URIBE & MICHELSEN

f) Obtainment of copyright registrations for any type of artistic, literary, scientific, musical, video, films, video games, choreography works, software or any other production in the artistic, scientific or literary fields capable of being reproduced or expressed by any means known now or in the future; Registration of agreements related with the execution or transfer of intellectual property rights; Obtention of reduced postal tariff; g) Registration of domain names; their renewal, assignment, change of name, change of domicile, cancellation and any other acts related with their management. h) Actions of repossession, of opposition, cancellation, nullity, infringement of rights, custom procedures, writ of mandamus, unfair competition, granting of licenses; and in general the civil, constitutional, criminal and administrative suits relating to all those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, execute license agreements, assignment agreements, file extraordinary remedies such as nullification and/or revision and/or supplication of court decisions, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, assign, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a Power of Attorney.

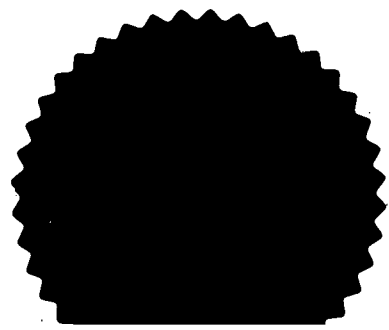
acciones por prácticas comerciales restrictivas y promoción de la competencia;

f) Obtención del registro de derechos de autor para cualquier tipo de obra artística, literaria, científica, musical, videográfica, cinematográfica, coreográficas, o cualquier otra producción, en el campo artístico, científico, o literario capaz de ser reproducido o expresado por cualquier medio conocido ahora o por conocer en el futuro; Registro de contratos relacionados con la ejecución o transferencia de derechos intelectuales; Obtención de tarifa postal reducida; g) Registro de nombres de dominio, su renovación, traspaso, cambio de nombre, cambio de domicilio, cancelación y demás actos relacionados con su administración. h) Las acciones reivindicatorias, de oposición, de cancelación, de nulidad, de infracción de derechos, de medidas cautelares, de medidas en frontera, de tutela, de competencia desleal, de concesión de licencias y en general los procesos civiles, constitucionales, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con todos estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan; y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, suscribir contratos de licencia, contratos de cesión, presentar recursos extraordinarios de casación y/o revisión y/o suplica, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, ceder, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Given and Signed this/Dado y firmado hoy 12th OCTOBER 2011
in/en BRINGDON, OXFORDSHIRE
Signature/Firma _____

Christian Rohlf

*Done me [Signature]
at Abingdon Oxon England (UK)
on 12 October 2011*





TRIANA, URIBE & MICHELSEN

NOTARIAL CERTIFICATION (CORPORATION)

On this 18th day of October (month), 2011 (year)
appeared before me Christian Rohlf

who I know personally and who signed this document as representative of the corporation or company named

Oxford Biotherapeutics Ltd

Consequently, I certify:

1. That I have seen the following documents (with date and origin):

- 1.1. Books of Search in the Register of Companies for England and Wales dated 13th October 2011
- 1.2.
- 1.3.

2. That the above documents prove the following:

2.1. That the corporation or company

Oxford Biotherapeutics Ltd
was constituted and exists in accordance with the laws of England and Wales

2.2. That the domicile of said corporation or company is England

2.3. That the corporation or company is developing its corporate or company activities and that the purpose for which the present power of attorney is granted is comprised within the corporation or company purposes.

2.4. That Mr. (MRS) Christian Rohlf

is authorized to grant the present power of attorney.

City OXFORD
State Oxfordshire
Country England

Notary Public

* Documents must be identified with date and origin

Signature/Firmado: Stuart Capel

STUART P B CAPEL
Notary Public

5000 Oxford Business Park South
Oxford OX4 2RH England (UK)

CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy, 18 (día) de OCTUBRE
(mes) de 201 1 (año) se hizo presente ante mí el
Señor CHRISTIAN ROHLF (a)

(nombre), a quien conozco personalmente y que firma este documento en representación de la sociedad denominada

OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD

En consecuencia certifico lo siguiente:

1. Que he revisado los siguientes documentos (con fecha y origen):

- 1.1. REGISTRO DE COMPAÑIAS DEL REINO
- 1.2. UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA E IRLANDA
- 1.3. DEL NORTE, DE FECHA 13/10/2011

2. Que estos documentos prueban:

2.1. Que la sociedad

OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD
(nombre) fue constituida y que existe de acuerdo con las leyes de REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

2.2. Que el domicilio de esta sociedad es INGLATERRA

2.3. Que esta compañía desarrolla actualmente su objeto social y que el objeto del poder que se otorga está comprendido dentro del mismo.

2.4. Que el Señor (a) CHRISTIAN ROHLF

está autorizado para otorgar este poder.

Ciudad OXFORD
Estado OXFORDSHIRE
País INGLATERRA

Notario Público

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord
This public document / Le présent acte public
2. Has been signed by **Stuart P B Capel**
a été signé par
3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de
5. at London/à Londres
6. Certified/Attesté
the/le **31 October 2011**
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.
8. Number/sous No **J043418**
9. Stamp:
timbre:
10. Signature: **I. McBride**
Zm



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5th October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country.

An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the content of the document is correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the content.

Traducción oficial hecha por Jimena Escobar Uribe, traductora e intérprete oficial según resolución No. 0369 de 1995 del Ministerio de Justicia, del documento legalizado mediante la **APOSTILLA** No. **J043418** de 31 de octubre de 2011 expedida en el Reino Unido correspondiente a un documento de poder y certificación notarial de la sociedad **OXFORD BIOTHERAPUTICS, LTD.**, domiciliada en Abingdon, Oxon, Gran Bretaña.

9
JIMENA ESCOBAR URIBE
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0369 Min. Justicia 1995

Documento de poder: Firmado el 18 de octubre de 2011 en Abingdon, Oxfordshire, firmado por Christian Rohlff, en inglés con idéntico texto en español diligenciado en la columna derecha del documento, por lo que no se hace necesaria su traducción.

Ante mí (ilegible) en Abingdon, Oxon, Inglaterra (Reino Unido) el 18 de octubre de 2011.

Firma ilegible y sello notarial.

Certificado Notarial: Ejecutado el 18 de octubre de 2011, en inglés con idéntico texto en español diligenciado en la columna derecha del documento, por lo que no se hace necesaria su traducción y legalizado mediante firma y sello por Stuart P. B. Capel, notario público, Inglaterra, Reino Unido.

APOSTILLA

(Convención de la Haya de 5 de octubre de 1961)

REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

Este documento público

2. Ha sido firmado por Stuart P. B. Capel.

- # Certificado

- Si este documento va a ser utilizado en un país que no sea miembro de la Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961, debe ser presentado a la sección consular de la misión que representa dicho país.

Una Apostilla o certificado de legalización solo confirma que la firma, sello y estampilla sobre el documento es autentica. No significa que el contenido del documento sea correcto o que la Oficina de Extranjería y del Commonwealth apruebe su contenido.

100072
Jimena Escobar Uribe
2011-01-06 15:30:00
Escuela de Ingenieros de Minas
Escuela de Ingenieros de Minas

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING THE
FILING OF AMENDMENTS OF THE CLAIMS

(PCT Administrative Instructions, Section 417)

To:

SILVA, Robin, M.
Morgan Lewis & Bockius LLP
One Market, Spear Street Tower
San Francisco, CA 94105
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 10 October 2013 (10.10.2013)	
Applicant's or agent's file reference 698015018WO1	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2012/044703	International filing date (day/month/year) 28 June 2012 (28.06.2012)
Applicant OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD. et al	

1. The applicant is hereby notified that amendments to the claims under Article 19 were received by the International Bureau on:
27 June 2013 (27.06.2013) .

2. This date is

☒ within the time limit under Rule 46.1.

Consequently, the international publication of the international application will contain the amended claims according to Rule 48.2(f), (h) and (i).

☐ after the expiration of the time limit under Rule 46.1.

Consequently, the amendments will not be published and will not be considered for the international procedure.

3. The applicant is reminded that the international application (description, claims and drawings) may be amended during the international preliminary examination under Chapter II, according to Article 34, and in any case, before each of the designated Offices, according to Article 28 and Rule 52, or before each of the elected Offices, according to Article 41 and Rule 78.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Mena Ana e-mail pt09.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 09
Facsimile No. +41 22 338 71 30	

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION,
OBTENTION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

SILVA, Robin, M.
Morgan Lewis & Bockius LLP
One Market, Spear Street Tower
San Francisco, CA 94105
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 18 July 2012 (18.07.2012)	
Applicant's or agent's file reference 698015018WO1	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2012/044703	International filing date (day/month/year) 28 June 2012 (28.06.2012)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 28 June 2011 (28.06.2011)
Applicant OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD. et al	

The applicant is hereby notified of the date of receipt (or of obtaining 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 the date of receipt, **the priority document concerned was submitted or transmitted to or obtained by the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis)**. This Form replaces any previously issued notification concerning submission, transmittal or obtaining of priority documents.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
28 June 2011 (28.06.2011)	61/502,167	US	12 July 2012 (12.07.2012)
27 June 2012 (27.06.2012)	PCT/US2012/044451	US	12 July 2012 (12.07.2012)

The letters "NR" denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received or obtained by the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis). Where the applicant has failed to either submit, request to prepare and transmit, or to request the International Bureau to obtain 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.

An asterisk "*" next to a date of receipt, denotes a priority document submitted or transmitted to or obtained by the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a); 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) or the request to the International Bureau to obtain the priority document was made after the applicable time limit under Rule 17.1(b-bis)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis), 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.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Deruaz Chantal e-mail pt09.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 09
Facsimile No. +41 22 338 71 30	

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



WIPO | PCT



(10) International Publication Number
WO 2013/003625 A2

(43) International Publication Date
3 January 2013 (03.01.2013)

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2012/044703

(22) International Filing Date:
28 June 2012 (28.06.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/502,167 28 June 2011 (28.06.2011) US
PCT/US2012/044451 27 June 2012 (27.06.2012) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD.** [GB/GB]; 94a Milton Park, Abingdon, Oxon OX14 4RY (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **ROHLFF, Christian** [DE/GB]; Oxford Bio Therapeutics Ltd., 94a Milton Park, Abingdon, Oxon OX14 4RY (GB). **TERRETT, Jonathan, Alexander** [GB/US]; 5941 Optical Court, San Jose, CA 95138 (US).

(74) Agents: **SILVA, Robin, M.** et al.; Morgan Lewis & Bockius LLP, One Market, Spear Street Tower, San Francisco, CA 94105 (US).

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

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

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))

(54) Title: ANTIBODIES

(57) Abstract: The invention provides antibodies which bind to the ADP-ribosyl cyclase 2. Nucleic acid molecules encoding the antibodies, expression vectors, host cells and methods for expressing the antibodies are also provided. The antibodies may be used for the treatment of human cancers, including acute myeloid leukemia (AML), B-cell chronic lymphocytic leukemia, breast cancer, colorectal cancer, kidney cancer, head and neck cancer, lung cancer, ovarian cancer and pancreatic cancer and human inflammatory diseases, including asthma, gout, crohns, lupus, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis, diabetes and atherosclerotic.

WO 2013/003625 A2

Abingdon

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



WIPO | PCT



(10) International Publication Number

WO 2013/003625 A4

(43) International Publication Date
3 January 2013 (03.01.2013)

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2012/044703

(22) International Filing Date:
28 June 2012 (28.06.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/502,167 28 June 2011 (28.06.2011) US
PCT/US2012/044451 27 June 2012 (27.06.2012) US

(71) Applicant (for all designated States except US): OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD. [GB/GB]; 94a Milton Park, Abingdon, Oxon OX14 4RY (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ROHLFF, Christian [DE/GB]; Oxford Bio Therapeutics Ltd., 94a Milton Park, Abingdon, Oxon OX14 4RY (GB). TERRETT, Jonathan, Alexander [GB/US]; 5941 Optical Court, San Jose, CA 95138 (US).

(74) Agents: SILVA, Robin, M. et al.; Morgan Lewis & Bockius LLP, One Market, Spear Street Tower, San Francisco, CA 94105 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

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

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

Published:

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

— with amended claims (Art. 19(1))

(88) Date of publication of the international search report:
6 September 2013

Date of publication of the amended claims: 21 November 2013

(54) Title: ANTIBODIES TO ADP-RIBOSYL CYCLASE 2

(57) Abstract: The invention provides antibodies which bind to the ADP-ribosyl cyclase 2. Nucleic acid molecules encoding the antibodies, expression vectors, host cells and methods for expressing the antibodies are also provided. The antibodies may be used for the treatment of human cancers, including acute myeloid leukemia (AML), B-cell chronic lymphocytic leukemia, breast cancer, colorectal cancer, kidney cancer, head and neck cancer, lung cancer, ovarian cancer and pancreatic cancer and human inflammatory diseases, including asthma, gout, crohns, lupus, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis, diabetes and atherosclerotic.

WO 2013/003625 A4

15

AMENDED CLAIMS**received by the International Bureau on 27 June 2013 (27.06.2013)**

1. An antibody that specifically binds to BST1, said antibody comprising:
 - a) a heavy chain variable region comprising:
 - i) a first vhCDR comprising SEQ ID NO: 10;
 - ii) a second vhCDR comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 12 and SEQ ID NO: 51; and
 - iii) a third vhCDR comprising SEQ ID NO: 14; and
 - b) a light chain variable region comprising:
 - i) a first vlCDR comprising SEQ ID NO: 16;
 - ii) a second vlCDR comprising SEQ ID NO: 18; and
 - iii) a third vlCDR comprising a SEQ ID NO: 20.
2. An antibody that specifically binds to BST1, said antibody comprising:
 - a) a heavy chain variable region comprising:
 - i) a first vhCDR comprising SEQ ID NO: 9;
 - ii) a second vhCDR comprising SEQ ID NO: 11; and
 - iii) a third vhCDR comprising SEQ ID NO: 13; and
 - b) a light chain variable region comprising:
 - i) a first vlCDR comprising SEQ ID NO: 15;
 - ii) a second vlCDR comprising SEQ ID NO: 17; and
 - iii) a third vlCDR comprising SEQ ID NO: 19.
3. An antibody that specifically binds to BST1, said antibody comprising:
 - a) a heavy chain variable region comprising:
 - i) a first vhCDR comprising SEQ ID NO: 56;
 - ii) a second vhCDR comprising SEQ ID NO: 57; and
 - iii) a third vhCDR comprising SEQ ID NO: 58; and
 - b) a light chain variable region comprising:
 - i) a first vlCDR comprising SEQ ID NO: 59;
 - ii) a second vlCDR comprising SEQ ID NO: 60; and
 - iii) a third vlCDR comprising SEQ ID NO: 61.

16

4. A variant anti-BST1 antibody comprising variant variable regions of a parent antibody, wherein the parent antibody comprises:

- a) a first vhCDR comprising SEQ ID NO: 10;
- b) a second vhCDR comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 12 and SEQ ID NO: 51;
- c) a third vhCDR comprising SEQ ID NO: 14;
- d) a first vlCDR comprising SEQ ID NO: 16;
- e) a second vlCDR comprising SEQ ID NO: 18; and
- f) a third vlCDR comprising a SEQ ID NO: 20;

wherein said variant anti-BST1 antibody has from one to four amino acid changes collectively in said first vhCDR, said second vhCDR, said third vhCDR, said first vlCDR, said second vlCDR and said third vlCDR.

5. A variant anti-BST1 antibody comprising variant variable regions of a parent antibody, wherein the parent antibody comprises:

- a) a first vhCDR comprising SEQ ID NO: 9;
- b) a second vhCDR comprising SEQ ID NO: 11;
- c) a third vhCDR comprising SEQ ID NO: 13;
- d) a first vlCDR comprising SEQ ID NO: 15;
- e) a second vlCDR comprising SEQ ID NO: 17; and
- f) a third vlCDR comprising a SEQ ID NO: 19;

wherein said variant anti-BST1 antibody has from one to four amino acid changes collectively in said first vhCDR, said second vhCDR, said third vhCDR, said first vlCDR, said second vlCDR and said third vlCDR.

6. A variant anti-BST1 antibody comprising variant variable regions of a parent antibody, wherein the parent antibody comprises:

- a) a first vhCDR comprising SEQ ID NO: 56;
- b) a second vhCDR comprising SEQ ID NO: 57;
- c) a third vhCDR comprising SEQ ID NO: 58;
- d) a first vlCDR comprising SEQ ID NO: 59;
- e) a second vlCDR comprising SEQ ID NO: 60; and
- f) a third vlCDR comprising a SEQ ID NO: 61;

wherein said variant anti-BST1 antibody has from one to four amino acid changes collectively in said first vhCDR, said second vhCDR, said third vhCDR, said first vlCDR, said second vlCDR and said third vlCDR.

7. An antibody according to claim 1 or 4 comprising:
 - a heavy chain at least 95% identical SEQ ID NO: 2, and
 - a light chain at least 95% identical SEQ ID NO: 4.
8. An antibody according to claim 1 comprising:
 - a heavy chain variable region of SEQ ID NO: 2, and
 - a light chain variable region of SEQ ID NO: 4.
9. An antibody according to claim 2 or 5 comprising:
 - a heavy chain at least 95% identical SEQ ID NO: 1, and
 - a light chain at least 95% identical SEQ ID NO: 3.
10. An antibody according to claim 2 comprising:
 - a heavy chain variable region of SEQ ID NO: 1, and
 - a light chain variable region of SEQ ID NO: 3.
11. An antibody according to claim 1 or 4 comprising:
 - a heavy chain at least 95% identical SEQ ID NO: 46, and
 - a light chain at least 95% identical SEQ ID NO: 49.
12. An antibody according to claim 11 comprising:
 - a heavy chain variable region of SEQ ID NO: 46, and
 - a light chain variable region of SEQ ID NO: 49.
13. An antibody according to claim 3 or 6 comprising:
 - a heavy chain at least 95% identical SEQ ID NO: 52, and
 - a light chain at least 95% identical SEQ ID NO: 53.
14. An antibody according to claim 13 comprising:
 - a heavy chain variable region of SEQ ID NO: 52, and
 - a light chain variable region of SEQ ID NO: 53.

15. An isolated monoclonal antibody, or an antigen binding portion thereof, which binds an epitope on BST1 recognized by an antibody set forth in any of the preceding claims including DNA and amino acid changes that maintain at least 80% of the binding to BST1 of the original sequences.
16. An antibody as claimed in any one of claims 1 to 15, wherein the antibody is a full-length antibody of an IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4 isotype.
17. An antibody or an antigen-binding portion thereof, according to any previous claim further comprising a covalently attached moiety.
18. An antibody or an antigen-binding portion thereof, according to claim 17 wherein said moiety is a drug.
19. An antibody or an antigen-binding portion thereof according to claim 18 wherein said drug is selected from the group consisting of a maytansinoid, a dolastatin, an auristatin, a trichothecene, a calicheamicin, CC1065 and derivatives thereof.
20. An isolated antibody according to any of the claims 1-19, wherein said antibody induces antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), complement dependent cytotoxicity (CDC) and/or T-cell cytotoxicity.
21. An isolated antibody according to claim 20, wherein the antibody is an engineered antibody having increased binding to Fc receptors and/or increased potency for ADCC, and/or a bispecific antibody.
22. An isolated antibody according to any previous claim, wherein the antibody is a bispecific or multispecific antibody which specifically binds to a first antigen comprising BST1 and a second antigen selected from the group consisting of CD3 antigen and CD5 antigen.
23. A nucleic acid encoding a heavy chain of the antibody of any of the preceding claims.
24. A nucleic acid encoding a light chain of the antibody of any of the preceding claims.

25. A host cell containing the nucleic acids of claim 23 and/or 24.
26. A method of making an antibody comprising culturing a host cell according to claim 25 under conditions where the antibody or an antigen-binding portion thereof is expressed and optionally isolating the antibody or an antigen-binding portion thereof.
27. A method of treating a disease comprising administering to a patient in need thereof an antibody or an antigen-binding portion thereof of any of the claims 1-22 wherein the antibody or antigen-binding portion thereof is internalized by a cell expressing BST1, said antibody comprising a covalently attached drug conjugate.
28. A method of treating a disease comprising administering to a patient in need thereof an antibody of any of the claims 1-22 wherein the antibody induces antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), complement dependent cytotoxicity (CDC) and/or T-cell cytotoxicity.
29. A method according to any of the claims 27-28 wherein said disease is cancer, including acute myeloid leukemia (AML), B-cell chronic lymphocytic leukemia, breast cancer, colorectal cancer, kidney cancer, head and neck cancer, lung cancer, ovarian cancer or pancreatic cancer.
30. A method according to any of the claims 27-28 wherein said disease is an inflammatory disease, including asthma, gout, crohns, lupus, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis, diabetes or atherosclerotic.
31. An antibody as claimed in any one of claims 1-19 for use in therapy or for use as a medicament.

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(10) International Publication Number

WO 2013/003625 A3

(43) International Publication Date
3 January 2013 (03.01.2013)

WIPO | PCT

- (51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2012/044703
- (22) International Filing Date:
28 June 2012 (28.06.2012)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/502,167 28 June 2011 (28.06.2011) US
PCT/US2012/044451 27 June 2012 (27.06.2012) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD.** [GB/GB]; 94a Milton Park, Abingdon, Oxon OX14 4RY (GB).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **ROHLFF, Christian** [DE/GB]; Oxford Bio Therapeutics Ltd., 94a Milton Park, Abingdon, Oxon OX14 4RY (GB). **TERRETT, Jonathan, Alexander** [GB/US]; 5941 Optical Court, San Jose, CA 95138 (US).
- (74) Agents: **SILVA, Robin, M.** et al.; Morgan Lewis & Bockius LLP, One Market, Spear Street Tower, San Francisco, CA 94105 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report (Art. 21(3))
- (88) Date of publication of the international search report:
6 September 2013

WO 2013/003625 A3

(54) Title: ANTIBODIES TO ADP-RIBOSYL CYCLASE 2

(57) Abstract: The invention provides antibodies which bind to the ADP-ribosyl cyclase 2. Nucleic acid molecules encoding the antibodies, expression vectors, host cells and methods for expressing the antibodies are also provided. The antibodies may be used for the treatment of human cancers, including acute myeloid leukemia (AML), B-cell chronic lymphocytic leukemia, breast cancer, colorectal cancer, kidney cancer, head and neck cancer, lung cancer, ovarian cancer and pancreatic cancer and human inflammatory diseases, including asthma, gout, crohns, lupus, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis, diabetes and atherosclerotic.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/044703

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KAISHO T ET AL: "Bst-1, a Surface Molecule of Bone Marrow Stromal Cell Lines that Facilitates Pre-B Cell Growth", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 91, 1 June 1994 (1994-06-01), pages 5325-5329, XP002998621, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.91.12.5325 the whole document ----- -/--	1-30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April 2013

Date of mailing of the international search report

24/05/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pérez-Mato, Isabel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/044703

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/044703

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OKUYAMA Y ET AL: "Human BST-1 Expressed on Myeloid Cells Functions as a Receptor Molecule", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 228, no. 3, 21 November 1996 (1996-11-21), pages 838-845, XP002113949, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1006/BBRC.1996.1741 the whole document -----	1-30
Y	JP 2005 295921 A (PHARMA DESIGN INC) 27 October 2005 (2005-10-27) the whole document -----	1-30
Y	SPOSATO P ET AL: "Analysis of human CD157 by murine monoclonal antibodies (MoAbs)", TISSUE ANTIGENS, vol. 55, no. Supplement 1, 2000, page 71, XP9168941, & 7TH WORKSHOP AND CONFERENCE ON HUMAN LEUCOCYTE DIFFERENTIATION ANTIGENS; HARROGATE, ENGLAND, UK; JUNE 20-24, 2000 ISSN: 0001-2815 abstract -----	1-30
Y	MIZUE SEKI ET AL: "An Immature Rat Lymphocyte Marker CD157: Striking Differences in the Expression between Mice and Rats", IMMUNOBIOLOGY, vol. 203, no. 5, 1 August 2001 (2001-08-01), pages 725-742, XP055060333, ISSN: 0171-2985, DOI: 10.1016/S0171-2985(01)80002-4 the whole document -----	1-30
Y	MCNAGNY ET AL: "BP-3 alloantigen. A cell surface glycoprotein that marks early B lineage cells and mature myeloid lineage cells in mice.", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 141, no. 8, 1 October 1988 (1988-10-01), pages 2551-2556, XP055060334, ISSN: 0022-1767 the whole document ----- -/--	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/044703

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	E. ORTOLAN ET AL: "Functional Role and Prognostic Significance of CD157 in Ovarian Carcinoma", JNCI JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, vol. 102, no. 15, 4 August 2010 (2010-08-04), pages 1160-1177, XP055050187, ISSN: 0027-8874, DOI: 10.1093/jnci/djq256 the whole document	1-30
Y	----- N. LO BUONO ET AL: "The CD157-Integrin Partnership Controls Transendothelial Migration and Adhesion of Human Monocytes", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 286, no. 21, 27 May 2011 (2011-05-27), pages 18681-18691, XP055060178, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M111.227876 the whole document	1-30
Y	----- A. FUNARO ET AL: "CD157 is an important mediator of neutrophil adhesion and migration", BLOOD, vol. 104, no. 13, 15 December 2004 (2004-12-15), pages 4269-4278, XP055060204, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2004-06-2129 the whole document	1-30
Y	----- TODD ET AL: "The modulated expression of Mo5, a human myelomonocytic plasma membrane antigen.", BLOOD, vol. 65, no. 4, 1 April 1985 (1985-04-01), pages 964-973, XP055060226, ISSN: 0006-4971 the whole document	1-30
Y	----- CEDARLANE LABORATORIES LIMITED: "PURIFIED ANTI-MOUSE CD157 RECEPTOR MONOCLONAL ANTIBODY", 10 October 2008 (2008-10-10), XP002695721, Retrieved from the Internet: URL:https://www.cedarlanelabs.com/Products/Detail/Reagents?code=CL8984AP [retrieved on 2013-04-18] the whole document	1-30
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/044703

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ISHIHARA K ET AL: "BST-1/CD157 regulates the humoral immune responses in vivo.", CHEMICAL IMMUNOLOGY 2000, vol. 75, 2000, pages 235-255, XP9168970, ISSN: 1015-0145 the whole document	1-30
A	----- F. MALAVASI ET AL: "Evolution and Function of the ADP Ribosyl Cyclase/CD38 Gene Family in Physiology and Pathology", PHYSIOLOGICAL REVIEWS, vol. 88, no. 3, 1 July 2008 (2008-07-01), pages 841-886, XP055060177, ISSN: 0031-9333, DOI: 10.1152/physrev.00035.2007 the whole document -----	1-30

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 4, 7, 8, 11, 12(completely); 15-30(partially)

directed to an antibody specific for BST1 having CDRs of SEQ ID NOs: 10, 12 or 51, 14, 16, 18 and 20, to variants thereof, to antibodies binding the same epitope as these, to nucleic acids encoding the heavy and light chain of said antibodies, to host cells comprising said nucleic acids, to methods to produce the antibodies using said host cells and to therapeutic methods of said antibodies.

2. claims: 2, 5, 9, 10(completely); 15-30(partially)

directed to an antibody specific for BST1 having CDRs of SEQ ID NOs: 9, 11, 13, 15, 17 and 19, to variants thereof, to antibodies binding the same epitope as these, to nucleic acids encoding the heavy and light chain of said antibodies, to host cells comprising said nucleic acids, to methods to produce the antibodies using said host cells and to therapeutic methods of said antibodies.

3. claims: 3, 6, 13, 14(completely); 15-30(partially)

directed to an antibody specific for BST1 having CDRs of SEQ ID NOs: 56-61, to variants thereof, to antibodies binding the same epitope as these, to nucleic acids encoding the heavy and light chain of said antibodies, to host cells comprising said nucleic acids, to methods to produce the antibodies using said host cells and to therapeutic methods of said antibodies.

**MODIFICACIÓN DE LAS
REIVINDICACIONES HECHAS
EN VIRTUD DEL ARTÍCULO 19
DEL PCT**



REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une específicamente con BST1, comprendiendo dicho anticuerpo:
 - a) una región variable de cadena pesada que comprende:
 - i) una primera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 10;
 - ii) una segunda vhCDR que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID NO: 12 y la SEC ID NO: 51; y
 - iii) una tercera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 14; y
 - b) una región variable de cadena ligera que comprende:
 - i) una primera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 16;
 - ii) una segunda vlCDR que comprende la SEC ID NO: 18; y
 - iii) una tercera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 20.
2. Un anticuerpo que se une específicamente con BST1, comprendiendo dicho anticuerpo:
 - a) una región variable de cadena pesada que comprende:
 - i) una primera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 9;
 - ii) una segunda vhCDR que comprende la SEC ID NO: 11; y
 - iii) una tercera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 13; y
 - b) una región variable de cadena ligera que comprende:
 - i) una primera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 15;
 - ii) una segunda vlCDR que comprende la SEC ID NO: 17; y
 - iii) una tercera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 19.
3. Un anticuerpo que se une específicamente con BST1, comprendiendo dicho anticuerpo:
 - a) una región variable de cadena pesada que comprende:
 - i) una primera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 56;
 - ii) una segunda vhCDR que comprende la SEC ID NO: 57; y
 - iii) una tercera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 58; y

- b) una región variable de cadena ligera que comprende:
 - i) una primera vLCDR que comprende la SEC ID NO: 59;
 - ii) una segunda vLCDR que comprende la SEC ID NO: 60; y
 - iii) una tercera vLCDR que comprende la SEC ID NO: 61.
4. Un anticuerpo anti-BST1 variante que comprende regiones variables variantes de un anticuerpo original, en donde el anticuerpo original comprende:
- a) una primera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 10;
 - b) una segunda vhCDR que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID NO: 12 y la SEC ID NO: 51;
 - c) una tercera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 14;
 - d) una primera vLCDR que comprende la SEC ID NO: 16;
 - e) una segunda vLCDR que comprende la SEC ID NO: 18; y
 - f) una tercera vLCDR que comprende la SEC IF NO: 20;
- en donde dicho anticuerpo anti-BST1 variante tiene de uno a cuatro cambios de aminoácido colectivamente en dicha primera vhCDR, dicha segunda vhCDR, dicha tercera vhCDR, dicha primera vLCDR, dicha segunda vLCDR y dicha tercera vLCDR.
5. Un anticuerpo anti-BST1 variante que comprende regiones variables variantes de un anticuerpo original, en donde el anticuerpo original comprende:
- a) una primera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 9;
 - b) una segunda vhCDR que comprende la SEC ID NO: 11;
 - c) una tercera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 13
 - d) una primera vLCDR que comprende la SEC ID NO: 15;
 - e) una segunda vLCDR que comprende la SEC ID NO: 17; y
 - f) una tercera vLCDR que comprende la SEC ID NO: 19;

en donde dicho anticuerpo anti-BST1 variante tiene de uno a cuatro cambios de aminoácido colectivamente en dicha primera vhCDR, dicha segunda vhCDR, dicha tercera vhCDR, dicha primera vlCDR, dicha segunda vlCDR y dicha tercera vlCDR.

6. Un anticuerpo anti-BST1 variante que comprende regiones variables variantes de un anticuerpo original, en donde el anticuerpo original comprende:

- a) una primera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 56;
- b) una segunda vhCDR que comprende la SEC ID NO: 57;
- c) una tercera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 58;
- d) una primera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 59;
- e) una segunda vlCDR que comprende la SEC ID NO: 60; y
- f) una tercera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 61;

en donde dicho anticuerpo anti-BST1 variante tiene de uno a cuatro cambios de aminoácido colectivamente en dicha primera vhCDR, dicha segunda vhCDR, dicha tercera vhCDR, dicha primera vlCDR, dicha segunda vlCDR y dicha tercera vlCDR.

7. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 4 que comprende:

una cadena pesada por lo menos 95% idéntica a la SEC ID NO: 2; y

una cadena ligera por lo menos 95% de la SEC ID NO: 4.

8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:

una región variable de cadena pesada de la SEC ID NO: 2, y

una región variable de cadena ligera de la SEC ID NO: 4.

9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2 o 5 que comprende:

una cadena pesada por lo menos 95% idéntica a la SEC ID NO: 1, y

una cadena ligera por lo menos 95% idéntica a la SEC ID NO: 3.

10. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2 que comprende:
una región variable de cadena pesada de la SEC ID NO: 1, y
una región variable de cadena ligera de la SEC ID NO: 3.
11. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 4 que comprende:
una cadena pesada por lo menos 95% idéntica a la SEC ID NO: 46, y
una cadena ligera por lo menos 95% idéntica a la SEC ID NO: 49.
12. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 11 que comprende:
una región variable de cadena pesada de la SEC ID NO: 46, y
una región variable de cadena ligera de la SEC ID NO: 49.
13. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3 o 6 que comprende:
una cadena pesada por lo menos 95% idéntica a la SEC ID NO: 52, y
una cadena ligera por lo menos 95% idéntica a la SEC ID NO: 53.
14. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 13 que comprende:
una región variable de cadena pesada de la SEC ID NO: 52, y
una región variable de cadena ligera de la SEC ID NO: 53.
15. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, el cual une un epítipo en BST1 reconocido por un anticuerpo establecido en cualquiera de las reivindicaciones precedentes incluyendo cambios de ADN y aminoácido que mantienen por lo menos 80% de la unión a BST1 de las secuencias originales.

16. El anticuerpo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
17. El anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que comprende además una fracción unida covalentemente.
18. El anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la fracción es un fármaco.
19. El anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dicho fármaco se selecciona del grupo que consiste de un maitansinoide, una dolastatina, una auristatina, un tricoteceno, una calicheamicina, CC1056 y derivados de los mismos.
20. El anticuerpo aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde dicho anticuerpo induce la citotoxicidad mediada por una célula dependiente de un anticuerpo (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o la citotoxicidad de célula T.
21. El anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el anticuerpo es un anticuerpo diseñado que tiene unión incrementada para los receptores Fc y/o la potencia incrementada para ADCC, y/o el anticuerpo biespecífico.
22. El anticuerpo aislado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico o multiespecífico que se une específicamente a un primer antígeno que comprende BST1 y un

segundo antígeno seleccionado del grupo que consiste de un antígeno CD3 y un antígeno CD5.

23. Un ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
24. Un ácido nucleico que codifica una cadena ligera del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
25. Una célula huésped que contiene ácidos nucleico de la reivindicación 23 y/o 24.
26. Un método para hacer un anticuerpo que comprende cultivar una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 25, bajo condiciones en donde el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo está expresado, y aislar opcionalmente el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo.
27. Un método para tratar una enfermedad que comprende administrar a un paciente que lo necesita, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en donde el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo es internalizado mediante una célula que expresa BST1, comprendiendo dicho anticuerpo un conjugado de fármaco covalentemente unido.
28. Un método para tratar una enfermedad que comprende administrar a un paciente que lo necesita un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en donde el anticuerpo induce la citotoxicidad mediada por una célula

dependiente de un anticuerpo (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o la citotoxicidad de célula T.

29. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27-28, en donde dicha enfermedad es cáncer, incluyendo leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica de célula B, cáncer de mama, cáncer colorectal, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario o cáncer pancreático.
30. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27-28, en donde dicha enfermedad es una enfermedad inflamatoria, incluyendo, asma, gota, enfermedad de Crohns, lupus, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, diabetes o aterosclerótica.
31. El anticuerpo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-19 para usar en terapia o para usar como un medicamento.

TEXTO DE LA PATENTE

ANTICUERPOS

INTRODUCCION

La presente divulgación se refiere de manera general a los campos de la inmunología y la biología molecular. Más específicamente, se proporciona aquí anticuerpos y otras proteínas terapéuticas contra la ADP-ribosil ciclasa 2, ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos y proteínas terapéuticas, métodos para preparar anticuerpos monoclonales y otras proteínas terapéuticas, y métodos para el tratamiento de enfermedades, tales como cáncer mediado por la expresión/actividad de ADP-ribosil ciclasa 2 y/o asociado por lo tanto con la expresión/actividad anormal de ligandos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La ADP-ribosil ciclasa 2 (también conocida como antígeno estromal de médula ósea 1 (BST1) o CD157) es una ectoenzima bifuncional de lípido anclado que cataliza la ciclación de ribonucleótido y la hidrólisis. Esto genera la ADP-ribosa cíclica de segundo mensajero de nucleótido y la ADP-ribosa que son capaces de activar la liberación de calcio y la fosforilación de la proteína (FEBS Lett. 1994, 356(2-3):244-8). Es capaz de soportar el desarrollo de pre-células B en forma de paracrina, posiblemente mediante la generación de NAD⁺ metabolitos (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91:5325-5329; J Biol Chem. 2005, 280:5343-5349).

La ADP-ribosil ciclasa 2 y su homóloga, CD38, parece que actúan como receptores, generando segundos metabolitos mensajeros que inducen la liberación intracelular de Ca²⁺ vía el receptor de rianodina (Biochem Biophys Res Commun. 1996, 228(3):838-45). También puede actuar vía la integrina CD11b para efectuar la liberación de C12⁺ mediante la vía de la quinasa PI-3 (J Biol

Regul Homeost Agents. 2007;21(1-2):5-11). No se ha reportado anteriormente que la BST1 se origina de leucemia mieloide aguda (AML), cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de pulmón o membranas de la célula del cáncer pancreático y representa una proteína de nuevo valor terapéutico y de diagnóstico. También se ha mostrado que la BST1 se expresa en los monocitos y granulocitos, los cuales pueden asociarse con y activarse en enfermedades tales como el asma, la gota, enfermedad de Crohns, el lupus y la diabetes. Los monocitos también están implicados en el desarrollo de las placas ateroscleróticas.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente divulgación proporciona anticuerpos dirigidos contra la BST1, los ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos y las proteínas terapéuticas, métodos para preparar anticuerpos anti-BST1 y otras proteínas terapéuticas, y métodos para el tratamiento de enfermedades, tales como trastornos mediados por la BST1, por ejemplo, cánceres humanos, incluyendo leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica de célula B, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático y enfermedades inflamatorias humanas, incluyendo asma, gota, enfermedad de Crohns, lupus, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, diabetes y aterosclerosis, en adelante referidas como "las enfermedades de la invención".

De este modo, la presente divulgación proporciona anticuerpos aislados, en particular murino, anticuerpos monoclonales quiméricos humanizados y completamente humanos que se enlazan con la BST1 y presentan una o más propiedades funcionales deseables. Dichas propiedades incluyen, por ejemplo, enlazamiento específico de alta afinidad a la BST1. También se proporcionan

métodos para tratar una variedad de enfermedades mediadas por BST1 que usan los anticuerpos, las proteínas y las composiciones de la presente invención.

En una modalidad, el anticuerpo anti-BST1 aislado tiene:

- a) una región variable de cadena pesada que comprende:
 - i) una primera CDR que comprende una secuencia por lo menos 80% idéntica a la SEC ID NO: 10;
 - ii) una segunda CDR que comprende una secuencia por lo menos 80% idéntica a la SEC ID NO: 12 o la SEC ID NO: 51;
 - iii) una tercera CDR que comprende una secuencia por lo menos 80% idéntica a la SEC ID NO: 14; y
- b) una región variable de cadena ligera que comprende:
 - i) una primera CDR que comprende una secuencia por lo menos 80% idéntica a la SEC ID NO: 16;
 - ii) una segunda CDR que comprende una secuencia por lo menos 80% idéntica a la SEC ID NO: 18;
 - iii) una tercera CDR que comprende una secuencia por lo menos 80% idéntica a la SEC ID NO: 20.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-BST1 aislado tiene:

- a) una región variable de cadena pesada que comprende:
 - i) una primera CDR que comprende una secuencia por lo menos 80% idéntica a la SEC ID NO: 9;
 - ii) una segunda CDR que comprende una secuencia por lo menos 80% idéntica a la SEC ID NO: 11;
 - iii) una tercera CDR que comprende una secuencia por lo menos 80% idéntica a la SEC ID NO: 13; y
- b) una región variable de cadena ligera que comprende:

- i) una primera CDR que comprende una secuencia por lo menos 80% idéntica a la SEC ID NO: 15;
- ii) una segunda CDR que comprende una secuencia por lo menos 80% idéntica a la SEC ID NO: 17;
- iii) una tercera CDR que comprende una secuencia por lo menos 80% idéntica a la SEC ID NO: 19.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-BST1 aislado tiene:

- a) una región variable de cadena pesada que comprende:
 - i) una primera CDR que comprende una secuencia por lo menos 80% idéntica a la SEC ID NO: 56;
 - ii) una segunda CDR que comprende una secuencia por lo menos 80% idéntica a la SEC ID NO: 57;
 - iii) una tercera CDR que comprende una secuencia por lo menos 80% idéntica a la SEC ID NO: 58; y
- b) una región variable de cadena ligera que comprende:
 - i) una primera CDR que comprende una secuencia por lo menos 80% idéntica a la SEC ID NO: 59;
 - ii) una segunda CDR que comprende una secuencia por lo menos 80% idéntica a la SEC ID NO: 60;
 - iii) una tercera CDR que comprende una secuencia por lo menos 80% idéntica a la SEC ID NO: 61.

El(los) epítopo(s) reconocido(s) por los anticuerpos de la invención se encuentra(n) en la secuencia de polipéptido de SEC ID NO: 44.

En otra modalidad, los anticuerpos de la invención comprenden CDRs variables en comparación con los anticuerpos originales aquí descritos. De este modo, la invención proporciona anticuerpos de variantes que comprenden

regiones variables de variantes de un anticuerpo original, en donde el anticuerpo original comprende una primera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 10, una segunda vhCDR que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NO: 12 y SEC ID NO: 51, una tercera vhCDR que comprende una SEC ID NO:14, una primera vlCDR que comprende una SEC ID NO:16, una segunda vlCDR que comprende una SEC ID NO: 18; y una tercera vlCDR que comprende una SEC ID NO:20, y en donde el anticuerpo de variante tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácido colectivamente en el grupo de la primera vhCDR, la segunda vhCDR, la tercera vhCDR, la primera vlCDR, la segunda vlCDR y la tercera vlCDR, con desde 4 sustituciones de uso particular, y en donde el anticuerpo conserva la unión específica a BST1. De manera similar, el anticuerpo original puede comprender una primera vhCDR que comprende la SEC ID NO:9, una segunda vhCDR que comprende la SEC ID NO:11, una tercera vhCDR que comprende la SEC ID NO:13; una primera vlCDR que comprende la SEC ID NO:15, una segunda vlCDR que comprende SEC ID NO: 17 y una tercera vlCDR que comprende una SEC ID NO:19. Además, el anticuerpo original puede comprender una primera vhCDR que comprende la SEC ID NO:56, una segunda vhCDR que comprende la SEC ID NO: 57, una tercera vhCDR que comprende la SEC ID NO:58, una primera vlCDR que comprende la SEC ID NO:59, una segunda vlCDR que comprende la SEC ID NO:60 y una tercera vlCDR que comprende una SEC ID NO:61.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-BST1 aislado tiene la secuencia de la región variable de cadena pesada según se representa mediante la SEC ID NO: 2 y la secuencia de la región variable de cadena ligera según se representa mediante la SEC ID NO: 4.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-BST1 aislado tiene una secuencia de la región variable de cadena pesada según se representa mediante la SEC ID NO:

45 y la secuencia de la región variable de cadena ligera según se representa mediante la SEC ID NO: 49.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-BST1 aislado tiene la secuencia de la región variable de cadena pesada según se representa mediante la SEC ID NO: 1 y la secuencia de la región variable de cadena ligera según se representa mediante la SEC ID NO: 3.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-BST1 aislado tiene la secuencia de la región variable de cadena pesada según se representa mediante la SEC ID NO: 52 y la secuencia de la región variable de cadena ligera según se representa mediante la SEC ID NO: 53.

En una modalidad, cualquiera de los anticuerpos precedentes tiene un dominio Fc. En algunas modalidades, el dominio Fc es humano. En otras modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc humano de variante.

En otra modalidad, cualquiera de los anticuerpos descritos precedentes son anticuerpos monoclonales.

En una modalidad, cualquiera de los anticuerpos descritos precedentes tiene además un agente conjugado. En algunas modalidades, el agente conjugado es un agente citotóxico. En otras modalidades, el agente conjugado es un polímero. En otra modalidad, el polímero es un polietilenglicol (PEG). En otra modalidad, el PEG es un derivado de PEG.

En una modalidad, el anticuerpo conjugado es un anticuerpo que compete con cualquiera de los anticuerpos precedentes para la unión con la BST1.

En otra modalidad, se describe un método para preparar cualquiera de los anticuerpos precedentes, siendo que el método obtiene una célula huésped que contiene una o más moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos precedentes, cultivándose la célula huésped en un cultivo de célula huésped, proporcionando condiciones de cultivo de célula huésped en donde una o más de las moléculas de ácido nucleico son expresadas, y recuperando el anticuerpo de la célula huésped o el cultivo de célula huésped.

En una modalidad, se proporciona cualquiera de los anticuerpos anti-BST1 descritos en una composición farmacéutica.

En otra modalidad, se proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada con BST1, siendo el método administrado a un sujeto que necesita cualquiera de los anticuerpos precedentes en una cantidad efectiva.

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, un fragmento de anticuerpo, o un mimético de anticuerpo que une un epítipo en la BST1 humana reconocida por un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido establecida en una SEC ID NO: seleccionada del grupo que consiste de 2, 1 y 52 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido establecida en una SEC ID NO: seleccionada del grupo que consiste de 4, 3 54 y 55. En algunas modalidades el anticuerpo aislado es un anticuerpo de longitud completa de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la presente invención se selecciona del grupo que consiste de: un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena única, un

inmunoconjugado, un anticuerpo des-fucosilado, y un anticuerpo biespecífico. El fragmento de anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste de: un UniBody, un anticuerpo de dominio y un NanoBody. En algunas modalidades, los inmunoconjugados de la invención comprenden un agente terapéutico. En otro aspecto de la invención, el agente terapéutico es una citotoxina o un isótopo radioactivo.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la presente invención se selecciona del grupo que consiste de: un Affibody, un DARPin, un Anticalin, un Avimer, un Versabody y un Duocalin.

En modalidades alternativas, las composiciones de la presente invención comprenden un anticuerpo aislado o porción de unión a antígeno y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otros aspectos, el anticuerpo de la presente invención es una composición que comprende el anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno de acuerdo con la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, la invención comprende una molécula aislada de ácido nucleico que codifica la cadena pesada o ligera del anticuerpo aislado o porción de unión a antígeno que se une con un epítipo en la BST1 humana. Otros aspectos de la invención comprenden vectores de expresión que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico, y células huésped que comprenden dichos vectores.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-BST1, comprendiendo dicho método las etapas de: obtener una célula huésped que contiene una o más de las moléculas de ácido

nucleico que codifican el anticuerpo de la invención; cultivar la célula huésped en un cultivo de célula huésped; proporcionar un cultivo de célula huésped en donde se expresan una o más de las moléculas de ácido nucleico; y recuperar el anticuerpo desde la célula huésped o desde el cultivo de célula huésped.

En otras modalidades, la invención está dirigida a los métodos para tratar o prevenir una enfermedad asociada con las células diana que expresan la BS>T1, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a un sujeto un anticuerpo anti-BST1, o una porción de unión a antígeno del mismo, en una cantidad efectiva para tratar o prevenir la enfermedad. En algunos aspectos, la enfermedad tratada o prevenida por los anticuerpos o una porción de unión a antígeno de los mismos de la invención, es cáncer humano. En algunas modalidades, las enfermedades tratadas o prevenidas por los anticuerpos de la presente invención incluyen las enfermedades de la invención.

En otras modalidades, la invención está dirigida a métodos para tratar o prevenir una enfermedad asociada con las células diana que expresan la BST1, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a un sujeto un anticuerpo anti-BST1, o una porción de unión a antígeno del mismo, en una cantidad efectiva para tratar o prevenir la enfermedad. En algunos aspectos, la enfermedad tratada o prevenida por los anticuerpos o porción de unión a antígeno del mismo de la invención, es cáncer humano. En algunas modalidades, las enfermedades tratadas o prevenidas por los anticuerpos de la presente invención son las enfermedades de la invención.

En otras modalidades, la invención está dirigida a un anticuerpo anti-BST1, o una porción de unión a antígeno del mismo, para usar en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con las células diana que expresan la BST1. En algunos aspectos, la enfermedad tratada o prevenida mediante los

anticuerpos o la porción de unión a antígeno del mismo de la invención es cáncer humano. En algunas modalidades, las enfermedades tratadas o prevenidas por los anticuerpos de la presente invención son las enfermedades de la presente invención.

En otras modalidades, la invención está dirigida al uso de un anticuerpo anti-BST1, o una porción de unión a antígeno del mismo, para la elaboración de un medicamento para usar en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con las células diana que expresan la BST1. En algunos aspectos, la enfermedad tratada o prevenida por el medicamento de la invención es cáncer humano. En algunas modalidades, las enfermedades tratadas o prevenidas por el medicamento de la presente invención son las enfermedades de la invención.

En otras modalidades, la presente invención es un anticuerpo monoclonal aislado o una porción de unión a antígeno del mismo, un fragmento de anticuerpo, un mimético de anticuerpo el cual se une a un epítipo en la BST1 humana reconocida por un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de la secuencia de aminoácido de la región variable de cadena pesada establecida en la SEC ID NO: 2 y la secuencia de aminoácido de la región variable de cadena ligera establecida en la SEC ID NO: 4; la secuencia de aminoácido de la región variable de cadena pesada establecida en la SEC ID NO: 1 y la secuencia de aminoácido de la región variable de cadena ligera establecida en la SEC ID NO: 3; la secuencia de aminoácido de la región variable de cadena pesada establecida en la SEC ID NO: 52 y la secuencia de aminoácido de la región variable de cadena ligera establecida en la SEC ID NO: 53. En otros aspectos, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo total, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena única, un inmunoconjugado, un anticuerpo des-fucosilado, y un anticuerpo

biespecífico. En otros aspectos de la invención, el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de un UniBody, un anticuerpo de dominio, y un Nanobody. En algunas modalidades, el mimético de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de un Affibody, un DARPin, un Anticalin, un Avimer, un Versabody, y un Duocalin. En otras modalidades, la composición comprende el anticuerpo aislado o porción de unión a antígeno del mismo y un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, la presente invención es una molécula aislada de ácido nucleico que codifica la cadena pesada o ligera del anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo del anticuerpo de la invención, y en otros aspectos pueden incluir un vector de expresión que comprende dichos ácidos nucleicos, y las células huésped que comprenden dichos vectores de expresión.

Otra modalidad de la presente invención es un hibridoma que expresa el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo de cualquiera de los anticuerpos de la invención.

Otros aspectos de la invención están dirigidos a los métodos para hacer anticuerpos de la invención, comprendiendo las etapas de:

- inmunizar un animal con un péptido de BST1;
- recuperar un mARN de las células B de dicho animal;
- convertir dicho mARN en cADN;
- expresar dicho cADN en fagos de modo que los anticuerpos anti-BST1 codificados por dicho cADN están presentes en la superficie de dichos fagos;
- seleccionar los fagos que presentan anticuerpos anti-BST1;
- recuperar las moléculas de ácido nucleico de dichos fagos seleccionados que codifican dichas inmunoglobulinas anti-BST1;

expresar dichas moléculas de ácido nucleico recuperada en una célula huésped; y

recuperar los anticuerpos de dicha célula huésped que se une con la BST1.

En algunos aspectos de la invención, el anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, se une con un epítipo en el polipéptido de BST1 que tiene una secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 44 reconocida por un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido establecida en una SEC ID NO: seleccionada del grupo que consiste de 2, 1 o 52, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido establecida en una SEC ID NO: seleccionada del grupo que consiste de 4, 3 o 53.

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción y los ejemplos que no deberán interpretarse como limitantes. El contenido de todas las referencias, entradas del Genbank, patentes y solicitudes publicadas de patente citadas en toda esta descripción se incorporan aquí expresamente como referencia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1a muestra la alineación de las secuencias de nucleótido de las regiones CDR1 de cadena pesada de A1 (SEC ID NO:21) con los nucleótidos 138392-138424 de la secuencia del nucleótido V_H 1-80 de la línea germinal del ratón (SEC ID NO:33); la alineación de las secuencias de nucleótido de las regiones CDR1 de cadena pesada de A2 (SEC ID NO:22) con los nucleótidos 153362-153394 de la secuencia del nucleótido V_H 1-39 de la línea germinal del ratón (SEC ID NO:35).

La Figura 1b muestra la alineación de las secuencias de nucleótido de las regiones CDR2 de cadena pesada de A1 (SEC ID NO:23) con los nucleótidos 138461-138511 de la secuencia del nucleótido V_H 1-80 de la línea germinal del ratón (SEC ID NO:34); la alineación de las secuencias de nucleótido de las regiones CDR2 de cadena pesada de A2 (SEC ID NO:24) con los nucleótidos 153431-153481 de la secuencia del nucleótido V_H 1-39 de la línea germinal del ratón (SEC ID NO:36).

La Figura 2a muestra la alineación de las secuencias de nucleótido de las regiones CDR1 de cadena ligera de A1 (SEC ID NO:27) con los nucleótidos 496-531 de la secuencia de nucleótido V_K 4-74 de la línea germinal del ratón (SEC ID NO:37); la alineación de las secuencias de nucleótido de las regiones CDR1 de cadena ligera de A2 (SEC ID NO:28) con los nucleótidos 523-552 de la secuencia del nucleótido V_K 4-55 de la línea germinal del ratón (SEC ID NO:40).

La Figura 2b muestra la alineación de las secuencias de nucleótido de las regiones CDR2 de cadena ligera de A1 (SEC ID NO:29) con los nucleótidos 577-597 de la secuencia del nucleótido V_K 4-74 de la línea germinal del ratón (SEC ID NO:38); la alineación de las secuencias de nucleótido de las regiones CDR2 de cadena ligera de A2 (SEC ID NO:30) con los nucleótidos 598-618 de la secuencia del nucleótido V_K 4-55 de la línea germinal del ratón (SEC ID NO:41).

La Figura 2c muestra la alineación de las secuencias de nucleótido de las regiones CDR3 de cadena ligera de A1 (SEC ID NO:31) con los nucleótidos 691-718 de la secuencia del nucleótido V_K 4-74 de la línea germinal del ratón (SEC ID NO:39); la alineación de las secuencias de nucleótido de las regiones CDR3 de cadena ligera de A2 (SEC ID NO:32) con los nucleótidos 715-739 de la secuencia de nucleótido V_K 4-55 de la línea germinal del ratón (SEC ID NO:42).

Las Figuras 3a y 3b muestran los resultados del análisis citométrico de flujo de BST1 en las células A549 y H226.

Las Figuras 4a y 4b muestran la internalización de los anticuerpos monoclonales anti-BST1 mediante las células A549 y H226, usando un ensayo MabZAP.

La Figura 5 muestra la alineación de los residuos 21-137 de la SEC ID NO: 2 (SEC ID NO: 45), humanizados con la cadena VH con las regiones CDR (resaltadas en negrita) de la SEC ID NO: 2 transferida a las correspondientes posiciones de la línea germinal humana BF238102 VH (SEC ID NO: 46), con la línea germinal humana BF238102 VH (SEC ID NO: 47). Los residuos que muestran un contacto significativo con las regiones CDR sustituidas por los correspondientes residuos humanos. Esas sustituciones (subrayadas) se realizaron en posiciones 30, 48, 67, 71 y 100.

La Figura 6 muestra la alineación de los residuos 22-128 de la SEC ID NO: 4 (SEC ID NO: 48), cadena VL humanizada con las regiones CDR (resaltadas en negrita) de la SEC ID NO: 4 transferida a las correspondientes posiciones de la línea germinal humana X72441 VL (SEC ID NO: 49) con la línea germinal humana X72441 VL (SEC ID NO: 50). Los residuos muestran un contacto significativo con las regiones CDR sustituidas para los correspondientes residuos humanos. Una sustitución (subrayada) se realizó en la posición 71.

La Figura 7 muestra la alineación de la región CDR2 de la cadena pesada A2 (SEC ID NO: 12) con las posibles sustituciones de aminoácido (SEC ID NO: 51) sin perder la afinidad de unión a antígeno.

La Figura 8 muestras BST1_A2 y BST1_A2_NF que obtienen una respuesta de citotoxicidad celular dependiente de un anticuerpo (ADCC) en presencia de las células efectoras.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente divulgación se refiere a anticuerpos aislados, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, por ejemplo, los que se unen específicamente a la BST1 con alta afinidad como se perfila aquí. En ciertas modalidades, los anticuerpos proporcionados tienen características estructurales particulares tales como regiones CRD con particulares secuencias de aminoácido. Esta divulgación proporciona anticuerpos aislados (que, como se perfila más adelante, incluye una amplia variedad de estructuras, derivados, miméticos y conjugados bien conocidos), métodos para hacer dichas moléculas, y composiciones farmacéuticas que comprenden dichas moléculas y un portador farmacéutico. Esta divulgación se refiere además a los métodos de uso de las moléculas, de modo que se detecte la BST1, así como al tratamiento de enfermedades asociadas con la expresión de la BST1, tal como la BST1 expresada en tumores y enfermedades inflamatorias, incluyendo las enfermedades de la invención.

Para que la presente divulgación sea más fácilmente entendida, se definen primero ciertos términos. Se establecen definiciones adicionales en toda la descripción detallada.

Los anticuerpos humanizados y de murino de esta divulgación pueden, en ciertos casos, tener una reacción cruzada con la BST1 de especies diferentes a la humana. En ciertas modalidades, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para una o más BST1 humana y pueden no exhibir especies u otros tipos de reactividad cruzada no humana.

El término "respuesta inmune" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células que presentan antígeno, células fagocíticas, granulocitos, y

macromoléculas solubles producidas por las mencionadas células o el hígado (incluyendo anticuerpos, citoquinas, y complementos) que dan como resultado un daño selectivo a, destrucción de, o eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas, o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Una "vía de transducción de señal" se refiere a la relación bioquímica entre varias moléculas de transducción de señal que juegan un papel en la transmisión de una señal desde una porción de una célula hacia otra porción de una célula. Según se usa aquí, la frase "receptor de superficie celular" incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y la transmisión de dicha señal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un "receptor de superficie celular" es la BST1.

El término "anticuerpo" según se refiere aquí incluye, como mínimo, un fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") de una inmunoglobulina.

La definición de "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de una única cadena, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (algunas veces referidos aquí como "miméticos de anticuerpo"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpo (algunas veces referidos como "conjugados de anticuerpo") y fragmentos y/o derivados de cada uno, respectivamente. En general, un anticuerpo de longitud completa (algunas veces referido aquí como "anticuerpos totales") se refiere a una glicoproteína que puede comprender por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces de disulfuro. Cada cadena

pesada está comprendida de una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está comprendida de tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera está comprendida de una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como V_L o V_K) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida de un dominio, C_L . Las regiones de V_H y V_L/V_K pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, denominadas región determinante de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Cada V_H y V_L/V_K está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el extremo terminal amino al extremo terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina con los tejidos huésped o factores, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, las células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico de complemento.

En una modalidad, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo específico incluyen, pero no se limitan a, (i) el fragmento Fab que consiste de dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} , (ii) el fragmento Fd que consiste de los dominios V_H y C_{H1} , (iii) el fragmento Fv que consiste de los dominios V_L y V_H de un único anticuerpo, (iv) el fragmento dAb, que consiste de un único dominio variable, (v) regiones aisladas CDR, (vi) fragmentos $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vii) moléculas Fv de una sola cadena (scFv), en donde un dominio V_H y un dominio V_L están enlazados mediante un enlazador peptídico el cual permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno, (viii) dímeros biespecíficos Fv de una sola cadena, y (ix) "diabodies" o "triabodies", fragmentos multivalentes o

multiespecíficos contruidos mediante fusión génica. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser modificados. Por ejemplo, las moléculas pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes de disulfuro enlazando los dominios V_H y V_L . Ejemplos de formatos y arquitecturas de anticuerpos se describen en Holliger & Hudson (2006) *Nature Biotechnology* 23(9):1126-1136, y Carter (2006) *Nature Reviews Immunology* 6:343-357, y las referencias allí citadas, todas expresamente incorporadas como referencia.

La presente divulgación proporciona análogos de anticuerpo. Dichos análogos pueden comprender una variedad de estructuras, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (algunas veces referidos aquí como "miméticos de anticuerpo"), fusiones de anticuerpo, conjugados de anticuerpo, y fragmentos de cada uno, respectivamente.

En una modalidad, la inmunoglobulina comprende un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo específico incluyen, pero sin limitación a (i) el fragmento Fab que consiste de dominios V_L , V_H , C_L y C_H1 , (ii) el fragmento F_d consiste de dominios V_H y C_H1 , (iii) el fragmento F_v que consiste de los dominios V_L y V_H de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb , el cual consiste de una única variable, (v) regiones aisladas CDR, (vi) fragmentos $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vii) moléculas F_v de una sola cadena (scF_v), en donde un dominio V_H y un dominio V_L están enlazados por un enlazador peptídico el cual permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno, (viii) dímeros biespecíficos F_v de una sola cadena, y (ix) "diabodies" o "triabodies", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos mediante fusión génica. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser modificados. Por ejemplo, las moléculas

pueden ser estabilizadas mediante la incorporación de puentes de disulfuro que enlazan los dominios VH y VL. Ejemplos de formatos y arquitecturas de anticuerpo se describen en Holliger & Hudson, 2006, *Nature Biotechnology* 23(9):1126-1136, y Carter 2006, *Nature Reviews Immunology* 6:343-357 y las referencias allí citadas, todas expresamente incorporadas como referencia.

Los genes de inmunoglobulina reconocidos, por ejemplo en humanos, incluyen loci genéticos de kappa (κ), lambda (λ), y de cadena pesada, que juntos comprenden los genes de región variable de miriada, y los genes de región constante mu (μ), delta (δ), gamma (γ), sigma (σ), y alfa (α) los cuales codifican los isótopos IgM, IgD, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4), IgE, y IgA (IgA1 y IgA2) respectivamente.

Un anticuerpo aquí incluye anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpo, y puede referirse a un anticuerpo natural de cualquier organismo, un anticuerpo diseñado, o un anticuerpo generado de manera recombinante para fines experimentales, terapéuticos u otros.

En una modalidad, un anticuerpo aquí divulgado puede ser un anticuerpo multiespecífico, y principalmente un anticuerpo biespecífico, algunas veces referidos como "diabodies". Estos son anticuerpos que unen dos (o más) antígenos diferentes. Los diabodies pueden ser fabricados en una variedad de formas conocidas en la técnica, por ejemplo químicamente preparados o a partir de hibridomas híbridos. En una modalidad, el anticuerpo es un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas minimizadas similares a anticuerpos que comprenden una scFv unida a un dominio C_H3. En algunos casos, la scFv puede unirse a la región Fc, y puede incluir algunas o todas las regiones bisagra. Para una descripción de anticuerpos multiespecíficos, ver Holliger y Hudson (2006) *Nature*

Biotechnology 23(9):1126-1136 y las referencias allí citadas, todas expresamente incorporadas como referencia.

Mediante "CDR" como se usa aquí se refiere a una "región determinante de la complementariedad" de una dominio variable de anticuerpo. La identificación sistemática de los residuos incluidos en las CDRs se ha desarrollado mediante Kabat (Kabat et al. (1991) *Secuencias of Proteins of Immunological Interest*, 5ta. Edición, United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda) y alternativamente en Chothia [Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Chothia et al. (1989) *Nature* 342: 877-883; Al-Lazikani et al. (1997) *J. ol. Biol.* 273: 927-948]. Para los propósitos de la presente invención, las CDRs se definen como un grupo de residuos ligeramente más chico que las CDRs definidas por Chothia. Las V_L CDRs se definen aquí para incluir residuos en posiciones 27-32 (CDR1), 50-56 (CDR2), y 91-97 (CDR3), en donde la numeración es de acuerdo a Chothia. Debido a que las V_L CDRs según se define en Chothia y Kabat son idénticas, la numeración de estas posiciones V_L CDR también está de acuerdo con Kabat. Las V_H CDRs se definen aquí para incluir residuos en posiciones 27-33 (CDR1), 52-56 (CDR2), y 95-102 (CDR3), en donde la numeración está de acuerdo con Chothia. Esas posiciones V_H CDR corresponden a las posiciones de Kabat 27-35 (CDR1), 52-56 (CDR2), y 95-102 (CDR3).

Como podrán apreciar los entendidos en la técnica, las CDRs aquí divulgadas también pueden incluir, por ejemplo, cuando hay retromutación de las CDRs divulgadas aquí en diferentes regiones de marco. Por lo general, la identidad del ácido nucleico entre las variantes individuales CDRs es por lo menos 80% con las secuencias aquí representadas, y más típicamente con identidades preferentemente crecientes de por lo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y casi 100%. De una manera similar, la "identidad porcentual (%) de la secuencia del ácido nucleico" con respecto a la secuencia del

ácido nucleico de las proteínas de unión aquí identificadas se define como el porcentaje de los residuos de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de nucleótido en la secuencia de codificación de la proteína de unión a antígeno. Un método específico utiliza el módulo BLASTN del grupo WU-BLAST-2 para los parámetros por defecto, con un grupo de espacio de solapamiento y fracción de solapamiento a 1 y 0.125, respectivamente y no se seleccionaron filtros.

Por lo general, la identidad de la secuencia de ácido nucleico entre las secuencias de nucleótido que codifican las CDRs de variantes individuales y las secuencias aquí representadas son por lo menos 80%, y más típicamente con identidades preferentemente crecientes de por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% y casi 100%.

De este modo, una "CDR variante" es aquella con una homología especificada, de manera similar, o identidad a la CDR original de la invención, y comparte una función biológica, incluyendo, pero sin limitación, por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de la especificidad y/o la actividad de la CDR original.

Si bien el sitio o región para introducir una variación de la secuencia de aminoácido está predeterminado, la mutación per se no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se puede conducir una mutagénesis aleatoria en el codón diana o región y se tamizan las variantes de CDR de la proteína de unión a antígeno expresadas para la combinación óptima de la actividad deseada. Las técnicas para hacer las mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en el ADN que

tiene una secuencia conocida son bien conocidas, por ejemplo mutagénesis de cebador M13 y la mutagénesis por PCR. El tamizado de los mutantes se hace usando ensayos de actividades de proteína de unión a antígeno como se describe aquí.

Las sustituciones de aminoácido son típicamente de residuos únicos; las inserciones usualmente estarán en el orden de aproximadamente uno (1) a aproximadamente veinte (20) residuos de aminoácido, aunque se pueden tolerar inserciones considerablemente más grandes. Las eliminaciones fluctúan desde alrededor de uno (1) a aproximadamente veinte (20) residuos de aminoácido, aunque en algunos casos las eliminaciones pueden ser mucho más grandes.

Las sustituciones, eliminaciones, inserciones o cualquier combinación de los mismos se pueden usar para llegar a un derivado o variante final. Por lo general esos cambios se realizan en pocos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula, particularmente la inmunogenicidad y la especificidad de la proteína de unión a antígeno. Sin embargo, se pueden tolerar cambios más grandes en ciertas circunstancias.

Por "Fab" o "región Fab", según se usa aquí se refiere al polipéptido que comprende los dominios de inmunoglobulina V_H , C_H1 , V_L , y C_L . La Fab puede referirse a esta región en aislamiento, o esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa, el fragmento de anticuerpo o la proteína de fusión Fab, o cualquiera de las otras modalidades del anticuerpo como se representa aquí.

Por "Fv" o "fragmento Fv" o "región Fv", según se usa aquí se refiere a un polipéptido que comprende los dominios V_L y V_H de un único anticuerpo.

Por “marco”, según se usa aquí, se refiere a la región de un dominio variable de un anticuerpo exclusivo de aquellas regiones definidos como CDRs. Cada marco de dominio variable de anticuerpo puede estar además subdividido en las regiones contiguas separadas por las CDRs (FR1, FR2, FR3 y FR4).

El término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “porción de anticuerpo”), según se usa aquí, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conserva la capacidad para unirse con un antígeno (por ejemplo BST1). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados en el término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios V_L / V_K , V_H , C_L y C_H1 ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente de disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fab', que es esencialmente un Fab con parte de la región de bisagra (ver, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3.sup.rd ed. 1993); (iv) un fragmento Fd que consiste de los dominios V_H y C_H1 ; (v) un fragmento Fv que consiste de los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo; (vi) un fragmento dAb [Ward *et al.* (1989) *Nature* 341:544-546], el cual consiste de un dominio V_H ; (vii) una región determinante de la complementariedad aislada (CDR); y (viii) un Nanobody, una región variable de cadena pesada que contiene un único dominio variable y dos dominios constantes. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L / V_K y V_H , están codificados por genes separados, estos se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permita que se hagan en forma de una cadena de una sola proteína en la que el par de regiones V_L / V_K y V_H formen moléculas monovalentes (conocidas como Fv de una sola cadena (scFv); ver por ejemplo Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883. Dichos anticuerpos de una

sola cadena también están destinados a ser abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los entendidos en la técnica, y los fragmentos son tamizados para utilidad de la misma manera como lo son los anticuerpos intactos.

Un "anticuerpo aislado" según se usa aquí, está destinado a referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo un anticuerpo aislado que se une específicamente con la BST1 está sustancialmente libre de anticuerpos que unen específicamente a los antígenos diferentes a la BST1). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la BST1 puede, sin embargo, tener una reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de BST1 de otras especies. Además, y/o alternativamente un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos, que está en una forma que no se encuentra normalmente en la naturaleza.

En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención son proteínas recombinantes, proteínas aisladas o proteínas sustancialmente puras. Una proteína "aislada" no está acompañada de por lo menos algo del material con el que se asocia normalmente en su estado natural, por ejemplo constituyendo por lo menos aproximadamente 5%, o por lo menos aproximadamente 50% por peso de la proteína total en un ejemplo dado. Se entiende que la proteína aislada puede constituir de 5 a 99.9% por peso del contenido total de proteína dependiendo de las circunstancias. Por ejemplo, la proteína puede hacerse a una concentración significativamente más alta mediante el uso de un promotor inducible o un promotor de expresión alta, de modo que la proteína se hace a niveles de concentración creciente. En el caso de las proteínas recombinantes, la definición incluye la producción de un anticuerpo en una amplia variedad de

organismos y/o células huésped que son conocidas en la técnica en la que no se producen de manera natural.

Los términos “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” según se usa aquí, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición molecular. Una composición de anticuerpo monoclonal una especificidad de unión única y afinidad para un epítipo particular. Según se usa aquí, un “anticuerpo policlonal” se refiere a anticuerpos producidos mediante varios clones de B-linfocitos como sería el caso en un animal entero.

Según se usa aquí, “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo IgM o IgG) que se codifica mediante los genes de la región constante de cadena pesada.

Las frases “un anticuerpo que reconoce a un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se usan de manera intercambiable aquí con el término “un anticuerpo que se une específicamente con un antígeno”.

El término “derivados de anticuerpo” se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo, por ejemplo un conjugado (generalmente un enlace químico) del anticuerpo y otro agente o anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden ser conjugados a agentes, incluyendo, pero sin limitación, polímeros (por ejemplo PEG) toxinas, rótulos, etc. como se describe de manera más completa a continuación. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser no humanos, quiméricos, humanizados, o completamente humanos. Para una descripción de los conceptos de anticuerpos quiméricos y humanizados, ver Clark *et al.* (2000) y las referencias allí citadas (Clark, 2000, *Immunol Today* 21:397-402). Los anticuerpos quiméricos comprenden la región variable de un anticuerpo no humano, por ejemplo los dominios V_H y V_L de ratón u origen de rata,

operativamente enlazados con la región constante de un anticuerpo humano (ver por ejemplo la Patente Estadounidense No. 4,816,567). En una modalidad preferida, los anticuerpos de la presente invención son humanizados. Por anticuerpo "humanizado", según se usa aquí, se refiere a un anticuerpo que comprende una región de marco (FR) y una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR's) de un anticuerpo no humano (usualmente ratón o rata). El anticuerpo no humano que proporciona las CDR's se denomina el "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina el "aceptor". La humanización radica principalmente en el injerto de las CDRs donantes en los marcos aceptores (humano) V_L y V_H (Patente Estadounidense No, 5,225,539). Esta estrategia está referida como "injerto de CDR". La "retromutación" de los residuos del marco aceptor seleccionado a los correspondientes residuos donantes se requiere a menudo para recuperar la afinidad que se pierde en la construcción injertada inicial (US 5,530,101; US 5,585,089; US 5,693,761; US 5,693,762; US 6,180,370; US 5,859,205; US 5,821,337; US 6,054,297; US 6,407,213). El anticuerpo humanizado comprenderá además de manera óptima por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana, y de este modo comprenderá típicamente una región Fc humana. Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica, y se pueden poner en funcionamiento siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-329; Verhoeven *et al.* (1988) *Science*, 239:1534-1536]. Los ejemplos adicionales anticuerpos monoclonales de murino humanizados también son conocidos en la técnica, por ejemplo anticuerpos que unen una proteína humana C (O'Connor *et al.*, 1998, *Protein Eng* 11:321-8), receptor de 2-interleuc [Queen *et al.* (1989) *Proc Natl Acad Sci*, USA 86:10029-33], y un receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 [Carter *et al.* (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4285-9]. En una modalidad alternativa, los anticuerpos de la presente invención pueden ser completamente

humanos. Una serie de métodos son conocidos en la técnica para generar anticuerpos completamente humanos, incluyendo el uso de ratones transgénicos [Bruggemann *et al.* (1997) *Curr Opin Biotechnol* 8:455-458] o bibliotecas de anticuerpo humano acopladas con los métodos de selección [Griffiths *et al.* (1998) *Curr Opin Biotechnol* 9:102-108].

El término “anticuerpo humanizado” está destinado a incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en las secuencias de marco humano. Modificaciones adicionales de la región de marco pueden hacerse en las secuencias de marco humano, tal como las modificaciones de amino ácido del dominio Fc, como se describe aquí.

El término “anticuerpo quimérico” está destinado a referirse a los anticuerpos en los que las secuencias de región variable se derivan de una especie y las secuencias de región constante se derivan de otras especies, tal como un anticuerpo en el que las secuencias de región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de región constante se derivan de un anticuerpo humano.

El término “se une específicamente” (o “se une inmuno-específicamente” no está destinado a indicar que un anticuerpo se une exclusivamente a su diana destinada, aunque en muchas modalidades esto será verdad; esto es, un anticuerpo “se une específicamente” a su diana y no se une de manera detectable o sustancial con otros componentes en la muestra, célula o paciente. Sin embargo, en algunas modalidades, un anticuerpo “se une específicamente” si su afinidad para su diana destinada es aproximadamente 5 veces mayor cuando se compara con su afinidad para una molécula no diana. De manera conveniente no hay una reacción cruzada o unión cruzada significativa

con las sustancias no deseadas, especialmente las proteínas o tejidos que se presentan de manera natural de una persona o animal saludable. La afinidad del anticuerpo será, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 5 veces, tal como 10 veces, tal como 25 veces, especialmente 50 veces, y particularmente 100 veces o más, mayor para una molécula diana que su afinidad para una molécula no diana. En algunas modalidades, la unión específica entre un anticuerpo u otro agente de unión y un antígeno significa una afinidad de unión de por lo menos 10^6 M^{-1} . Los anticuerpos pueden, por ejemplo, unirse con afinidades de por lo menos aproximadamente 10^7 M^{-1} , tal como entre aproximadamente 10^8 M^{-1} a aproximadamente 10^9 M^{-1} , aproximadamente 10^9 M^{-1} a aproximadamente 10^{10} M^{-1} , o aproximadamente 10^{10} M^{-1} a aproximadamente 10^{11} M^{-1} . Los anticuerpos pueden, por ejemplo, unirse con una EC_{50} de 50 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 100 pM o menos, o más preferentemente 10 pM o menos.

El término "no se une sustancialmente" a una proteína o células, según se usa aquí, significa que no se une o no se une con una alta afinidad a la proteína o células, es decir, se une a la proteína o células con un K_D de $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ o más, más preferentemente $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ o más, más preferentemente $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ o más, más preferentemente $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ o más, incluso más preferentemente $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ o más.

El término " EC_{50} ", según se usa aquí, está destinado a referirse a la potencia de un compuesto cuantificando la concentración que lleva al 50% de respuesta/efecto máximo. La EC_{50} puede ser determinada mediante Scratchard o FACS.

El término " K_{assoc} " o " K_a ", según se usa aquí, está destinado a referirse a la velocidad de asociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno, mientras que el término " K_{dis} " o " K_d ", según se usa aquí, está destinado a referirse

a la velocidad de disociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno. El término " K_D ", según se usa aquí, está destinado a referirse a la constante de afinidad, la cual se obtiene de la proporción de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores K_D para los anticuerpos se pueden determinar usando métodos bien establecidos en la técnica. Un método preferido para determinar la K_D de un anticuerpo es mediante el uso de resonancia de plasmón superficial, el uso de preferentemente un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

Según se usa aquí, el término "alta afinidad" para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 1×10^{-7} M o menos, más preferentemente 5×10^{-8} M o menos, incluso más preferentemente 1×10^{-8} M o menos, incluso más preferentemente 5×10^{-9} M o menos e incluso más preferentemente 1×10^{-9} M o menos para un antígeno diana. Sin embargo, una unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpo. Por ejemplo, una unión de "alta afinidad" para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-6} M o menos, más preferentemente 10^{-7} M o menos, incluso más preferentemente 10^{-8} M o menos.

El término "epítipo" o "determinante de antígeno" se refiere a un sitio en un antígeno al cual se une especialmente una inmunoglobulina o anticuerpo. Los epítipos se pueden formar tanto de aminoácido contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por un plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos son típicamente retenidos con la exposición a solventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por un plegamiento terciario son típicamente perdidos en el tratamiento con solventes desnaturizantes. Un epítipo incluye típicamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una única conformación espacial. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítipos incluyen

técnicas en el arte y los descritos aquí, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones [ver, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)].

En consecuencia, la presente invención también abarca anticuerpos que se unen a (es decir reconocen) el mismo epítipo como los anticuerpos aquí descritos (es decir BST1_A2, BST1_A1 y BST1_A3). Los anticuerpos que se enlazan con el mismo epítipo se pueden identificar mediante su capacidad para competir en forma cruzada con (es decir inhibir competitivamente la unión de) un anticuerpo de referencia con un antígeno diana de una manera estadísticamente significativa. La inhibición competitiva puede presentarse, por ejemplo, si los anticuerpos se unen con epítopos idénticos o estructuralmente similares (por ejemplo epítopos superpuestos), o epítopos espacialmente proximales, cuando se unen, causan un impedimento estérico entre los anticuerpos.

La inhibición competitiva puede determinarse usando ensayos de rutina en los que la inmunoglobulina bajo examen inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia con un antígeno común. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto de fase sólida, inmunoensayo enzimático directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo de competición sándwich [ver Stahl *et al.* (1983) *Methods in Enzymology* 9:242]; biotin-avidin EIA directo de fase sólida [ver Kirkland *et al.* (1986) *J. Immunol.* 137:3614]; ensayo rotulado directo de fase sólida, ensayo sándwich rotulado de fase sólida [ver Harlow y Lane (1988) *Anticuerpos: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press]; RIA de rótulo directo de fase sólida usando rótulo I-125 [ver Morel *et al.* (1988) *Mol. Immunol.* 25(1):7]; biotin-avidin EIA directo de fase sólida [Cheung *et al.* (1990) *Virology* 176:546]; y RIA rotulada directa. [Moldenhauer *et al.* (1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77]. Típicamente, dicho

ensayo comprende el uso de un antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que portan cualquiera de estos, una inmunoglobulina de prueba no rotulada y una inmunoglobulina de referencia rotulada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de rótulo unido a la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Usualmente la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Usualmente, cuando un anticuerpo competidor está presente en exceso, este inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia con un antígeno común en por lo menos 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% 70-75% o más.

Otras técnicas incluyen, por ejemplo, métodos de mapeo de epítomos, tales como análisis de rayos x de cristales de complejos antígeno:anticuerpo que proporcionan una resolución atómica del epítomo. Otros métodos monitorean la unión del anticuerpo con los fragmentos de antígeno o las variaciones mutadas del antígeno cuando la pérdida de unión debido a una modificación de un residuo de aminoácido dentro de la secuencia de antígeno es a menudo considerada una indicación de un componente de epítomo. Además, también se pueden usar los métodos combinatorios computacionales para el mapeo del epítomo. Esos métodos se basan en la capacidad del anticuerpo de interés para la afinidad de péptidos cortos específicos aislados a partir de bibliotecas de péptido que muestran un fago combinatorio. Los péptidos son luego considerados como guías para la definición del epítomo correspondiente con el anticuerpo usado para tamizar la biblioteca de péptido. Para el mapeo del epítomo, también se han desarrollado algoritmos computacionales, los cuales han demostrado mapear epítomos discontinuos conformacionales.

Según se usa aquí, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye vertebrados, por ejemplo,

mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Diversos aspectos de la divulgación se describen más detalladamente en las siguientes sub-secciones.

Anticuerpos Anti-BST1

Los anticuerpos de la invención se caracterizan por características o propiedades funcionales particulares de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se unen específicamente a la BST1 humana. Preferentemente, un anticuerpo de la invención se une con la BST1 con alta afinidad, por ejemplo, con una K_D de 8×10^{-7} o menos, incluso más típicamente 1×10^{-8} M o menos. Los anticuerpos anti-BST1 de la invención presentan preferentemente una o más de las siguientes características, presentando los anticuerpos ambas que encuentran un uso particular:

se unen a la BST1 humana con una EC_{50} de 50 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 100 pM o menos, o más preferentemente 10 pM o menos;

se unen a las células humanas que expresan la BST1.

En una modalidad, los anticuerpos se unen preferentemente a un epítipo antigénico presente en la BST1, cuyo epítipo no está presente en otras proteínas. Preferentemente, los anticuerpos no se unen con las proteínas relacionadas, por ejemplo, los anticuerpos no se unen sustancialmente con otras moléculas de adhesión celular. En una modalidad, el anticuerpo puede ser internalizado en una célula que expresa la BST1. Los ensayos estándar para evaluar la internalización del anticuerpo son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ensayos de internalización MabZap o HumZap.

Los ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos hacia la BST1 pueden hacerse a nivel de la proteína o celular y son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ELISAs, Western blots, RIAs,

ensayos BIAcore® y análisis de citometría de flujo. Los ensayos adecuados se describen en detalle en los Ejemplos. La cinética de unión (por ejemplo, afinidad de unión) de los anticuerpos también se puede evaluar mediante ensayos estándar conocidos en la técnica, tal como mediante análisis del sistema BIAcore®. Para evaluar la unión a las células tumorales B de Raji o Daudi, células Raji (ATCC Depósito No. CCL-86) o Daudi (ATCC Depósito No. CCL-213) se pueden obtener de las fuentes públicamente disponibles, tales como la American Type Culture Collection, y usar en ensayos estándar, tal como análisis citométrico de flujo.

Anticuerpos Monoclonales de la Invención

Los anticuerpos preferidos de la invención son los anticuerpos monoclonales BST1_A2 y BST1_A1 aislados y estructuralmente caracterizados como se describe en los Ejemplos 1-4. Las secuencias de aminoácido V_H BST1_A2, BST1_A1 y BST1_A3 se muestran en la SEC ID NOs: 2, 1 y 52, respectivamente. Las secuencias de aminoácido V_K BST1_A2, BST1_A1 y BST1_A3 se muestran en la SEC ID NOs: 4, 3 y 53, respectivamente.

Dado que cada uno de estos anticuerpos se puede unir a la BST1, las secuencias V_H y V_K se pueden “mezclar y emparejar” para crear otras moléculas de unión a anti-BST1 de la invención. La unión de la BST1 de dichos anticuerpos “mezclados y emparejados” se puede examinar usando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los Ejemplos (por ejemplo ELISAs). Preferentemente, cuando las cadenas V_H y V_K se mezclan y emparejan, una secuencia V_H de un emparejamiento V_H/V_K particular se reemplaza con una secuencia V_H estructuralmente similar. Asimismo, preferentemente una secuencia V_K de un emparejamiento V_H/V_K particular se reemplaza con una secuencia V_K estructuralmente similar.

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo, que comprende: una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido establecida en una SEC ID NO: seleccionada del grupo que consiste de 2, 1 y 52 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido establecida en una SEC ID NO: seleccionada del grupo que consiste de 4, 3 y 53; en donde el anticuerpo se une específicamente con la BST1, preferentemente la BST1 humana.

Las combinaciones preferidas de cadena pesada y ligera incluyen:

- una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 4; o
- una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 3; o
- una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 52 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 53.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden la cadena pesada y cadena ligera CDR1s, CDR2s y CDR3s de BST1_A2, BST1_A1 y BST1_A3, o combinaciones de los mismos. Las secuencias de aminoácido de las V_H CDR1s de BST1_A2, BST1_A1 y BST1_A3 se muestran en la SEC ID NOs: 10, 9 y 56, respectivamente. Las secuencias de aminoácido de las V_H CDR2s de BST1_A2, BST1_A1 y BST1_A3 se muestran en la SEC ID NOs: 12 o 51, 11 y 57, respectivamente. Las secuencias de aminoácido de las V_H CDR3s de BST1_A2, BST1_A1 y BST1_A3 se muestran en las SEC ID NOs: 14, 13 y 58, respectivamente. Las secuencias de aminoácido de las V_K CDR1s de BST1_A2,

BST1_A1 y BST1_A3 se muestran en las SEC ID NOs: 16, 15 y 59, respectivamente. Las secuencias de aminoácido de las V_K CDR2s de BST1_A2, BST1_A1 y BST1_A3 se muestran en las SEC ID NOs: 18, 17 y 60, respectivamente. Las secuencias de aminoácido de las V_K CDR3s de BST1_A2, BST1_A1 y BST1_A3 se muestran en las SEC ID NOs: 20, 19 y 61, respectivamente. Las regiones CDR son delineadas usando el sistema Kabat [Kabat, E. A. *et al.* (1991) *Secuencias of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, US Department of Health y Human Services, NIH Publication No. 91-3242].

Dado que cada uno de estos anticuerpos se puede unir a la BST1 y que la especificidad de unión a antígeno se proporciona principalmente por las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, las secuencias V_H CDR1, CDR2, y CDR3 y las secuencias V_K CDR1, CDR2, y CDR3 se pueden “mezclar y emparejar” (es decir, las CDRs de diferentes anticuerpos se pueden mezclar y emparejar, aunque cada anticuerpo contiene por lo general una V_H CDR1, CDR2, y CDR3 y una V_K CDR1, CDR2, y CDR3) para crear otras moléculas de unión a anti-BST1 de la invención. En consecuencia, la invención incluye específicamente toda combinación posible de las CDRs de las cadenas pesada y ligera.

La unión de BST1 de dichos anticuerpos “mezclados y emparejados” puede examinarse usando los ensayos de unión anteriormente descritos y en los Ejemplos (por ejemplo, ELISAs, análisis Biacore®). Preferentemente, cuando las secuencias V_H CDR se mezclan y emparejan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 a partir de una secuencia particular V_H se reemplaza con una(s) secuencia(s) CDR estructuralmente similar. Asimismo, cuando las secuencias V_K CDR se mezclan y emparejan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 a partir de una secuencia V_K particular se reemplaza preferentemente con una(s) secuencia(s) CDR estructuralmente similar. Será fácilmente evidente para el

experto común en la técnica que las secuencias novedosas V_H y V_K pueden ser creadas sustituyendo una o más secuencias de la región CDR V_H y/o las secuencias de la región CDR V_L / V_K con secuencias estructuralmente similares de las secuencias CDR divulgadas aquí para los anticuerpos monoclonales BST1_A2, BST1_A1 y BST1_A3.

En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo comprendiendo: una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOs : 10, 9 y 56; una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 12 o 51, 11 y 57;

una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 14, 13 y 58;

una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 16, 15 y 59;

una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 18, 17 y 60;

y

a región variable de cadena ligera CDR3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 20, 19 y 61;

con todas las posibles combinaciones que sean posibles, en donde el anticuerpo se une específicamente con la BST1, preferentemente la BST1 humana.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo tiene:

una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID NO: 10;

una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID NO: 12 o SEC ID NO: 51;

una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID NO: 14; y

una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID NO: 16;

una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID NO: 18;

una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID NO: 20.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo tiene:

una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID NO: 9;

una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID NO: 11;

una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID NO: 13; y

una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID NO: 15;

una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID NO: 17;

una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID NO: 19.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo tiene:

una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID NO: 56;

una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID NO: 57;

una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID NO: 58; y

una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID NO: 59;

una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID NO: 60;

una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID NO: 61.

Es bien conocido en la técnica que el dominio CDR3, independientemente de los dominios CDR1 y/o CDR2, puede determinar solo la especificidad de unión de un anticuerpo para un antígeno cognado y que los múltiples anticuerpos pueden ser generados de manera predecible teniendo la misma especificidad de unión en base a una secuencia común CDR3. Ver, por ejemplo, Klimka *et al.* (2000) *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (que describe la producción de un anticuerpo anti-CD30 humanizado usando solamente el dominio variable CDR3 de cadena pesada de anticuerpo anti-CD30 murino Ki-4); Beiboer *et al.* (2000) *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (que describe los anticuerpos recombinantes de glicoproteína-2 epitelial (EGP-2) usando solamente la secuencia CDR3 de cadena pesada del murino parental MOC-31 anticuerpo anti-EGP-2); Rader *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:8910-8915 (que describe un panel de anticuerpos humanizados anti-integrina $\alpha_v\beta_3$ usando un dominio CDR3 variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo LM609 de murino anti-integrina $\alpha_v\beta_3$, en donde cada anticuerpo miembro comprende una secuencia distinta fuera del dominio CDR3 y capaz de unir el mismo epítipo como el anticuerpo de murino original con afinidades tan altas o más altas que el anticuerpo de murino original); Barbas *et al.* (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (que divulga que dominio CDR3 proporciona la contribución más significativa para la unión del antígeno); Barbas *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:2529-2533 (que describe el injerto de las

secuencias CDR3 de cadena pesada de los tres Fabs (SI-1, SI-40, y SI-32) contra el ADN placentario humano en la cadena pesada de un Fab toxoide antitetánico reemplazando de este modo la CDR3 de cadena pesada existente y demostrando que el dominio de CDR3 solo confirió la especificidad de unión); y Ditzel *et al.* (1996) *J. Immunol.* 157:739-749 (que describe estudios de injerto en donde la transferencia de solamente la CDR3 de cadena pesada de un Fab LNA3 original poliespecífico a la cadena pesada de un anticuerpo Fab p313 de unión toxoide tétano monoespecífico IgG fue suficiente para conservar la especificidad de unión del Fab original). Cada una de estas referencias se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

En consecuencia, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo derivado de un animal humano o no humano, en donde el anticuerpo monoclonal es capaz de unirse específicamente con la BST1. En ciertos aspectos, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de ratón o rata, en donde el anticuerpo monoclonal es capaz de unirse específicamente con la BST1. En algunas modalidades, dichos anticuerpos inventivos que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo no humano (a) son capaces de competir para unirse con; (b) conservan las características funcionales; (c) se unen al mismo epítipo; y/o (d) tienen una afinidad de unión similar que el correspondiente anticuerpo no humano parental.

En otros aspectos, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo humano, de modo que, por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido de un animal no humano, en donde el anticuerpo humano es capaz de

unirse específicamente a la BST1. En otros aspectos, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un primer anticuerpo humano, tal como, por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido de un animal no humano, en donde el primer anticuerpo humano es capaz de unirse específicamente con la BST1 y en donde el dominio CDR3 del primer anticuerpo humano reemplaza un dominio CDR3 en un anticuerpo humano que carece de especificidad de unión para la BST1 para generar un segundo anticuerpo humano que es capaz de unirse específicamente con la BST1. En algunas modalidades, dichos anticuerpos inventivos que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un primer anticuerpo humano (a) son capaces de competir para unirse con; (b) conservan las características funcionales; (c) unirse con el mismo epítipo; y/o (d) tienen una afinidad de unión similar como el correspondiente primer anticuerpo humano parental.

Anticuerpos que tienen Secuencias Particulares de la Línea Germinal

En ciertas modalidades, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada a partir de un gen particular de inmunoglobulina de cadena pesada de línea germinal y/o una región variable de cadena ligera de un gen particular de inmunoglobulina de cadena ligera de línea germinal.

Por ejemplo, en una modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión de antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o se deriva de un gen murino V_H 1-39, gen murino V_H 1-80 o un gen murino V_H 69-1, en donde el anticuerpo se une específicamente con la BTS1. Incluso en otra modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable

de cadena ligera que es el producto de o se deriva de un gen murino V_K 4-55, gen murino V_K 4-74 o un gen murino V_K 44-1, en donde el anticuerpo se une específicamente con la BST1.

En incluso otra modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo:

comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o se deriva de un gen murino V_H 1-39 (cuyo gen incluye la secuencia de nucleótido establecida en las SEC ID NOs: 35 y 36); comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o se deriva de un gen murino V_K 4-55 (cuyo gen incluye las secuencias de nucleótido establecidas en las SEC ID NOs: 40, 41 y 42); y se une específicamente a la BST1, preferentemente la BST1 humana. Los ejemplos de anticuerpos que tienen genes V_H 1-39 y V_K 4-55, con las secuencias anteriormente descritas, son BST1_A2.

En incluso otra modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de antígeno del mismo, en donde el anticuerpo:

comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o se deriva de un gen murino V_H 1-80 (cuyo gen incluye la secuencia de nucleótido establecida en las SEC ID NOs: 33 y 34);

comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o se deriva de un gen murino V_K 4-74 (cuyo gen incluye las secuencias de nucleótido establecidas en las SEC ID NOs: 37, 38 y 39); y se une específicamente con la BST1, preferentemente la BST1 humana. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene genes V_H 1-80 y V_K 4-74, con las secuencias anteriormente descritas, es BST1_A1.

En incluso otra modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo:

comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o se deriva de un gen murino V_H 69-1 (cuyo gen incluye la secuencia del nucleótido establecida en las SEC ID NOs: 68 y 69);

comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o se deriva de un gen murino V_K 44-1 (cuyo gen incluye las secuencias de nucleótido establecidas en las SEC ID NOs: 70, 71 y 72); y se une específicamente a la ST1, preferentemente la BST1 humana. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene genes V_H y V_K, con las secuencias anteriormente descritas, es BST1_A3.

Según se usa aquí, un anticuerpo comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia particular de línea germinal si las regiones variables del anticuerpo se obtienen a partir de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de línea germinal de murino. Dicho sistemas incluyen tamizar una biblioteca de gen de inmunoglobulina de murino mostrada en un fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal de murino se puede definir como tal comparando las secuencia de nucleótido o aminoácido del anticuerpo con las secuencias de nucleótido o aminoácido de las inmunoglobulinas de línea germinal de murino y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal de murino que es la más cercana en la secuencia (es decir la mayor identidad porcentual) a la secuencia del anticuerpo. Un anticuerpo que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal de murino puede contener diferencias de aminoácido en comparación con la secuencia de línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas que se presentan de manera natural o introducción intencional de una mutación dirigida al sitio. Sin embargo, un

anticuerpo seleccionado es típicamente por lo menos 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácido codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal de murino y contiene residuos de aminoácido que identifican al anticuerpo como murino cuando se compara con las secuencias de aminoácido de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal humana). En ciertos casos, un anticuerpo puede ser por lo menos 95%, o incluso por lo menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico en secuencia de aminoácido a la secuencia de aminoácido codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo derivado de una secuencia particular de línea germinal de murino presentará no más de 10 diferencias de aminoácido de la secuencia de aminoácido codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal de murino. En ciertos casos, el anticuerpo puede presentar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencia de aminoácido codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

Anticuerpos Homólogos

En incluso en otra modalidad, un anticuerpo de la invención comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprende secuencias de aminoácido que son homólogas a las secuencias de aminoácido de los anticuerpos preferidos aquí descritos, y en donde los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-BST1 de la invención.

Por ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, comprendiendo una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde: la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácido que es por lo menos 80% idéntica a una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo

que consiste de las SEC ID NOs: 2, 1 y 52; la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácido que es por lo menos 80% idéntica a una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 4, 3 y 53; y el anticuerpo se une a la BST1 humana. Dichos anticuerpos pueden unirse a la BST1 humana con una EC_{50} de 50 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 100 pM o menos, o más preferentemente 10 pM o menos.

El anticuerpo puede unirse además a las células CHO transfectadas con la BST1 humana.

En varias modalidades, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

En otras modalidades, las secuencias de aminoácido V_H y/o V_K pueden ser 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homólogas con las secuencias anteriormente establecidas. Un anticuerpo que tiene regiones V_H y V_K que son altamente idénticos (es decir 80% o más) a la regiones V_H y V_K de las secuencias anteriormente establecidas, se puede obtener mediante mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican la SEC ID NOs: 6, 5, 8, 7, 54 y 55 seguido por examen del anticuerpo alterado codificado para la función retenida usando los ensayos funcionales aquí descritos.

La identidad porcentual entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = $\#$ de posiciones idénticas / $\#$ total de posiciones $\times$ 100), teniendo en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que se necesita introducir para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación de la identidad porcentual entre las dos secuencias se pueden

realizar usando un algoritmo matemático, como se describe en los siguientes ejemplos no limitantes.

La identidad porcentual entre las dos secuencias de aminoácido se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller [*Comput. Appl. Biosci.* (1988) 4:11-17] el cual ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuo de peso PAM120, una penalización de longitud del espacio de 12 y una penalización del espacio de 4. Además, la identidad porcentual entre las secuencias de aminoácido se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch [*J. Mol. Biol.* (1970) 48:444-453] el cual ha sido incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando ya sea la matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

Adicional o alternativamente, las secuencias de proteína de la presente invención se pueden usar además como una "secuencia de consulta" o alternativamente, las secuencias de proteína de la presente invención pueden usarse como una "secuencia de consulta" para realizar una investigación frente a las bases de datos públicas para, por ejemplo, las secuencias relacionadas con la identidad. Dichas investigaciones pueden realizarse usando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las investigaciones de proteína BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, marcador = 50, longitud de palabra = 3 para obtener las secuencias de aminoácido homólogas a las moléculas del anticuerpo de la invención. Para obtener las alineaciones con espacios con fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se

pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Ver www.ncbi.nlm.nih.gov.

Anticuerpos con Modificaciones Conservadoras

En ciertas modalidades, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias CDR comprende secuencias especificadas de aminoácido basadas en los anticuerpos preferidos aquí descritos (por ejemplo, BST1_A2, BST1_A1 y BST1_A3), o sus modificaciones conservadoras, y en donde los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-BST1 de la invención. En consecuencia, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2, y CDR3, en donde: las secuencias CDR3 de la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 14, 13 y 58, y sus modificaciones conservadoras; la secuencia CDR3 de la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de una secuencia de aminoácido de las SEC ID NOs: 20, 19 y 61, y sus modificaciones conservadoras; y el anticuerpo se une con la BST1 humana con una EC_{50} de 50 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 100 pM o menos, o más preferentemente 10 pM o menos.

El anticuerpo también puede unirse a las células CHO transfectadas con la BST1 humana.

En una modalidad preferida, las secuencias CDR2 de la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 12 o 51, 11 y 57, y sus modificaciones conservadoras; y la secuencia CDR2 de la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 18, 17 y 60, y sus modificaciones conservadoras. En otra modalidad preferida, la secuencia CDR1 de la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 10, 9 y 56, y sus modificaciones conservadoras; y la secuencia CDR1 de la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 16, 15 y 59, sus modificaciones conservadoras. En otra modalidad preferida, las secuencias CDR3 de la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 14, 13 y 58, y sus modificaciones conservadoras; y la secuencia CDR3 de la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 20, 19 y 61, y sus modificaciones conservadoras.

En una modalidad preferida, la secuencia CDR2 de la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 12 o 51, 11 y 57, y sus modificaciones conservadoras; y la secuencia CDR2 de la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 18, 17 y 60, y sus modificaciones conservadoras. En otra modalidad preferida, la secuencia CDR1 de la región variable de cadena pesada comprende una

secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 10, 9 y 56, y sus modificaciones conservadoras; y la secuencia CDR1 de la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 16, 15 y 59, y sus modificaciones conservadoras.

En varias modalidades, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

Según se usa aquí, el término "modificaciones de secuencia conservadora" está destinado a referirse a las modificaciones de aminoácido que no afectan o alteran de manera significativa las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácido. Dichas modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y eliminaciones. Las modificaciones se pueden introducir en un anticuerpo de la invención mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tal como la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservadoras de aminoácido son aquellas en las que el residuo de aminoácido es reemplazado con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácido que tiene cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histinina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De este modo, uno o más residuos de aminoácido con las regiones CDR de un anticuerpo de la invención se puede reemplazar con otros

residuos de aminoácido de la misma familia de cadena lateral y el anticuerpo alterado puede ser examinado para la función conservada usando los ensayos funcionales aquí descritos.

Las secuencias CDR1 de cadena pesada of SEC ID NOs: 10, 9 y 56 pueden comprender una o más modificaciones de secuencia conservadora, tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácido; las secuencias CDR1 de cadena ligera de las SEC ID NOs: 16, 15 y 59 pueden comprender una o más modificaciones de secuencia conservadora, tal como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácido; las secuencias CDR2 de cadena pesada mostradas en la SEC ID NO: 12 o 51, 11 y 57 pueden comprender una o más modificaciones de secuencia conservadora, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácido; las secuencias CDR2 de cadena ligera mostradas en las SEC ID NOs: 18, 17 y 60 pueden comprender una o más modificaciones de secuencia conservadora, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácido; las secuencias CDR3 de cadena pesada mostradas en las SEC ID NOs: 14, 13 y 58 pueden comprender una o más modificaciones de secuencia conservadora, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácido; y/o las secuencias CDR3 de cadena ligera mostradas en las SEC ID NOs: 20, 19 y 61 pueden comprender una o más modificaciones de secuencia conservadora, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácido.

Anticuerpos que se unen al mismo epítipo como anticuerpos anti-BST1 de la invención

En otra modalidad, la invención proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítipo en la BST1 humana como cualquiera de los anticuerpos monoclonales BST1 de la invención (es decir, los anticuerpos que tienen la capacidad de competir en forma cruzada para unir la BST1 con cualquiera de los anticuerpos monoclonales de la invención). En modalidades preferidas, el anticuerpo de referencia para los estudios de competencia cruzada pueden ser el anticuerpo monoclonal BST1_A2 (que tiene las secuencias V_H y V_K como se muestran en las SEC ID NOs: 2 y 4, respectivamente), el anticuerpo monoclonal BST1_A1 (que tiene las secuencias V_H y V_K como se muestran en las SEC ID NOs: 1 y 3, respectivamente), el anticuerpo monoclonal BST1_A3 (que tiene las secuencias V_H y V_K como se muestran en las SEC ID NOs: 52 y 53, respectivamente).

Dichos anticuerpos que compiten en forma cruzada se pueden identificar en base a su capacidad de competir en forma cruzada con BST1_A2, BST1_A1 y BST1_A3 en ensayos de unión estándar de BST1. Por ejemplo, se pueden usar el análisis BIAcore, los ensayos de ELISA o la citometría de flujo para demostrar la competencia cruzada con los anticuerpos de la actual invención. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de, por ejemplo, BST1_A2, BST1_A1 y BST1_A3, con la BST1 humana demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con BST1_A2, BST1_A1 o BST1_A3 para unirse con la BST1 humana y de este modo se une con el mismo epítipo en la BST1_A2, BST1_A1 o BST1_A3 humana.

Anticuerpos Diseñados y Modificados

Un anticuerpo de la invención se puede preparar usando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias V_H y/o V_L aquí divulgadas las cuales se pueden usar como material de inicio para diseñar un anticuerpo modificado, cuyo

anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas en comparación con el anticuerpo de inicio. Un anticuerpo puede ser diseñado modificando uno o más aminoácido con una o ambas regiones variables (es decir V_H y/o V_L), por ejemplo, con una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones de marco. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede ser diseñado modificando los resultados en la(s) región(es) constante(s), por ejemplo para alterar la(s) función(es) efector(as) del anticuerpo.

En ciertas modalidades, se puede usar un injerto de CDR para diseñar las regiones variables de los anticuerpos. Los anticuerpos interactúan con los antígenos diana predominantemente mediante residuos de aminoácido que están localizados en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácido en las CDRs son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDRs. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones de anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de los anticuerpos específicos que se presentan de manera natural construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR a partir de un anticuerpo específico que se presenta de manera natural injertado en las secuencias de marco a partir de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (ver, por ejemplo Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033; Patente Estadounidense No. 5,225,539 otorgada a Winter, y Patentes Estadounidenses Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 otorgadas a Queen *et al.*).

En consecuencia, otra modalidad de la invención pertenece a un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende

una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOs 10, 9 y 56; 12 or 51, 11 y 57; y 14, 13 y 58, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 16, 15 y 59; 18, 17 y 60; y 20, 19 y 61, respectivamente. De este modo, dichos anticuerpos que contienen las secuencias CDR V_H y V_K de los anticuerpos monoclonales BST1_A2, BST1_A1 y BST1_A3, pueden contener incluso diferentes secuencias de marco de estos anticuerpos.

Dichas secuencias de marco pueden obtenerse a partir de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias genéticas de anticuerpo de línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de línea germinal para los genes de la región variable de murino de cadena pesada y ligera se pueden encontrar en la base de datos de secuencia de línea germinal de murino IMGT (international ImMunoGeneTics) (disponible en transferencia de hipertexto [protocol//www.imgt.cines.fr/?](http://www.imgt.cines.fr/?)), así como en Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, US Department of Health y Human Services, NIH Publication No. 91-3242; cuyo contenido de cada uno se incorpora expresamente aquí como referencia. Como otro ejemplo, las secuencias de ADN de línea germinal para los genes de la región variable de murino de cadena pesada y ligera se pueden encontrar en la base de datos Genbank.

Las secuencias de proteína de anticuerpo se comparan frente a una base de datos de secuencia de proteína compilada usando uno de los métodos de búsqueda de similitud de secuencia denominado el Gapped BLAST [Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402], que es bien conocido por los

expertos en la técnica. El BLAST es un algoritmo heurístico en el que una alineación estadísticamente significativa entre la secuencia del anticuerpo y la secuencia de la base de datos es probable que contenga pares de segmento de alta puntuación (HSP) de palabras alineadas. Los pares de segmentos cuyas puntuaciones no se pueden mejorar mediante extensión o recorte se denomina un *hit*. En resumen, las secuencias de nucleótido en la base de datos se trasladan y la región de en medio e incluyendo la región de marco de FR1 a FR3 se conserva. Las secuencias de la base de datos tienen una longitud promedio de 98 residuos. Las secuencias duplicadas que son emparejamientos exactos en toda la longitud de la proteína se remueven. Una búsqueda BLAST para las proteínas que usan el programa blastp por defecto, los parámetros estándar excepto el filtro de baja complejidad, que está desactivado, y la matriz de sustitución de BLOSUM62, filtra los 5 hits que producen emparejamientos de secuencia. Las secuencias de nucleótido son trasladadas en todos los seis marcos y el marco sin codones de parada en el segmento de emparejamiento de la secuencia de la base de datos es considerado el hit potencial. Esto a su vez es confirmado usando el programa tblastx BLAST, que traslada la secuencia del anticuerpo en todos los seis marcos y compara esos traslados con las secuencias de nucleótido en la base de datos dinámicamente trasladada en todos los seis marcos.

Las identidades son emparejamientos exactos de aminoácido entre la secuencia del anticuerpo y la base de datos de la proteína durante toda la longitud de la secuencia. Las positivas (identidades + emparejamiento de sustitución) no son idénticas sino sustituciones aminoácidas guiadas por la matriz de sustitución BLOSUM62. Si la secuencia del anticuerpo empareja dos de las secuencias de la base de datos con la misma identidad, el hit con más positivos se decidiría que sea el hit de la secuencia de emparejamiento.

Las secuencias de marco preferidas para usar en los anticuerpos de la invención son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias de marco usadas por los anticuerpos seleccionados de la invención, por ejemplo, similar a la secuencia de marco V_H 1-80, la secuencia de marco V_H 1-39, la secuencia de marco V_K 4-74 y/o las secuencias de marco V_K 4-55 usadas por los anticuerpos monoclonales preferidos de la invención. Las secuencias V_H CDR1, CDR2, y CDR3, y las secuencias V_K CDR1, CDR2, y CDR3, pueden injertarse en regiones de marco que tienen la secuencia idéntica a la encontrada en el gen de inmunoglobulina de la línea germinal desde la que se deriva la secuencia de marco, o las secuencias CDR pueden injertarse en las regiones de marco que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha descubierto que en ciertos casos es beneficioso mutar los residuos en las regiones de marco para mantener o mejorar la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo (ver, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 otorgadas a Queen *et al.*).

Otro tipo de modificación de la región variable es mutar los residuos de aminoácido en las regiones V_H y/o V_K CDR1, CDR2 y/o CDR3 para mejorar de este modo una o más de las propiedades de unión (por ejemplo afinidad) del anticuerpo de interés. La mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis mediada por PCR puede realizarse para introducir la(s) mutación(es) y el efecto en la unión del anticuerpo, u otras propiedades funcionales de interés, se pueden evaluar en ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describe aquí y se proporciona en los Ejemplos. En algunas modalidades, se introducen las modificaciones conservadoras (como se discutió anteriormente). Alternativamente se pueden hacer modificaciones no conservadoras. Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácido, pero preferentemente son sustituciones. Más aún, típicamente no más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos en una región CDR

son alterados, aunque como lo apreciarán los entendidos en la técnica, las variantes en otras áreas (las regiones de marco por ejemplo) pueden ser mayores.

En consecuencia, en otra modalidad, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales anti-BST1 aislados, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una región V_H CDR1 que comprende una secuencia de aminoácido del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 10, 9 y 56 o una secuencia de aminoácido que tiene, una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácido en comparación con las SEC ID NOs: 10, 9 y 56; (b) una región V_H CDR2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 12 o 51, 11 y 57, o una secuencia de aminoácido que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácido en comparación con las SEC ID NOs: 12 o 51, 11 y 57; (c) una región V_H CDR3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 14, 13 y 58, o una secuencia de aminoácido que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácido en comparación con las SEC ID NOs: 14, 13 y 58; (d) una región V_K CDR1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NOs: 16, 15 y 59, o una secuencia de aminoácido que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácido en comparación con las SEC ID NOs: 16, 15 y 59; (e) una región V_K CDR2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 18, 17 y 60, o una secuencia de aminoácido que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácido en comparación con las SEC ID NOs: 18, 17 y 60; y (f) una región V_K CDR3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 20, 19 y 61, o una secuencia de aminoácido que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco

sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácido en comparación con las SEC ID NOs: 20, 19 y 61.

Los anticuerpos diseñados de la divulgación incluyen aquellos en los que se han hecho modificaciones a los residuos de marco en V_H y/o V_K , por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente dichas modificaciones de marco se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un planteamiento es la “retromutación” de uno o más residuos de marco a la correspondiente secuencia de línea germinal. Más específicamente, un anticuerpo que ha experimentado una mutación somática puede contener residuos de marco que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Dichos residuos pueden ser identificados comparando las secuencias de marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de las que se deriva el anticuerpo.

Otro tipo de modificación de marco abarca mutar uno o más residuos con la región de marco, o incluso en una o más regiones CDR, para remover los epítomos de la célula T para reducir de este modo la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este planteamiento también está referido como “desinmunización” y se describe más detalladamente en la Publicación de Patente Estadounidense No. 2003/0153043.

Además o alternativo a las modificaciones hechas con el marco o las regiones CDR, los anticuerpos de la invención pueden ser diseñados para incluir modificaciones en la región F_c , típicamente para alterar una o más de las propiedades funcionales del anticuerpo, tal como la vida media en suero, fijación del complemento, unión del receptor F_c , y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede ser químicamente modificado (por ejemplo, una o más fracciones químicas se pueden unir al

anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, para alterar nuevamente una o más de las propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas modalidades se describe más detalladamente a continuación. La numeración de los residuos en la región FC es la del índice EU de Kabat.

En una modalidad, la región de bisagra de C_H1 se modifica de tal manera que el número de residuos de cisteína en la región de bisagra se altera, por ejemplo, aumenta o disminuye. Este planteamiento se describe además en la Patente Estadounidense No. 5,677,425. El número de residuos de cisteína en la región de bisagra de C_H1 se altera para, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de la cadena ligera y pesada o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra modalidad, la región de bisagra Fc de un anticuerpo es mutada para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o más de las mutaciones del aminoácido se introducen en la región de interfaz de dominio C_H2 - C_H3 del fragmento Fc-bisagra de modo que el anticuerpo tiene una proteína de estafilococo deteriorada A (SpA) uniéndose respecto a la unión nativa SpA de dominio Fc- bisagra. Este planteamiento se describe más detalladamente en la Patente Estadounidense No. 6,165,745.

En otra modalidad, el anticuerpo es modificado para aumentar su vida media biológica. Son posibles varios planteamientos. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente Estadounidense No. 6,277,375. Alternativamente, para aumentar la vida media biológica, el anticuerpo puede ser alterado en la región C_H1 o C_L para contener un epítipo de unión del receptor de rescate tomado de dos circuitos de un dominio C_H2 de una región Fc de un IgG, como se describe en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,869,046 y 6,121,022.

En otra modalidad, el anticuerpo es producido como un UniBody como se describe en la WO2007/059782 la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

En incluso otras modalidades, la región Fc es alterada reemplazando por lo menos un residuo de aminoácido con un residuo diferente de aminoácido para alterar la(s) función(es) efector(as) del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácido 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 se pueden reemplazar con un residuo diferente de aminoácido de modo que el anticuerpo tiene una afinidad alterada para un ligando efector pero conserva la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo original. El ligando efector al que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este planteamiento se describe más detalladamente en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,624,821 y 5,648,260.

En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácido 329, 331 y 322 se pueden reemplazar con un residuo de aminoácido diferente de modo que el anticuerpo tenga una unión C1q alterada y/o una citotoxicidad dependiente de la complementariedad reducida o abolida (CDC). Este planteamiento se describe más detalladamente en la Patente Estadounidense No. 6,194,551.

En otro ejemplo, uno o más residuos de aminoácido en las posiciones de aminoácido 231 y 239 son alterados para de este modo alterar la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este planteamiento se describe además en la Publicación PCT WO 94/29351.

En incluso otro ejemplo, la región Fc es modificada para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo para un receptor de Fcγ modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Este planteamiento se describe además en la Publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de unión en IgG1 para FcγR1, FcγRII, FcγRIII y FcRn humanos han sido mapeados y se han descrito las variantes con unión mejorada (ver Shields, R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 se mostraron para mejorar la unión a FcγRIII. Adicionalmente, se mostraron los siguientes mutantes de combinación para mejorar la unión de FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A. Otras variantes ADCC se describen por ejemplo en WO2006/019447.

En incluso otro ejemplo, la región Fc se modifica para aumentar la vida media del anticuerpo, generalmente aumentando la unión al receptor de FcRn, como se describe por ejemplo en la PCT/US2008/088053, US 7,371,826, US 7,670,600 y WO 97/34631. En otra modalidad, el anticuerpo se modifica para aumentar su vida media biológica. Son posibles varios planteamientos. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente Estadounidense No. 6,277,375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la vida media biológica, el anticuerpo puede ser alterado en la región C_H1 o C_L para contener un epítipo de unión del receptor de rescate tomado de dos circuitos de un dominio C_H2 de una región Fc

de una IgG, como se describe en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,869,046 y 6,121,022.

En incluso otra modalidad, la glicosilación de un anticuerpo es modificada. Por ejemplo, se puede hacer un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo que carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse a, por ejemplo, el aumento de la afinidad para el antígeno. Dichas modificaciones de carbohidrato pueden lograrse mediante por ejemplo, alterando uno o más de los sitios de glicosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, una o más de las sustituciones de aminoácido pueden hacerse que dan como resultado la eliminación de uno o más de los sitios de glicosilación de marco de la región variable para eliminar de este modo la glicosilación en ese sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Dicho planteamiento se describe más detalladamente en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,714,350 y 6,350,861 de Co *et al.*, y se puede conseguir removiendo la asparagina en posición 297.

Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede hacerse de modo que tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosil o un anticuerpo que tiene estructuras bisectriz GlcNac aumentadas. Esto algunas veces está referido en la técnica como una "glicofoma diseñada". Se ha demostrado que dichos patrones alterados de glicosilación aumentan la capacidad ADCC de anticuerpos. Dichas modificaciones de carbohidrato se pueden conseguir de manera general de dos formas; por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo se expresa en una célula huésped con un mecanismo de glicosilación alterada. Las células con mecanismo de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden usar como células huésped en las que se expresan los anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con glicosilación

alterada. Se hace referencia a la tecnología POTELLIGENT®. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa), tal como los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen de fucosa en sus carbohidratos. Las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 FUT8^{-/-} fueron creadas por ruptura dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores de reemplazo [ver Publicación de Patente Estadounidense No. 2004/0110704, Patente Estadounidense No. 7,517,670 y Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87:614-22]. Como otro ejemplo, la EP 1,176,195 de Hanai *et al.* describe una línea celular con un gen FUT8 disruptor de la funcionalidad, que codifica una fucosiltransferasa, de modo que los anticuerpos expresados en dicha línea celular presentan hipofucosilación reduciendo o eliminando la enzima relacionada con 1,6 enlace alfa. Hanai *et al.* describen además las líneas celulares que tienen una baja actividad enzimática para añadir fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tiene la actividad enzimática, por ejemplo la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). Alternativamente, las glicoformas diseñadas, particularmente afucosilación, se pueden hacer usando pequeños inhibidores moleculares de las enzimas de la vía de glicosilación [ver, por ejemplo, Rothman *et al.* (1989) *Mol. Immunol.* 26(12):1113-1123; Elbein (1991) *FASEB J.* 5:3055; PCT/US2009/042610 y la Patente Estadounidense No. 7,700,321]. La Publicación PCT WO 03/035835 describe una línea celular CHO variante, células Lec13, con reducida capacidad para unir fucosa a los carbohidratos enlazados con Asn(297), dando como resultado además la hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula huésped [ver además Shields, R.L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740]. La Publicación PCT WO 99/54342 describe las líneas celulares diseñadas para expresar las glicosiltransferasas de modificación por glicoproteína (por ejemplo beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares diseñadas presentan estructuras GlcNa de

bisectriz aumentada que da como resultado una actividad ADCC aumentada de los antibióticos [ver además Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180].

Alternativamente, los residuos de fucosa del anticuerpo pueden ser escindidos usando una enzima de fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa remueve los residuos de fucosilo de los anticuerpos [Tarentino, A.L. *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-23].

Otra modificación de los anticuerpos presentes que se contempla mediante la invención es la pegilación. Un anticuerpo puede ser pegilado para, por ejemplo, aumentar la vida media biológica (por ejemplo suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o un fragmento del mismo, típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o derivado de aldehído de PEG, bajo condiciones en las que uno o más grupos PEG se llegan a unir al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo. Preferentemente, la pegilación se realiza vía una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula PEG reactiva (o un polímero hidrosoluble reactivo análogo). Según se usa aquí, el término "polietilenglicol" está destinado a abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivar otras proteínas, tales como alcoxi (C1-C10) o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas modalidades, el anticuerpo que se va a pegar es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para pegar proteínas son conocidos en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpo de la invención. Ver, por ejemplo, EP 0154316 y EP 0401384.

En modalidades adicionales, por ejemplo en el uso de anticuerpos de la invención para fines de diagnóstico o detección, los anticuerpos pueden comprender un rótulo. Por "rotulado" se refiere a que un compuesto tiene por lo menos un elemento, isótopo o compuesto químico unido para permitir la detección del compuesto. En general, los rótulos caen en tres clases: a) rótulos isotópicos,

que pueden ser radioactivos o isótopos pesados; b) magnéticos, eléctricos, térmicos; y c) colorantes luminiscentes y de colores; aunque los rótulos incluyen enzimas y partículas tales como partículas magnéticas también. Los rótulos preferidos incluyen, pero no se limitan a, complejos lantánidos fluorescentes (incluyendo aquellos de Europio y Terbio), y rótulos fluorescentes que incluyen, pero no se limitan a, puntos cuánticos, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, verde Malacite, estilbeno, Amarillo Lucifer, Cascada Azul, Rojo Texas, los colorantes Alexa, los colorantes Cy, y otros descritos en la 6ta Edición del Molecular Probes Handbook de Richard P. Haugland, incorporado expresamente aquí como referencia.

Enlazadores

La presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-pareja donde el anticuerpo está enlazado con la pareja mediante un enlazador químico. En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador de peptidil, otros enlazadores incluyen enlazadores de hidrazina y disulfuro. Además de los enlazadores cuando se unen a la pareja, la presente divulgación proporciona además brazos enlazadores escindibles que son apropiados para la unión con esencialmente cualquier especie molecular. El aspecto de brazo enlazador de la invención se ejemplifica aquí con referencia a su acoplamiento a una fracción terapéutica. Sin embargo, será fácilmente aparente para los expertos en la técnica que los enlazadores pueden ser unidos a diversas especies incluyendo, pero sin limitación, agentes de diagnóstico, agentes analíticos, biomoléculas, agentes de direccionamiento, rótulos detectables y similares.

El uso del peptidil y otros enlazadores en los conjugados de anticuerpo-pareja se describe en las Solicitudes de Patente Provisional Estadounidense de

Series Nos. 60/295,196; 60/295,259; 60/295,342; 60/304,908; 60/572,667; 60/661,174; 60/669,871; 60/720,499; 60/730,804; y 60/735,657 y las Solicitudes de Patente Estadounidense de Series Nos. 10/160,972; 10/161,234; 11/134,685; 11/134,826; y 11/398,854 y la Patente Estadounidense No. 6,989,452 y Solicitud de Patente PCT No. PCT/US2006/37793, todas las cuales se incorporan aquí como referencia. Los enlazadores adicionales se describen en la Patente Estadounidense No. 6,214,345, Solicitud de Patente Estadounidense 2003/0096743 y Solicitud de Patente Estadounidense 2003/0130189, de Groot et al, J. Med. Chem. 42, 5277 (1999); de Groot et al. J. Org. Chem. 43, 3093 (2000); de Groot et al., J. Med. Chem. 66, 8815, (2001); WO 02/083180; Carl et al., J. Med. Chem. Lett. 24, 479, (1981); Dubowchik et al., Bioorg & Med. Chem. Lett. 8, 3347 (1998); y Solicitudes de Patente Provisional Estadounidense de Serie No 60/891,028.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a los enlazadores que son útiles para unir los grupos de direccionamiento con los agentes terapéuticos y los marcadores. En otro aspecto, esta divulgación proporciona enlazadores que imparten estabilidad a los compuestos, reducen su toxicidad *in vivo*, o por el contrario afectan favorablemente su farmacocinética, biodisponibilidad y/o farmacodinámica. Por lo general se prefiere que en dichas modalidades, el enlazador es escindido, liberando el fármaco activo, una vez que el fármaco es administrado a su sitio de acción. De este modo, en una modalidad, los enlazadores de la presente invención no dejan rastro, de modo que una vez removidos del agente terapéutico o marcador (tal como durante la activación), no queda rastro de presencia del enlazador. En otra modalidad, los enlazadores se caracterizan por su capacidad para ser escindidos en un sitio en o cerca de la célula diana tal como en el sitio de la acción terapéutica o la actividad del marcador. Dicha escisión puede ser de naturaleza enzimática. Esta característica ayuda a reducir la activación sistémica del agente terapéutico o marcador,

reduciendo la toxicidad y los efectos secundarios sistémicos. Los grupos escindibles preferidos para la escisión enzimática incluyen enlaces de péptido, enlaces éster, y enlaces de disulfuro. En otras modalidades, los enlazadores son sensibles al pH y son escindidos mediante los cambios en el pH.

Un aspecto de la actual divulgación es la capacidad para controlar la velocidad con la que se escinden los enlazadores. A menudo se desea un enlazador que se escinde rápidamente. Sin embargo, en algunas modalidades se puede preferir un enlazador que se escinde más lentamente. Por ejemplo, en una formulación de liberación sostenida o en una formulación con tanto un componente de liberación rápida y de liberación lenta, puede ser útil proporcionar un enlazador que se escinde más lentamente. La WO 02/096910 proporciona varios complejos específicos de ligando-fármaco que tienen un enlazador de hidrazina. Sin embargo, no hay forma de "afinar" la composición del enlazador dependiente de la velocidad de la ciclación requerida, y los compuestos particulares descritos escinden el ligando del fármaco a una velocidad menor que la que se prefiere para muchos conjugados de fármaco-enlazador. Por el contrario, los enlazadores de hidrazina de la actual invención proporcionan un rango de velocidades de ciclación, desde muy rápido a muy lento, permitiendo de este modo la selección de un enlazador de hidracina particular basada en la velocidad deseada de ciclación.

Por ejemplo, una ciclación muy rápida puede conseguirse con enlazadores de hidrazina que producen un único anillo de 5 elementos con la escisión. Las velocidades de ciclación preferidas para la administración dirigida de un agente citotóxico a las células se consiguen usando enlazadores de hidrazina que producen, con la escisión, ya sea dos anillos de 5 elementos o un único anillo de 6 elementos dando como resultado que resulta de un enlazador que tiene dos metilos en la posición geminal. Se ha demostrado que el efecto gem-dimetilo

acelera la velocidad de la reacción de ciclación en comparación con un único anillo de 6 elementos sin los dos metilos en posición germinal. Esto resulta de la cepa que es relevada en el anillo. Sin embargo, algunas veces los sustituyentes pueden retrasar la reacción en vez de hacerla más rápida. A menudo las razones para el retardo pueden remontarse a un impedimento estérico. Por ejemplo, la sustitución de gem dimetilo permite que se presente una reacción de ciclación mucho más rápida comparado cuando el carbono geminal es CH_2 .

Es importante notar, sin embargo, que en algunas modalidades, un enlazador que se escinde más lentamente puede ser preferido. Por ejemplo, en una formulación de liberación sostenida o en una formulación con tanto un componente de liberación rápida y de liberación lenta, puede ser útil proporcionar un enlazador que se escinde más lentamente. En ciertas modalidades, una velocidad lenta de ciclación se consigue usando un enlazador de hidrazina que produce, con la escisión, ya sea un único anillo de 6 elementos, sin la sustitución de gem-dimetilo, o un único anillo de 7 elementos. Los enlazadores también sirven para estabilizar el agente terapéutico o marcador contra la degradación mientras está en circulación. Esta característica proporciona un beneficio significativo ya que dicha estabilización da como resultado la prolongación de la vida media de circulación del agente adjunto o marcador. El enlazador sirve además para atenuar la actividad del agente adjunto o marcador de modo que el conjugado es relativamente benigno mientras está en circulación y tiene el efecto deseado, por ejemplo es tóxico, después de la activación en el sitio de acción deseado. Para los conjugados de agente terapéutico, esta característica del enlazador sirve para mejorar el índice terapéutico del agente.

Los grupos estabilizadores son preferentemente seleccionados para limitar el espaciado y el metabolismo del agente terapéutico o marcador mediante las enzimas que pueden estar presentes en la sangre o el tejido no diana y se

seleccionan además para limitar el transporte del agente o marcador en las células. Los grupos estabilizadores sirven para bloquear la degradación del agente o marcador y también pueden actuar en el suministro de otras características físicas del agente o marcador. El grupo estabilizador puede mejorar además la estabilidad del agente o marcador durante el almacenamiento en una forma formulada o no formulada.

De manera ideal, el grupo estabilizador es útil para estabilizar un agente terapéutico o marcador si sirve para proteger el agente o marcador de la degradación cuando se examina para el almacenamiento del agente o marcador en la sangre humana a 37°C durante 2 horas y da como resultado menos de 20%, preferentemente menos de 10%, más preferentemente menos de 5% e incluso más preferentemente menos de 2%, escisión del agente o marcador mediante las enzimas presentes en la sangre humana bajo las condiciones dadas de ensayo. La presente invención se refiere también a los conjugados que contienen estos enlazadores. Más particularmente, la invención se refiere al uso de profármacos que se pueden usar para el tratamiento de enfermedades, especialmente para la quimioterapia de cáncer. Específicamente, el uso de los enlazadores aquí descritos proporciona profármacos que muestran una alta especificidad de acción, una reducida toxicidad, y una estabilidad mejorada en la sangre respecto a los profármacos de estructura similar. Los enlazadores de la presente divulgación, según se describe aquí pueden estar presentes en una variedad de posiciones en la molécula de pareja.

De este modo, se proporciona un enlazador que puede contener cualquiera de una variedad de grupos como parte de su cadena que se escindirá in vivo, por ejemplo en la corriente sanguínea, a una velocidad que es mejorada respecto a la de los constructos que carecen de dichos grupos. También se proporcionan conjugados de los brazos de enlazador con agentes terapéuticos y de diagnóstico.

Los enlazadores son útiles para formar análogos de profármaco de agentes terapéuticos y para enlazar de manera reversible un agente terapéutico o de diagnóstico, un rótulo detectable, o un soporte sólido. Los enlazadores pueden incorporarse en complejos que incluyen citotoxinas.

El acoplamiento de un profármaco a un anticuerpo puede proporcionar ventajas de seguridad adicionales sobre los conjugados de anticuerpo convencionales de los fármacos citotóxicos. La activación de un profármaco puede conseguirse mediante una esterasa, tanto en las células tumorales como en los diversos tejidos normales, incluyendo el plasma. Se ha demostrado que el nivel de la actividad relevante de la esterasa en humanos es muy similar al observado en las ratas y primates no humanos, aunque menos que el observado en los ratones. La activación de un profármaco también se puede conseguir mediante escisión por glucuronidasa. Además del péptido escindible, la hidrazina, o el grupo disulfuro, uno o más grupos enlazadores autodestructivos se introducen opcionalmente entre la citotxina y el agente diana. Estos grupos enlazadores también pueden ser descritos como grupos espaciadores y contienen por lo menos dos grupos funcionales reactivos. Típicamente, una funcionalidad química del grupo espaciador se une con una funcionalidad química del agente terapéutico, por ejemplo citotoxina, mientras que la otra funcionalidad química del grupo espaciador se usa para unirse a una funcionalidad química del agente de direccionamiento o el enlazador escindible. Los ejemplos de las funcionalidades químicas de los grupos espaciadores incluyen hidroxilo, mercapto, carbonilo, carboxi, amino, cetona y grupos mercapto.

Los enlazadores autodestructivos son por lo general un grupo alquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, heteroarilo sustituido o insustituido o heteroalquilo sustituido o insustituido. En una modalidad, los grupos

alquilo o arilo pueden comprender entre 1 y 20 átomos de carbono. También pueden comprender una fracción de polietilenglicol.

Los grupos espaciadores ejemplares incluyen, por ejemplo, 6-aminohexanol, 6-mercaptohexanol, ácido 10-hidroxidecanoico, glicina y otros aminoácidos, 1,6-hexanediol, β -alanina, 2-aminoetanol, cisteamina (2-aminoetanetiol), ácido 5-aminopentanoico, ácido 6-aminohexanoico, ácido 3-maleimidobenzoico, ftalida, ftalidas α -sustituidas, el grupo carbonilo, ésteres de animales, ácidos nucleicos, péptidos y similares.

El espaciador puede servir para introducir una masa molecular adicional y funcionalidad química en el complejo de agente de direccionamiento-citotoxina. Por lo general, la masa adicional y la funcionalidad afectarán la vida media del suero y otras propiedades del complejo. De este modo, mediante la selección cuidadosa de los grupos espaciadores, se pueden producir complejos de citotoxina con un rango de vida media del suero.

Cuando están presentes múltiples espaciadores, se pueden usar ya sea espaciadores idénticos o diferentes.

Se puede usar una fracción adicional de enlazador que imparta preferentemente una solubilidad aumentada o propiedades disminuidas de agregación para los conjugados que utilizan un enlazador que contiene la fracción o modifica la velocidad de la hidrólisis del conjugado, dichos enlazadores no tienen que ser autodestructivos. En una modalidad, la fracción de unión es alquilo sustituido, alquilo insustituido, arilo sustituido, arilo insustituido, heteroalquilo sustituido, o heteroalquilo insustituido, cualquiera de los cuales puede ser recto, ramificado o cíclico. Las sustituciones pueden ser, por ejemplo, un alquilo inferior (C_1 - C_6), alcoxi, aquitio, alquilamino, o dialquilamino. En ciertas modalidades, los

enlazadores comprenden una fracción no cíclica. En otra modalidad, los enlazadores comprenden cualquier polímero de aminoácido positiva o negativamente cargado, tal como polilisina o poliargenina. Los enlazadores pueden comprender un polímero tal como una fracción de polietilenglicol. Adicionalmente el enlazador puede comprender, por ejemplo, tanto un componente polimérico como una pequeña fracción química. En una modalidad preferida, dichos enlazadores comprenden una fracción de polietilenglicol (PEG).

La porción de PEG puede estar entre 1 y 50 unidades de longitud. Preferentemente, el PEG tendrá 1-12 unidades de repetición, más preferentemente 3-12 unidades de repetición, más preferentemente 2-6 unidades de repetición, o incluso más preferentemente 3-5 unidades de repetición y más preferentemente 4 unidades de repetición. Un enlazador puede consistir únicamente de la fracción de PEG, o puede contener además un alquilo o heteroalquilo sustituido o insustituido adicional. Es útil combinar el PEG como parte de la fracción para mejorar la hidrosolubilidad del complejo. Adicionalmente, la fracción de PEG reduce el grado de agregación que puede presentarse durante la conjugación del fármaco del anticuerpo.

Para una mayor discusión de los tipos de citotoxinas, enlazadores y otros métodos para conjugar los agentes terapéuticos con los anticuerpos, ver también la Publicación PCT WO 2007/059404 otorgada a Gangwar et al. y titulada "Cytotoxic Compounds y Conjugados," Saito, G. et al. (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail, P.A. et al. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, T.M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Moléculas Asociadas

La presente invención incluye un anticuerpo conjugado a una molécula asociada, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo un inmunosupresor) o una radiotoxina. Dichos conjugados también están referidos aquí como "inmunokonjugados." Los inmunokonjugados que incluyen una o más citotoxinas son referidos como "inmunotoxinas." Un agente de citotoxina o citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para (por ejemplo que mata) las células.

Los ejemplos de moléculas asociadas de la presente divulgación incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los ejemplos de moléculas asociadas incluyen además, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil, decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo mecloretamina, tioepa, clorambucil, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos preferidos de moléculas asociadas que se pueden conjugar a un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, calicheamicinas,

maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un anticuerpo de calicheamicina está comercialmente disponible (Mylotarg®; American Home Products).

Los ejemplos preferidos de molécula asociada son CC-1065 y las duocarmicinas. La CC-1065 fue primero aislada de *Streptomyces zelensis* en 1981 por Upjohn Company (Hanka et al, J. Antibiot. 31: 1211 (1978); Martin et al., J. Antibiot. 33: 902 (1980); Martin et al., J. Antibiot. 34: 1119 (1981)) y se descubrió que tiene una potente actividad antitumoral y antimicrobiana tanto en animales in vitro como en animales experimentales (Li et al., Cancer Res. 42: 999 (1982)). La CC- 1065 se une con el B-ADN de doble cadena en el surco menor (Swenson et al., Cancer Res. 42: 2821 (1982)) con la secuencia de preferencia de 5'- d(A/GNTTA)-3' y 5'-d(AAAAA)-3' y alquilatos la posición N3 de la 3'-adenina mediante su unidad CPI de la mano izquierda presente en la molécula (Hurley et al., Science 226: 843 (1984)).

A pesar de su potente y amplia actividad antitumoral, la CC-1065 no se puede usar en humanos porque causa muerte retardada en animales experimentales. Muchos análogos y derivados de la CC-1065 y las duocarmicinas son conocidos en la técnica. Se ha revisado la investigación en la estructura, la síntesis y las propiedades de muchos de los compuestos. Ver, por ejemplo, Boger et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35: 1438 (1996); y Boger et al., Chem. Rev. 97: 787 (1997). Un grupo en Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. ha preparado un número de derivados de CC-1065. Ver, por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 5,101, 038; 5,641,780; 5,187,186; 5,070,092; 5,703,080; 5,070,092; 5,641,780; 5,101,038; y 5,084,468; y la solicitud PCT publicada, WO 96/10405 y la solicitud Europea publicada 0 537 575 Al. La Upjohn Company (Farmacia Upjohn) también ha estado activa en la preparación de derivados de CC-1065. Ver, por

ejemplo, la Patente Estadounidense No. 5,739,350; 4,978,757, 5,332, 837 y 4,912,227.

Propiedades Físicas del Anticuerpo

Los anticuerpos de la presente invención pueden caracterizarse además por diversas propiedades físicas de los anticuerpos anti-BST1. Se pueden usar varios ensayos para detectar y/o diferenciar las diversas clases de anticuerpos en base a sus propiedades físicas.

En algunas modalidades, los anticuerpos de la presente invención pueden contener uno o más sitios de glicosilación ya sea en la región variable de cadena ligera o pesada. La presencia de uno o más sitios de glicosilación en la región variable puede dar como resultado una inmunogenicidad aumentada del anticuerpo o una alteración de la pK del anticuerpo debido a la unión alterada a antígeno [Marshall *et al* (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala FA y Morrison SL (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al* (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al* (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.* (2000) *Mol Immunol* 37:697-706]. Se sabe que la glicosilación se presenta en motivos que contienen una secuencia N-X-S/T. La glicosilación de la región variable puede examinarse usando un ensayo de glicoblot, la cual escinde el anticuerpo para producir un Fab, y luego exámenes para la glicosilación usando un ensayo que mide la oxidación de periodato y la formación de base Schiff. Alternativamente, la glicosilación de la región variable puede examinarse usando cromatografía de luz Dionex (Dionex-LC), la cual es escinde los sacáridos de un Fab en monosacáridos y analiza el contenido individual de sacáridos. En algunos casos, es preferible tener un anticuerpo anti-BST1 que no contenga glicosilación de la región variable. Esto se puede conseguir ya sea seleccionando los anticuerpos que no contienen el motivo de

glicosilación en la región variable o mutando los residuos en el motivo de glicosilación usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica.

En una modalidad preferida, los anticuerpos de la presente invención no contienen sitios de isomerismo de asparagina. Se puede presentar un efecto de desamidación o ácido isoaspártico en las secuencias N-G o D-G, respectivamente. El efecto de desamidación o de ácido isoaspártico da como resultado la creación de ácido isoaspártico que disminuye la estabilidad de un anticuerpo creando una estructura retorcida fuera de una terminal de carboxi de cadena lateral en vez de la cadena principal. La creación del ácido isoaspártico puede medirse usando un ensayo iso-quant, que utiliza HPLC de fase inversa para examinar el ácido isoaspártico.

Cada anticuerpo tendrá un único punto isoelectrico (pI), pero por lo general los anticuerpos caerán en el rango de pH de entre 6 y 9.5. El pI para un anticuerpo IgG1 cae típicamente dentro del rango de pH de 7-9.5 y el pI para un anticuerpo IgG4 cae típicamente dentro del rango de pH de 6-8. Los anticuerpos pueden tener un pI que está fuera de este rango. Aunque los efectos son generalmente desconocidos, hay una especulación de que los anticuerpos con un pI fuera del rango normal pueden tener algunas condiciones de ensayo iso-quant e inestabilidad bajo condiciones *in vivo*. El punto isoelectrico puede ser examinado usando un ensayo de centrado isoelectrico capilar, el cual crea una gradiente de pH y puede utilizar enfoque láser para una exactitud incrementada [Janini *et al* (2002) *Electrophoresis* 23:1605-11; Ma *et al.* (2001) *Chromatographia* 53:S75-89; Hunt *et al* (1998) *J Chromatogr A* 800:355-67]. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-BST1 que contiene un valor pI que cae en el rango normal. Esto se puede conseguir ya sea seleccionando anticuerpos con un pI en el rango normal, o mutando los residuos de superficie cargada usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica.

Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión que es indicativo de la estabilidad térmica [Krishnamurthy R y Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71]. Una mayor estabilidad térmica indica una mayor estabilidad total del anticuerpo *in vivo*. El punto de fusión de un anticuerpo puede medirse usando técnicas de calorimetría de barrido diferencial [Chen *et al.* (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando *et al.* (1999) *Immunol Lett* 68:47-52]. T_{M1} indica la temperatura de despliegue inicial del anticuerpo. T_{M2} indica la temperatura del despliegue completo del anticuerpo. Por lo general, se prefiere que el T_{M1} de un anticuerpo de la presente invención sea mayor que 60°C, preferentemente mayor que 65°C, incluso más preferentemente mayor que 70°C. Alternativamente, la estabilidad térmica de un anticuerpo puede medirse usando dicorismo circular [Murray *et al.* (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9].

En una modalidad preferida, los anticuerpos se seleccionan para que no se degraden rápidamente. La fragmentación de un anticuerpo anti-BST1 puede medirse usando electroforesis capilar (CE) y MALDI-MS, como es bien entendido en la técnica [Alexander AJ y Hughes DE (1995) *Anal. Chem.* 67:3626-32].

En otra modalidad preferida, los anticuerpos se seleccionan de modo que tengan mínimos efectos de agregación. La agregación puede conllevar a la activación de una respuesta inmune no deseada y/o propiedades farmacocinéticas desfavorables. Por lo general, los anticuerpos son aceptables con la agregación de 25% o menos, preferentemente 20% o menos, incluso más preferentemente 15% o menos, incluso más preferentemente 10% o menos e incluso más preferentemente 5% o menos. La agregación puede medirse mediante varias técnicas bien conocidas en el arte, incluyendo cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con columna de exclusión de tamaño (SEC), y dispersión de la luz para identificar monómeros, dímeros, trímeros o multímeros.

Métodos de Diseño de Anticuerpos

Como se discutió anteriormente, los anticuerpos anti-BST1 que tienen secuencias V_H y V_K aquí divulgadas pueden usarse para crear nuevos anticuerpos anti-BST1 modificando las secuencias V_H y/o V_K , o region(es) constante(s) unido(s) a las mismas. De este modo, en otro aspecto de la invención, las características estructurales de un anticuerpo anti-BST1 de la invención, por ejemplo BST1_A2, BST1_A1 o BST1_A3, se usan para crear anticuerpos anti-BST1 estructuralmente relacionados que conservan por lo menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como la unión a la BST1 humana. Por ejemplo, una o más regiones CDR de BST1_A2, BST1_A1 o BST1_A3, o mutaciones de las mismas, pueden combinarse de manera recombinante con regiones de marco conocidas y/u otras CDRs para crear adicionales anticuerpos anti-BST1 recombinantemente diseñados, anticuerpos anti-BST1 de la invención, como se discutió anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en la sección anterior. El material de inicio para el método de diseño es una o más de las secuencias V_H y/o V_K aquí proporcionadas, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo diseñado, no es necesario preparar en realidad (es decir expresar como una proteína) un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias V_H y/o V_K aquí proporcionadas, o una o más de las regiones CDR de las mismas. Más bien, la información contenida en la(s) secuencia(s) se usa como el material de inicio para crear secuencia(s) de "segunda generación" derivadas de la(s) secuencia(s) original(es) y luego la(s) secuencia(s) de "segunda generación" se preparan y expresan como una proteína.

En consecuencia, en otra modalidad, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-BST1 que comprende: proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 10, 9 y

56, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 12 o 51, 11 y 57, y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 14, 13 y 58; y/o (ii) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 16, 15 y 59, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 18, 17 y 60 y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOs: 20, 19 y 61, alterando por lo menos un residuo de aminoácido en la secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera para crear por lo menos una secuencia de anticuerpo alterada; y expresar la secuencia de anticuerpo alterada en forma de una proteína.

Las técnicas de biología molecular estándar pueden usarse para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada.

Preferentemente, el anticuerpo codificado por la(s) secuencia(s) de anticuerpo alterado es aquél que conserva una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-BST1 aquí descritos, cuyas propiedades funcionales incluyen, pero no se limitan a: (a) se une a la BST1 humana con un K_D of 1×10^{-7} M o menos; (b) se une a las células CHO humanas transfectadas con la BST1.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados pueden evaluarse usando ensayos estándar disponibles en la técnica y/o aquí descritos, tales como los establecidos en los Ejemplos (por ejemplo, citometría de flujo, ensayos de unión).

En ciertas modalidades de los métodos de anticuerpos diseñados de la invención, se pueden introducir mutaciones aleatoria o selectivamente a lo largo

de todo o parte de una secuencia que codifica el anticuerpo anti-BST1 y los anticuerpos anti-BST1 modificado resultante pueden ser tamizados para la actividad de unión y/o otras propiedades funcionales como se describen aquí. Los métodos mutacionales se han descrito en la técnica. Por ejemplo, la Publicación PCT WO 02/092780 describe métodos para crear y tamizar las mutaciones del anticuerpo usando mutagénesis por saturación, ensamblaje por ligamiento sintético, o una combinación de los mismos. Alternativamente, la Publicación PCT WO 03/074679 describe métodos que usan métodos de tamizado computacional para optimizar las propiedades psicoquímicas de los anticuerpos.

Moléculas de Ácido Nucleico que Codifican los Anticuerpos de la Invención

Otro aspecto de la invención pertenece a las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en todas las células, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico es "aislado" o "se hace sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, mediante técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, atomizando CsCl, cromatografía de columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Ver, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley Interscience, N. Y. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede o puede no contener secuencias intrónicas. En una modalidad preferida, el ácido nucleico es una molécula cADN.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse usando técnicas de biología molecular estándar. Para anticuerpos expresados por hibridomas, los cADNs que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo hechas por el hibridoma pueden obtenerse mediante amplificación PCR estándar o técnicas de

clonación de cADN. Para anticuerpos obtenidos a partir de una biblioteca genética de inmunoglobulina (por ejemplo usando técnicas de presentación de fagos), los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo pueden recuperarse a partir de la biblioteca.

Las moléculas de ácido nucleico preferidas de la invención son aquellas que codifican las secuencias V_H y V_K de los anticuerpos monoclonales de BST1_A2, BST1_A1 o BST1_A3. Las secuencias de y que codifican las secuencias V_H de BST1_A2, BST1_A1 o BST1_A3 se muestran en las SEC ID NOs: 6, 5 y 54, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias V_K de BST1_A2, BST1_A1 o BST1_A3 se muestran en las SEC ID NOs: 8, 7 y 55, respectivamente.

Otros ácidos nucleicos preferidos de la invención son ácidos nucleicos que tienen por lo menos 80% de identidad de secuencia, tal como por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia, con una de las secuencias mostradas en las SEC ID NOs: 6, 5, 8, 7, 54 y 55, cuyos ácidos nucleicos codifican un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo.

La identidad porcentual entre las dos secuencias de ácido nucleico es el número de posiciones en la secuencia en la que el nucleótido es idéntico, teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, que necesita ser introducido para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación de la identidad porcentual entre las dos secuencias puede conseguirse usando un algoritmo matemático, tal como el algoritmo de Meyers y Miller o el programa XBLAST de Altschul anteriormente descrito.

Aún más, los ácidos nucleicos preferidos de la invención comprenden una o más porciones que codifican la CDR de las secuencias de ácido nucleico

mostradas en las SEC ID NOs: 6, 5, 8, 7, 54 y 55. En esta modalidad, el ácido nucleico puede codificar la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada y ligera de la BST1_A2, BST1_A1 o BST1_A3.

Los ácidos nucleicos tienen por lo menos 80%, tal como por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia, con dicha porción que codifica la CDR de las SEC ID NOs: 6, 5, 8, 7, 54 y 55 (secuencias V_H y V_K) son además ácidos nucleico preferidos de la invención. Dichos ácidos nucleico pueden diferir de la correspondiente porción de las SEC ID NOs: 6, 5, 8, 7, 54 y 55 en una región de codificación no CDR y/o en una región de codificación de CDR. En donde la diferencia está en una región de codificación de CDR, la región de CDR de ácido nucleico codificada por el ácido nucleico comprende típicamente una o más de las modificaciones de secuencia conservadora como se describe aquí comparado con la correspondiente secuencia de CDR de BST1_A2, BST1_A1 o BST1_A3.

Una vez que los fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_K se obtienen, esos fragmentos de ADN pueden ser además manipulados por técnicas estándar de ADN recombinante, por ejemplo, convertir los genes de la región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes del fragmento Fab, o en genes de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_K o V_H está operativamente enlazado con otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. El término "operativamente enlazado", como se usa en este contexto, está destinado a significar que los dos fragmentos de ADN están unidos de modo que las secuencias de aminoácido codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco.

El ADN aislado que codifica la región V_H se puede convertir en un gen de cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica V_H con otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada (C_H1 , C_H2 y C_H3). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada de murino son conocidas en la técnica [ver por ejemplo Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, US Department of Health y Human Services, Publicación NIH No. 91-3242] y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferentemente es una región constante IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede enlazarse operativamente con otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante C_H1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región V_L / V_K puede convertirse un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera Fab) enlazando operativamente el ADN que codifica V_L con otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, C_L . Las secuencias de los genes de la región constante de cadena ligera de murino son conocidas en la técnica [ver, por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, US Department of Health y Human Services, Publicación NIH No. 91-3242] y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación PCR estándar. En modalidades preferidas, la región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L / V_K están operativamente enlazados con otro fragmento que codifica un enlazador

flexible, por ejemplo que codifica la secuencia de aminoácido (Gly₄-Ser)₃, de modo que las secuencias V_H y V_L / V_K pueden expresarse como una proteína contigua de una sola cadena, con las regiones V_L / V_K y V_H unidas por el enlazador flexible [ver, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554].

Producción de Anticuerpos Monoclonales

De acuerdo con la invención la BST1 o un fragmento o derivado del mismo se puede usar como un inmunógeno para generar anticuerpos que se unen inmuno-específicamente tal como un inmunógeno. Dichos inmunógenos pueden aislarse mediante cualquier medio conveniente. Un experto en la técnica reconocerá que muchos procedimientos están disponibles para la producción de anticuerpos, por ejemplo, como se describe en *Anticuerpos, A Laboratory Manual*, Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N.Y. Un experto en la técnica apreciará además que los fragmentos de unión o los fragmentos Fab que imitan a los anticuerpos también se pueden preparar a partir de una información genética mediante diversos procedimientos [Anticuerpo Engineering: A Practical Approach (Borrebaeck, C., ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; *J. Immunol.* 149, 3914-3920 (1992)].

En una modalidad de la invención, se producen los anticuerpos para un dominio específico de la BST1. En una modalidad específica, los fragmentos hidrófilos de la BST1 se usan como inmunógenos para la producción de anticuerpos.

En la producción de anticuerpos, el tamizado del anticuerpo deseado puede conseguirse mediante técnica conocidas en el arte, por ejemplo, ELISA (ensayo

de inmunoabsorción ligados a enzimas). Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconocen un dominio específico de la BST1, se pueden ensayar hibridomas generados para un producto que se une con un fragmento de BST1 que contiene dicho dominio. Para la selección de un anticuerpo que une específicamente un primer homólogo de BST1 pero que no se une específicamente a (o se une menos ávidamente a) un segundo homólogo de BST1, se puede seleccionar sobre la base de una unión positiva al primer homólogo de BST1 y una falta de unión a (o unión reducida a) el segundo homólogo de BST1. De manera similar, para la selección de un anticuerpo que une específicamente la BST1 pero que no se une específicamente a (o se une menos ávidamente a) una isoforma diferente de la misma proteína (tal como una glicofoma diferente que tiene el mismo péptido de núcleo que la BST1), se puede seleccionar en base a la unión positiva a la BST1 y una falta de unión a (o unión reducida a) la isoforma diferente (por ejemplo una glicofoma diferente). De este modo, la presente invención proporciona un anticuerpo (tal como un anticuerpo monoclonal) que se une con mayor afinidad (por ejemplo por lo menos 2-veces, tal como por lo menos 5-veces, particularmente por lo menos 10-veces mayor afinidad) a la BST1 que a una isoforma o isoformas diferentes (por ejemplo, glicofomas) de la BST1.

Los anticuerpos policlonales que se pueden usar en los métodos de la invención son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de sueros de animales inmunizados. También se puede usar suero inmune no fraccionado también. Se pueden usar varios procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales de la BST1, un fragmento de la BST1, un polipéptido relacionado con la BST1, o un fragmento de un polipéptido relacionado con la BST1. Por ejemplo, una forma es purificar los polipéptidos de interés o sintetizar los polipéptidos de interés usando, por ejemplo, métodos de síntesis de péptido en fase sólida bien conocidos en la técnica. Ver,

por ejemplo, *Guide to Protein Purification*, Murray P. Deutcher, ed., *Meth. Enzymol.* Vol 182 (1990); Solid Phase Peptide Synthesis, Greg B. Fields ed., *Meth. Enzymol.* Vol 289 (1997); Kiso *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 38: 1192-99, 1990; Mostafavi *et al.*, *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids* 1: 255-60, 1995; Fujiwara *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 44: 1326-31, 1996. Los polipéptidos seleccionados pueden ser usados luego para inmunizar mediante inyección varios animales huéspedes, incluyendo pero sin limitación conejos, ratones, ratas, etc., para generar anticuerpos policlonales o monoclonales. Varios adyuvantes (es decir, inmunoestimulantes) pueden usarse para mejorar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, incluyendo, pero sin limitación, adyuvantes de Freund completos o incompletos, un gel mineral tal como hidróxido de aluminio, una sustancia de superficie activa tal como lisolecitina, poliol plurónico, a polianión, un péptido, una emulsión de aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol, y un adyuvante tal como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) o *Corynebacterium parvum*. Los adyuvantes adicionales también son bien conocidos en la técnica.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales (mAbs) dirigidos hacia la BST1, cualquier técnica que proporciona la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en el cultivo puede usarse. Por ejemplo, la técnica de la hibridoma originalmente desarrollada por Kohler y Milstein (1975, *Nature* 256:495-497), así como la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de célula B humana [Kozbor *et al.* (1983) *Immunology Today* 4:72], y la técnica de la hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos [Cole *et al.* (1985) en *Anticuerpos monoclonales y Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96]. Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquiera de las subclases de la misma. La hibridoma que produce los anticuerpos monoclonales puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. En una modalidad adicional de la invención, los anticuerpos monoclonales

se pueden reproducir en animales libres de gérmenes, utilizando tecnología conocida (PCT/US90/02545, incorporada aquí como referencia).

El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema inmune. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos de inmunización y las técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión son conocidos en la técnica. Las parejas de fusión (por ejemplo células de mieloma de murino) y los procedimientos de fusión también son conocidos.

Los anticuerpos monoclonales incluyen pero sin limitación anticuerpos monoclonales humanos y anticuerpos monoclonales quiméricos (por ejemplo, quimeras de humano-ratón).

Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención se pueden preparar en base a la secuencia de un anticuerpo monoclonal no humano preparado como se describió anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse del hibridoma no humano de interés y diseñado para contener secuencias de inmunoglobulina no murino (por ejemplo humana) usando técnicas de biología molecular estándar. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables de murino se pueden enlazar a regiones constantes humanas usando los métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 4,816,567 otorgada a Cabilly *et al.*). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR de murino pueden insertarse en un marco humano usando los métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,225,539 a Winter, y las Patentes Estadounidenses Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 otorgadas a Queen *et al.*).

Los anticuerpos completamente humanos se pueden producir usando ratones transgénicos o transcromosómicos que son incapaces de expresar genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar genes humanos de cadena pesada y cadena ligera. Los ratones transgénicos son inmunizados de la manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo todo o una porción de la BST1. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse usando tecnología convencional de hibridoma. Los transgenes de inmunoglobulina humanos hospedados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de la célula B, y posteriormente experimentan un cambio de clase y mutación somática. De este modo, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM y IgE terapéuticamente útiles. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones de HuMAb Mouse[®] (Medarex[®], Inc.) y cepas KM Mouse[®]. La cepa HuMAb Mouse[®] (Medarex[®], Inc.) se describe en Lonberg y Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, ver, por ejemplo la Patente Estadounidense 5,625,126; Patente Estadounidense 5,633,425; Patente Estadounidense 5,569,825; Patente Estadounidense 5,661,016; y Patente Estadounidense 5,545,806. La cepa KM mouse[®] se refiere a un ratón que lleva un transgén humano de cadena pesada y una transcromosoma humana de cadena ligera y se describe detalladamente en la Publicación PCT WO 02/43478 otorgada a Ishida *et al.*

Aún más, los sistemas alternativos de animal transgénico que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden usar para mejorar los anticuerpos anti-BST1 de la invención. Por ejemplo, se puede usar un sistema transgénico alternativo referido como Xenomouse (Amgen, Inc.); dichos ratones se describen en, por ejemplo, Solicitudes de Patente

Estadounidense Nos. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 y 6,162,963 otorgada a Kucherlapati et al.

Los anticuerpos completamente malos que reconocen un epítipo seleccionado pueden ser generados usando una técnica referida como "selección guiada". En este planteamiento se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo [Jespers *et al.* (1994) *Biotechnology* 12:899-903].

Además, los sistemas alternativos de animal transcromosómico que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden usar para mejorar los anticuerpos anti-BST1. Por ejemplo, se pueden usar los ratones que llevan tanto el transcromosoma humano de cadena pesada como el transcromosoma humano de cadena ligera, referidos como "ratones TC"; dichos ratones se describen en Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Además, las vacas que llevan los transcromosomas humanos de cadena pesada y ligera se han descrito en la técnica [Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894] y solicitud PCT No. WO2002/092812 y se pueden usar para mejorar los anticuerpos anti-BST1.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se pueden preparar usando ratones SCID dentro de los cuales se han reconstituido las células inmunes humanas de modo que una respuesta de anticuerpo humano se puede generar con la inmunización. Dichos ratones se describen en, por ejemplo, las Solicitudes de Patente Estadounidense Nos. 5,476,994 y 3,698,767.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser generados mediante el uso de la tecnología de representación de fago para producir y tamizar las

bibliotecas de polipéptidos para unión con una diana seleccionada [ver, por ejemplo, Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6378-82, 1990; Devlin *et al.*, *Science* 249, 404-6, 1990, Scott y Smith, *Science* 249, 386-88, 1990; y Ladner *et al.*, Solicitud de Patente Estadounidense No. 5,571,698]. Un concepto básico de los métodos de representación de fago es el establecimiento de una asociación física entre el ADN que codifica un péptido que va a ser tamizado y el polipéptido. Esta asociación física es proporcionada por la partícula del fago, la cual muestra un polipéptido como parte de un cápside que adjunta el genoma de fago que codifica el polipéptido. El establecimiento de una asociación física entre los polipéptidos y su material genético permite un tamizado de masa simultáneo de grandes números de polipéptidos diferentes que tienen un fago. El fago que muestra un polipéptido con afinidad a una diana se enlaza con la diana y estos fagos son enriquecidos mediante tamizado de afinidad a la diana. La identidad de los polipéptidos mostrados a partir de estos fagos se puede determinar a partir de sus respectivas genomas. Usando estos métodos un polipéptido identificado por tener una afinidad de unión para una diana deseada puede ser luego sintetizado en masa mediante medios convencionales. Ver, por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 6,057,098, la cual se incorpora aquí en su totalidad, incluyendo todas las tablas, figuras, y reivindicaciones. En particular, dicho fago puede ser usado para mostrar los dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o biblioteca de anticuerpo convencional (por ejemplo, humano o murino). Un fago que expresa un dominio que une a un antígeno que une el antígeno de interés se puede seleccionar o identificar con antígeno, por ejemplo, usando un antígeno rotulado o una unión de antígeno o capturado a una superficie sólida o perla. El fago usado en estos métodos son típicamente fagos filamentosos que incluyen dominios de unión fd y M13 expresados a partir del fago con dominios de anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizado con disulfuro recombinantemente fusionados con ya sea el gen de fago III o proteína genética VIII. Los métodos que muestran el fago que se pueden usar para hacer los

anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos divulgados en Brinkman *et al.* (1995) *J. Immunol. Methods* 182:41-50; Ames *et al.* (1995) *J. Immunol. Methods* 184:177-186; Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994); Persic *et al.* (1997) *Gene* 187 9-18; Burton *et al.* (1994) *Advances in Immunology* 57:191-280; Solicitud PCT No. PCT/GB91/01134; Publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Solicitudes de Patente Estadounidense Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 y 5,969,108; cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Según se describió en las anteriores referencias, después de la selección del fago, las regiones que codifican el anticuerpo del fago pueden ser aisladas y usadas para generar anticuerpos totales, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresado en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, células de insectos, células de plantas, levadura, y bacterias, por ejemplo, como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, las técnicas para reproducir de manera recombinante los fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ también se pueden emplear usando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la Publicación PCT WO 92/22324; Mullinax *et al.* (1992) *BioTechniques* 12(6):864-869; y Sawai *et al.* (1995) *AJRI* 34:26-34; y Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043 (dichas referencias se incorporan como referencia en sus totalidades).

Los ejemplos de técnicas que se pueden usar para producir Fvs de una sola cadena y los anticuerpos incluyen los descritos en las Patentes Estadounidenses 4,946,778 y 5,258,498; Huston *et al.* (1991), *Methods in Enzymology* 203:46-88; Shu *et al.* (1993) *PNAS* 90:7995-7999; y Skerra *et al.* (1988) *Science* 240:1038-1040.

La invención proporciona fragmentos, derivados o análogos de moléculas de inmunoglobulina anti-BST1 funcionalmente activos. Funcionalmente activo significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de elicitar los anticuerpos anti-anti-idiotipo (es decir anticuerpos terciarios) que reconocen el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo del cual se deriva el fragmento, derivado o análogo. Específicamente, en una modalidad particular la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina puede ser mejorada mediante la eliminación del marco y las secuencias CDR que tienen terminal C a la secuencia CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar cual secuencias CDR se unen al antígeno, se pueden usar péptidos sintéticos que contienen las secuencias CDR en los ensayos de unión con el antígeno, mediante cualquier método de ensayo de unión conocido en la técnica.

La presente invención proporciona fragmentos de anticuerpo tales como, pero sin limitación, fragmentos $F(ab')_2$ y fragmentos Fab. Los fragmentos de anticuerpo que reconocen los epítopos específicos pueden ser generados por técnicas conocidas. Los fragmentos $F(ab')_2$ consisten de la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio C_{H1} de la cadena pesada y se generan mediante la digestión de pepsin de la molécula del anticuerpo. Los fragmentos Fab son generados reduciendo los puentes de disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. La invención proporciona además dímeros de cadena pesada y de cadena ligera de los anticuerpos de la invención, o cualquier fragmento mínimo de los mismos tal como Fvs o anticuerpos (SCAs) de una sola cadena [por ejemplo, como se describe en la Patente Estadounidense 4,946,778; Bird, (1988) *Science* 242:423-42; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; y Ward *et al.* (1989) *Nature* 334:544-5], o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo de la invención. Los anticuerpos de una sola cadena se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de

la región Fv vía un puente de aminoácido, dando como resultado un polipéptido de una sola cadena. Se pueden usar técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* [Skerra *et al.* (1988) *Science* 242:1038-1041].

En otras modalidades, la invención proporciona proteínas de fusión de las inmunoglobulinas de la invención (o sus fragmentos funcionalmente activos), por ejemplo en las que la inmunoglobulina se fusiona vía un enlace covalente (por ejemplo, un enlace péptido), en tanto el terminal N o el terminal C con una secuencia de aminoácido de otra proteína (o su porción, preferentemente por lo menos 10, 20 o 50 porciones de aminoácido de la proteína) que no es la inmunoglobulina. Preferentemente la inmunoglobulina o su fragmento, está covalentemente enlazada con la otra proteína en el terminal N del dominio constante. Como se mencionó anteriormente, dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación, aumentar la vida media *in vivo*, y mejorar la administración de un antígeno a través de una barrera epitelial al sistema inmune.

Las inmunoglobulinas de la invención incluyen análogos y derivados que están modificados, es decir mediante la adhesión covalente de cualquier tipo de moléculas en la medida que dicha unión covalente no perjudique la unión inmunoespecífica. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados y análogos de las inmunoglobulinas incluyen aquellos que han sido posteriormente modificados, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede realizarse mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitación escisión química, acetilación, formilación, etc. Adicionalmente, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Inmunización de Ratones

Los ratones se pueden inmunizar con una preparación purificada o enriquecida de antígeno BST1 y/o BST1 recombinante, o células que expresan BST1. Preferentemente, los ratones tendrán 6-16 semanas de edad con la primera infusión. Por ejemplo, una preparación purificada o recombinante (100 µg) del antígeno de BST1 se puede usar para inmunizar los ratones de manera intraperitoneal.

La experiencia acumulada con varios antígenos ha demostrado que los ratones responden cuando son inmunizados de manera intraperitoneal (IP) con antígeno en adyuvante completo de Freund. Sin embargo, también se ha descubierto que los adyuvantes diferentes a los de Freund son efectivos. Además, se ha descubierto que todas las células en ausencia de un adyuvante son altamente inmunogénicas. La respuesta inmune puede ser monitoreada durante el curso del protocolo de inmunización con muestra de plasma que son obtenidas mediante sangrados retroorbitales. El plasma puede ser tamizado mediante ELISA (como se describe más adelante) para examinar títulos satisfactorios. Los ratones pueden ser impulsados de manera intravenosa con un antígeno durante 3 días consecutivos con sacrificio y remoción del bazo realizándose 5 días después. En una modalidad, se pueden usar las cepas de ratón A/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me.).

Generación de Transfectomas que Producen Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos de la invención pueden producirse en un transfectoma de célula huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección genética como es bien conocido en la técnica [por ejemplo, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202].

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o los fragmentos de anticuerpo de los mismos, los ADNs que codifican las cadenas ligera y pesada de longitud parcial o total, se pueden obtener mediante técnicas de biología molecular estándar (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de cADN usando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADNs pueden ser insertados en los vectores de expresión de modo que los genes estén operativamente enlazados con las secuencias de control de transcripción y traslación. En este contexto, el término "operativamente enlazado" está destinado a significar que un gen de anticuerpo está ligado a un vector de modo que las secuencias de control de transcripción y traslación en el vector sirven a su función destinada de regular la transcripción y la traslación del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se eligen para ser compatibles con las célula huésped de expresión usada.

Las células huésped pueden ser co-transfectadas con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, se puede usar un único vector el cual codifica ambos polipéptidos de cadena pesada y ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera deberá colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de la cadena pesada libre de tóxico [Proudfoot (1986) *Nature* 322:52; Kohler (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197]. Las secuencias de codificación para las cadenas pesada y ligera pueden comprender cADN o ADN genómico.

Los genes de anticuerpo son insertados en el vector de expresión mediante métodos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción de la

complementariedad en el fragmento del gen de anticuerpo y el vector, o ligación de extremo despuntado si no se presentan sitios de restricción). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos aquí descritos pueden usarse para crear genes de anticuerpo de longitud completa de un isotipo de anticuerpo insertándoles los vectores de expresión que ya codifican las regiones constante de cadena pesada y constante de cadena ligera del isotipo deseado de modo que el segmento V_H está operativamente enlazado con el(los) segmento(s) C_H con el vector y el segmento V_K está operativamente enlazado con el segmento C_L con el vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula huésped. El gen de la cadena de anticuerpo puede ser clonado en el vector de modo que el péptido de señal está enlazado en el marco con el terminal amino del gen de cadena de anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína de no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la invención llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de expresión en una célula huésped. El término "secuencia reguladora" está destinado a incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traslación de los genes de cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology, *Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, que incluye la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de dichos factores como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de la célula huésped de

mamífero incluyen elementos virales que dirigen los niveles altos de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus de simio 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal del adenovirus (AdMLP) y polioma. Alternativamente, se pueden usar las secuencias reguladoras no virales, tal como el promotor de la ubiquitina o promotor de β -globin. Aún mas, los elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SR α , el cual contiene secuencias del promotor temprano SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia humana de célula T tipo 1 [Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472].

Además de los genes de cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped dentro de las cuales se introduce el vector (ver, por ejemplo, US Pat. Nos. 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a los fármacos, tal como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de reductasa dihidrofolato (DHFR) (para usar en células huésped dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para la selección G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el(los) vector(es) de expresión que codifica cadenas pesada y ligera es transfectada en una célula huésped mediante técnicas estándar. Las diversas formas del término "transfección" están destinadas a abarcar una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped

procariótica o eucariótica, por ejemplo electroporación, precipitación de calcio-fosfato, transfección DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en ya sea células huésped procarióticas o eucarióticas, la expresión de los anticuerpos en células eucarióticas, y más preferentemente células huésped de mamífero, es la más preferida porque dichas células eucarióticas, y en particular las células de mamífero, es más probable que las células procarióticas se ensamblen y secreten un anticuerpo apropiadamente plegado e inmunológicamente activo. Se ha reportado que la expresión procariótica de genes de anticuerpo no es efectiva para la producción de altas producciones de anticuerpo activo [Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13].

Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), conjuntamente con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano [Foecking *et al.*, 1986, *Gene* 45:101; Cockett *et al.* (1990) *BioTechnology* 8:2], células de dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para usar con las células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión del gen GS divulgado en la WO 87/04462 (otorgada a Wilson), WO 89/01036 (otorgada Bebbington) y EP 338,841 (otorgada Bebbington).

Una variedad de sistemas de vector de expresión huésped puede utilizarse para expresar una molécula de anticuerpo de la invención. Dichos sistemas de expresión del huésped representan vehículos mediante los cuales las secuencias de codificación de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero

también representan células que, cuando se transforman o transfectan con las secuencias de codificación de nucleótido apropiado, pueden expresar la molécula del anticuerpo de la invención *in situ*. Estos pueden incluir pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con un ADN bacteriófago recombinante, ADN plásmido o vectores de expresión de ADN cósmido que contienen secuencias que codifican un anticuerpo; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen secuencias que codifican un anticuerpo; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión viral recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias que codifican el anticuerpo; sistemas de célula de planta infectados con los vectores de expresión viral recombinante (por ejemplo, virus de mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformado con los vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) conteniendo secuencias de codificación de anticuerpo; o sistemas de célula de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) promotores que contienen constructos de expresión recombinante de hospedaje derivados del genoma de las células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia).

En los sistemas bacterianos, un número de vectores de expresión puede seleccionarse ventajosamente, dependiendo del uso destinado para la molécula del anticuerpo que se está expresando. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de una proteína de este tipo, para la generación de composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de anticuerpo, pueden ser convenientes los vectores que dirigen la expresión de niveles altos de productos de proteína que se purifican fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.* (1983) *EMBO J.*

2:1791), en el que la secuencia de codificación del anticuerpo puede estar ligada individualmente en el vector en el marco con la región de codificación *lac Z* de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN [Inouye & Inouye (1985) *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509]; y los vectores pGEX similares también se pueden usar para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatona S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas mediante absorción y unión a perlas matriz de glutatona-agarosa seguido por elución en presencia de glutatona libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir trombina o sitios de escisión de proteasa Xa de modo que el producto del gen diana clonado puede ser liberado de la fracción de GST.

En un sistema de insectos, el virus de polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) se usa como vector para expresar los genes extraños. El virus se desarrolla en las células *Spodoptera frugiperda*. La secuencia que codifica el anticuerpo puede ser clonada individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo el gen de polihedrina) del virus y se coloca bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo el promotor de polihedrina). En células huésped de mamífero, se puede utilizar un número de sistemas de expresión basados en virus (por ejemplo, un sistema de expresión de adenovirus).

Según se discutió anteriormente, se puede elegir una cepa de célula huésped la cual modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto genético de la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos de proteína pueden ser importantes para la función de la proteína.

Para una producción de alto rendimiento de largo plazo de los anticuerpos recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de manera estable un anticuerpo de interés pueden producirse transfectando las células con un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótido del anticuerpo y la secuencia de nucleótido de un seleccionable (por ejemplo, neomicina o higromicina), y seleccionando la expresión del marcador seleccionable. Dichas líneas celulares diseñadas pueden ser particularmente útiles en el tamizado y la evaluación de los compuestos que interactúan directa o indirectamente con la molécula del anticuerpo.

Los niveles de expresión de la molécula del anticuerpo pueden ser incrementados mediante la amplificación del vector [para una revisión, ver Bebbington y Hentschel, El uso de los vectores basados en la amplificación genética para la expresión de genes clonados en células de mamífero en la clonación de ADN, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)]. Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Debido a que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará [Crouse *et al.*, 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257].

Cuando los genes del anticuerpo que codifica los vectores de expresión recombinante se introducen en las células huéspedes de un mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se desarrollan las células huésped. Una vez que la molécula del anticuerpo de la invención ha sido expresada de manera recombinante, esta se puede purificar mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de

una molécula de anticuerpo, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por afinidad tal como con una proteína A o un antígeno específico, y cromatografía de columna de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de las proteínas.

Alternativamente, cualquier proteína de fusión puede purificarse fácilmente utilizando un anticuerpo específico para la proteína de fusión que es expresada. Por ejemplo, un Sistema descrito por Janknecht *et al.* permite la fácil purificación de las proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en las líneas celulares humanas [Janknecht *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8972-897]. En este sistema, el gen de interés es subclonado en un plásmido de recombinación de vaccinia de modo que el marco de lectura abierto del gen es traslacional fusionado a una etiqueta de terminal amino de seis residuos de histidina. La etiqueta sirve como un dominio de unión de matriz para la proteína de fusión. Los extractos de las células infectadas con el virus de vaccinia recombinante son cargados en las columnas de ácido nitriloacético Ni^{2+} -agarosa y las proteínas etiquetadas histidina son selectivamente eluidas con tampón que contienen imidazol.

Caracterización de Unión de Anticuerpo a Antígeno

Los anticuerpos que son generados por estos métodos pueden seleccionarse entonces tamizando primero para la afinidad y la especificidad con el polipéptido purificado de interés y, de ser requerido, comparando los resultados con la afinidad y la especificidad de los anticuerpos con los polipéptidos que se desean excluir de la unión. Los anticuerpos pueden ser examinados para la unión con la BST1, por ejemplo, mediante ELISA estándar. El procedimiento de tamizado puede involucrar inmovilización de los polipéptidos purificados en cavidades separadas de placas de microtitulación. La solución que contiene un

anticuerpo potencial o grupos de anticuerpos se coloca luego en las respectivas cavidades de microtitulación y se incuban durante aproximadamente 30 minutos a 2 horas. Las cavidades de microtitulación son luego lavadas y un anticuerpo secundario rotulado (por ejemplo, un anticuerpo anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina si los anticuerpos producidos son anticuerpos de ratón) se añade a las cavidades y se incuban durante aproximadamente 30 minutos y luego se lavan. El sustrato se añade a las cavidades y una reacción de color aparecerá cuando el anticuerpo esté presente al (a los) polipéptido(s) inmovilizado(s).

Los anticuerpos así identificados pueden ser luego analizados adicionalmente para la afinidad y la especificidad en el diseño de ensayo seleccionado. En el desarrollo de inmunoensayos para una proteína diana, la proteína diana purificada actúa como un estándar con el cual se juzga la sensibilidad y la especificidad del inmunoensayo usando los anticuerpos que se han seleccionado. Debido a que la afinidad de unión de varios anticuerpos puede diferir, ciertos pares de anticuerpos (por ejemplo, en ensayos tipo sándwich) pueden interferir entre sí estéricamente, etc., el rendimiento del ensayo de un anticuerpo puede ser una medida más importante que la afinidad absoluta y la especificidad de un anticuerpo.

Los expertos en la técnica reconocerán que se pueden hacer muchos planteamientos en la producción de anticuerpos o fragmentos de unión y tamizado y selección de afinidad y especificidad para los diversos polipéptidos, pero estos planteamientos no cambian el ámbito de la invención.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-BST1 seleccionados se unen a los únicos epítomos, cada anticuerpo puede ser biotinilado usando reactivos comercialmente disponibles (Pierce, Rockford, IL). Los estudios de competición que usan anticuerpos monoclonales no rotulados y anticuerpos

monoclonales biotinilados se pueden realizar usando las placas de ELISA recubiertas de BST1. La unión mAb biotinilada puede detectarse con una sonda fosfatasa de estreptavidina-alcalina.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, se puede realizar ELISAs de isotipo usando reactivos específicos para los anticuerpos de un isotipo particular.

Los anticuerpos anti-BST1 se pueden examinar adicionalmente para su reactividad con el antígeno de BST1 mediante Western blot. En resumen, la BST1 se puede preparar y someter a electroforesis de gel de sodio dodecilsulfato poliacrilamida. Después de la electroforesis, los antígenos separados son transferidos a las membranas de nitrocelulosa, se bloquean con 10% suero fetal de ternero, y se sondeó con los anticuerpos monoclonales que se van a examinar.

La especificidad de unión de un anticuerpo de la invención también se puede determinar monitoreando la unión del anticuerpo con las células que expresan BST1, por ejemplo, mediante citometría de flujo. Típicamente, una línea celular, tal como una línea celular de CHO, puede ser transfectada con un vector de expresión que codifica la BST1. La proteína transfectada puede comprender una etiqueta, tal como una etiqueta myc, preferentemente en el terminal N, para la detección usando un anticuerpo para la etiqueta. La unión de un anticuerpo de la invención a la BST1 puede determinarse incubando las células transfectadas con el anticuerpo, y detectando el anticuerpo unido. La unión de un anticuerpo con la etiqueta en la proteína transfectada puede usarse como un control positivo.

La especificidad de un anticuerpo de la invención para la BST1 pueden estudiarse adicionalmente determinando si el anticuerpo se une o no a otras

proteínas, tal como otro miembro de la familia Eph usando los mismos métodos mediante los cuales se determinó la unión a la BST1.

Inmunconjugados

En otro aspecto, la presente invención caracteriza un anticuerpo anti-BST1, o un fragmento del mismo, conjugado con una fracción terapéutica, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Dichos conjugados son referidos aquí como "inmunconjugados". Los inmunconjugados que incluyen una o más citotoxinas están referidos como "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye un agente que es perjudicial para las células (por ejemplo, que matan). Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen además, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que se pueden conjugar a un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, calicheamicinas,

maytansines y auristatinas, y derivados de los mismos. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo de calicheamicina está comercialmente disponible (Mylotarg[®]; American Home Products).

Las citotoxinas se pueden conjugar a anticuerpos de la invención usando tecnología de enlazador disponible en la técnica. Los ejemplos de los tipos de enlazador que se han usado para conjugar una citotoxina a un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptido. Un enlazador puede ser elegido para que sea, por ejemplo, susceptible a escisión por un pH bajo en el compartimiento de lisosoma o susceptible a escisión por proteasas, tales como proteasas preferencialmente expresadas en el tejido tumoral tal como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

Los ejemplos de citotoxinas se describen, por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Nos. 6,989,452, 7,087,600, y 7,129,261, y en las Solicitudes PCT Nos. PCT/US2002/17210, PCT/US2005/017804, PCT/US2006/37793, PCT/US2006/060050, PCT/US2006/060711, WO2006/110476, y la Solicitud de Patente Estadounidense No. 60/891,028, todas las cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Para una mayor discusión de los tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar los agente terapéuticos a los anticuerpos, ver también Saito, G. *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden ser conjugados a un isótopo radioactivo para generar radiofármacos citotóxicos, también referidos

como radioinmunoconjugados. Los ejemplos de los isótopos radioactivos que se pueden conjugar a anticuerpos para usar diagnóstica o terapéuticamente incluyen, pero sin limitación, yodo¹³¹, indio¹¹¹, itrio⁹⁰ y lutecio¹⁷⁷. Los métodos para preparar radioinmunoconjugados se establecen en la técnica. Los ejemplos de radioinmunoconjugados están comercialmente disponibles, incluyendo Zevalin® (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals), y los métodos similares se pueden usar para preparar radioinmunoconjugados usando los anticuerpos de la invención.

Los conjugados de anticuerpo de la invención pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, y la fracción de fármaco no debe interpretarse como limitada a los clásicos agentes terapéuticos químicos. Por ejemplo, la fracción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que tiene una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina de la difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón- γ ; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de la colonia de granulocito macrófago ("GM-CSF"), factor estimulador de la colonia de granulocito ("G-CSF"), u otros factores de desarrollo.

Las técnicas para conjugar dicha fracción terapéutica a los anticuerpos son bien conocidas, ver, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Anticuerpos monoclonales For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," en *Anticuerpos monoclonales y Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Anticuerpos For Drug Delivery," en *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Anticuerpo Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en

Anticuerpos monoclonales '84: Biological y Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, y Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Anticuerpo In Cancer Therapy," en *Anticuerpos monoclonales For Cancer Detection y Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Moléculas Biespecíficas

En otro aspecto, la presente invención caracteriza moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-BST1, o un fragmento del mismo, de la invención. Un anticuerpo de la invención, o porciones de unión a antígeno del mismo, puede ser derivado o enlazado con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une con por lo menos dos sitios de unión diferentes o moléculas diana. El anticuerpo de la invención puede de hecho ser derivado o enlazado con más de una molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se unen con más de dos sitios de unión diferentes y/o moléculas diana; dichas moléculas multiespecíficas también están destinadas a ser abarcadas por el término "molécula biespecífica" según se usa aquí. Para crear una molécula biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención puede ser enlazado funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra forma) con una o más de las otras moléculas de unión, tal como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de modo que resulte una molécula biespecífica.

En consecuencia, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden por lo menos una primera especificidad de unión para un primer epítipo diana (es decir BST1) y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo diana. El segundo epítipo diana puede estar presente en la

misma proteína diana como aquella mediante la primera especificidad de unión; o el segundo epítipo diana puede estar presente de una proteína diana diferente a la enlazada por la primera proteína a la enlazada por la primera especificidad de unión. El segundo epítipo diana puede estar presente en la misma célula que el primer epítipo diana (es decir BST1); o el segundo epítipo diana puede estar presente en una diana que no es mostrada por la célula que muestra el primer epítipo diana. Según se usa aquí, el término 'especificidad de unión' se refiere a una fracción que comprende por lo menos un dominio variable de anticuerpo.

En una modalidad de la invención, el segundo epítipo diana es un receptor Fc, por ejemplo, receptor Fc γ RI humano (CD64) o un receptor Fc α humano (CD89). Por lo tanto, la invención incluye moléculas biespecíficas capaces de unirse tanto a Fc γ R o Fc α R que expresa las células efectoras (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMNs), y a células diana que expresan BST1. Estas moléculas biespecíficas que tienen como objetivo BST1 que expresan células para la célula efectora y activan las actividades de la célula efectora mediada por el receptor Fc, tal como fagocitosis de células que expresan BST1, la citotoxicidad mediada por la célula dependiente del anticuerpo (ADCC), la liberación de citoquina, o generación de anión superóxido.

En otra modalidad de la invención, el segundo epítipo diana es CD3 o CD5. Por lo tanto, la invención incluye moléculas biespecíficas capaces de unirse tanto a las células efectoras que expresan CD3 o CD5 (por ejemplo, células T citotóxicas que expresan CD3 o CD5), y a células diana que expresan BST1. Estas moléculas biespecíficas diana BST1 que expresan células a la célula efectora y accionan las actividades de la célula efectora mediadas por CD3 o CD5, de modo que la expansión clonal de la célula T la citotoxicidad de la célula T. En esta modalidad, el anticuerpo biespecífico de la invención puede tener un total de ya sea dos o tres dominios variables de anticuerpo, en donde la primera porción

del anticuerpo biespecífico es capaz de reclutamiento de la actividad de una célula efectora inmune humana uniendo específicamente a un antígeno efector localizado en la célula efectora inmune humana, en la que el antígeno efector es el antígeno humano CD3 o CD5, consistiendo dicha primera porción de una dominio variable de anticuerpo, y una segunda porción de anticuerpo biespecífico que es capaz de unirse específicamente con un antígeno diana diferente al antígeno efector por ejemplo BST1, estando dicho antígeno diana localizado en una célula diana diferente a dicha célula efectora inmune humana, y comprendiendo dicha segunda porción uno o dos dominios variables de anticuerpo.

En una modalidad de la invención en la que la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede incluir además una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc o especificidad de unión anti-CD3 o CD5 y una especificidad de unión anti-BST1. En una modalidad, la tercera especificidad de unión es una porción del factor anti-mejora (EF), por ejemplo, una molécula que se une a una proteína de superficie involucrada en una actividad de citotoxicidad y aumenta de este modo la respuesta inmune contra la célula diana. La "porción del factor anti-mejora" puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y da como resultado una mejora del efecto de los determinantes de unión para el receptor Fc o el antígeno de la célula diana. La "porción del factor anti-mejora" puede unir un receptor Fc o un antígeno de la célula diana. Alternativamente, la porción del factor anti-mejora puede unirse a una entidad que es diferente de la entidad a la que se une las primera y segunda especificidad de unión. Por ejemplo, la porción del factor anti-mejora puede unir una célula T citotóxica (por ejemplo, vía CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmune que da como resultado una respuesta inmune aumentada frente a la célula diana).

En una modalidad, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden como una especificidad de unión por lo menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, dAb o Fv de una sola cadena. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o un constructo de una sola cadena como se describe en la Patente Estadounidense No. 4,946,778, cuyo contenido está expresamente incorporado como referencia.

En una modalidad, la especificidad de unión para un receptor de Fc γ se proporciona mediante un anticuerpo monoclonal, cuya unión no está bloqueada por la inmunoglobulina humana G (IgG). Según se usa aquí, el término "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena γ localizados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas de transmembrana o de receptor soluble que están agrupadas en tres clases de receptor de Fc γ : Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), y Fc γ RIII (CD16). En una modalidad preferida, el receptor de Fc γ es un Fc γ RI humano de alta afinidad. El Fc γ RI humano es una molécula 72 kDa, que muestra una alta afinidad para el IgG (10^8 - 10^9 M⁻¹) monomérico.

La producción y caracterización de ciertos anticuerpos monoclonales anti-Fc γ preferidos se describen en la Publicación PCT WO 88/00052 y la Patente Estadounidense No. 4,954,617, cuyos planteamientos se incorporan completamente aquí como referencia. Estos anticuerpos se unen con un epítipo de Fc γ RI, Fc γ RII o Fc γ RIII en un sitio que es distinto del sitio de unión de Fc γ del receptor y, de este modo, su unión no está bloqueada sustancialmente por los niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos anti-Fc γ RI específicos útiles en esta invención son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. La hibridoma que produce mAb 32 está disponible en la American Type Culture Collection, ATCC Acceso No. HB9469. En otras modalidades, el anticuerpo receptor de anti-Fc γ

receptor es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R.F. *et al.* (1995) *J. Immunol* 155 (10): 4996-5002 y la Publicación PCT WO 94/10332. El anticuerpo H22 que produce la línea celular fue depositado en la American Type Culture Collection bajo designación HA022CL1 y tiene el acceso No. CRL 11177.

En incluso otras modalidades preferidas, la especificidad de unión para un receptor de Fc es proporcionada por un anticuerpo que se une con un receptor humano de IgA, por ejemplo, un receptor Fc-alfa [Fc α RI (CD89)], cuya unión no está preferentemente bloqueada por la inmunoglobulina humana A (IgA). El término "receptor de IgA" está destinado a incluir la producción genética de un gen α (Fc α RI) localizado en el cromosoma 19. Este gen es conocido por codificar varias isoformas de transmembrana alternativamente empalmadas de 55 a 110 kDa. El Fc α RI (CD89) está constitutivamente expresada en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en poblaciones de células no efectoras. El Fc α RI tiene afinidad media ($\approx 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) para tanto IgA1 como para IgA2, que aumenta con la exposición a las citoquinas tales como G-CSF o GM-CSF [Morton, H.C. *et al.* (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440]. Cuatro anticuerpos monoclonales Fc α RI-específicos, identificados como A3, A59, A62 y A77, que unen Fc α RI fuera del dominio de unión del ligando IgA, han sido descritos [Monteiro, R.C. *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148:1764].

Fc α RI y Fc γ RI son receptores de activación para usar en las moléculas biespecíficas de la invención porque estos (1) se expresan principalmente en células efectoras inmunes, por ejemplo, monocitos, PMNs, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan a altos niveles (por ejemplo, 5,000-100,000 por célula); (3) son mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); y

(4) median la presentación del antígeno mejorado de los antígenos, incluyendo autoantígenos, dirigidos a los mismos.

Los anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas de la invención son anticuerpos monoclonales de murino, humanos, quiméricos y humanizados.

Las moléculas biespecíficas de la presente invención se pueden preparar conjugando las especificidades de unión del constituyente, por ejemplo, las especificidades de unión anti-FcR, anti-CD3, anti-CD5 y anti-BST1, usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la especificidad de unión de cada molécula biespecífica puede ser generada de manera separada y luego conjugarse entre sí. Cuando las especificidades son proteínas o péptidos, una variedad de agentes de acoplamiento o reticulación se puede usar para la conjugación covalente. Los ejemplos de agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilenodimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) [ver por ejemplo, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648]. Otros métodos incluyen los descritos en Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83, y Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375. Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)].

Se realizó un trabajo bivalente adicional para los biespecíficos diseñando una unión dual en los formatos similares al anticuerpo de longitud completa (Wu *et al.*, 2007, *Nature Biotechnology* 25[11]:1290-1297; USSN12/477,711; Michaelson *et al.*, 2009, *mAbs* 1[2]:128-141; PCT/US2008/074693; Zuo *et al.*, 2000, *Protein*

Engineering 13[5]:361-367; USSN09/865,198; Shen et al., 2006, J Biol Chem 281[16]:10706-10714; Lu et al., 2005, J Biol Chem 280[20]:19665-19672; PCT/US2005/025472; expresamente incorporados aquí como referencia).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, estas se pueden conjugar vía unión sulfidrilo de regiones bisagra de terminal C de las dos cadenas pesadas. En una modalidad particularmente preferida, la región bisagra es modificada para contener un número impar de residuos de sulfidrilo, preferentemente uno, antes de la conjugación.

Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden ser codificadas en el mismo vector y expresadas y ensambladas en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula de una sola cadena que comprende un anticuerpo de una sola cadena y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de una sola cadena que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender por lo menos dos moléculas de una sola cadena. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen por ejemplo en las Patentes Estadounidenses Números 5,260,203; 5,455,030; 4,881,175; 5,132,405; 5,091,513; 5,476,786; 5,013,653; 5,258,498; y 5,482,858, todas las cuales se incorporan expresamente aquí como referencia.

La unión de las moléculas biespecíficas con sus dianas específicas puede confirmarse mediante, por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición del desarrollo), o ensayo Western Blot. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos de proteína-anticuerpo de interés

particular empleando un reactivo rotulado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos del anticuerpo FcR pueden ser detectados usando por ejemplo un anticuerpo enlazado con enzima o un fragmento de anticuerpo que reconoce y se une específicamente con los complejos de anticuerpo-FcR. Alternativamente, los complejos pueden ser detectados usando una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser radioactivamente rotulado y usado en un radioinmunoensayo (RIA) (ver, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, Marzo, 1986, que se incorpora aquí como referencia). El isótopo radioactivo puede ser detectado mediante medios tales como un contador y o un contador de centelleo o mediante autoradiografía.

Fragmentos de Anticuerpo y Miméticos de Anticuerpo

La presente invención no está limitada a los anticuerpos tradicionales y puede ponerse en práctica mediante el uso de fragmentos de anticuerpo y miméticos de anticuerpo. Como se detalla más adelante, una amplia variedad de tecnologías de fragmentos de anticuerpo y miméticos de anticuerpo se ha desarrollado ahora y son ampliamente conocidas en la técnica. Si bien un número de estas tecnologías, tales como anticuerpos de dominio, Nanobodies, y UniBodies usan fragmentos de, u otras modificaciones a, las estructuras tradicionales de anticuerpo, hay además tecnologías alternativas, tales como Affibodies, DARPins, Anticalins, Avimers, y Versabodies que emplean estructuras de unión que, mientras imitan la unión tradicional del anticuerpo, se generan a partir de y funcionan vía distintos mecanismos.

Los anticuerpos de dominio (dAbs) son las unidades más pequeñas de unión funcional de anticuerpos, que corresponden con las regiones variables de ya

sea las cadenas pesada (V_H) o ligera (V_L) de los anticuerpos humanos. Los Anticuerpo de Dominio tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa. Domantis ha desarrollado una serie de bibliotecas grandes y altamente funcionales de V_H y V_L dAbs humanas (más de diez mil millones de secuencias diferentes en cada biblioteca), y utiliza estas bibliotecas para seleccionar dAbs que son específicos para las dianas terapéuticas. Contrariamente a muchos anticuerpos convencionales, los anticuerpos de dominio están bien expresados en los sistemas bacterianos, de levadura y sistemas de célula de mamífero. Mayores detalles de anticuerpos de dominio y métodos de producción de los mismos pueden obtenerse refiriéndose a las Patentes Estadounidenses Nos. 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; 6,172,197; 6,696,245; US Serie No. 2004/0110941; solicitud de patente Europea No. 1433846 y Patentes Europeas 0368684 & 0616640; WO05/035572, WO04/101790, WO04/081026, WO04/058821, WO04/003019 y WO03/002609, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Los Nanobodies son proteínas terapéuticas derivadas de un anticuerpo que contienen propiedades estructurales y funcionales únicas de anticuerpos de cadena pesada que se presentan de manera natural. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un único dominio variable (V_{HH}) y dos dominios constantes (C_{H2} y C_{H3}). De manera importante, el dominio clonado y aislado V_{HH} es un polipéptido perfectamente estable que hospeda la capacidad completa de unión a antígeno del anticuerpo de cadena pesada original. Los Nanobodies tienen una alta homología con los dominios V_H de los anticuerpos humanos y pueden ser además humanizados sin ninguna pérdida de actividad. De manera importante, los Nanobodies tienen un bajo potencial inmunogénico, el cual se ha confirmado en estudios con primates con compuestos de plomo Nanobody.

Los Nanobodies combinan las ventajas de los anticuerpos convencionales con características importantes de fármacos de molécula pequeña. Al igual que los anticuerpos convencionales, los Nanobodies muestran una alta especificidad de diana, una alta afinidad para su diana y una baja toxicidad inherente. Sin embargo, como los fármacos de molécula pequeña estos pueden inhibir enzimas y acceder fácilmente a las grietas del receptor. Más aún, los Nanobodies son sumamente estables, se pueden administrar por medios diferentes a la inyección (ver, por ejemplo, la WO 04/041867, la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad) y son de fácil fabricación. Las otras ventajas de los Nanobodies incluyen el reconocimiento de los epítomos comunes y ocultos como resultado de su tamaño pequeño, la unión en las cavidades o sitios activos de las dianas de proteína con alta afinidad y selectividad debido a su flexibilidad tridimensional única, flexibilidad del formato del fármaco, adaptación de la vida media y fácil y rápido descubrimiento del fármaco.

Los Nanobodies son codificados mediante genes individuales y se producen eficientemente en casi todos los huéspedes procarióticos y eucarióticos por ejemplo, *E. coli* (ver por ejemplo, US 6,765,087, la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad), moldes (por ejemplo *Aspergillus* o *Trichoderma*) y levadura (por ejemplo *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia*) (ver, por ejemplo, US 6,838,254, la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad). El proceso de producción es escalable y se han producido cantidades en kilogramos de Nanobodies. Debido a que los Nanobodies presentan una estabilidad superior comparada con los anticuerpos convencionales, estos se pueden formular como una solución lista para usar y de larga vida útil.

El método de Nanoclon (ver, por ejemplo, la WO 06/079372, la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad) es un método de propietario para generar Nanobodies frente a una diana deseada, en base a una selección

automatizada de altura-totalidad de las células B y se podrían usar en el contexto de la presente invención.

Los UniBodies representan otra tecnología de fragmento de anticuerpo; sin embargo esta se basa en la remoción de la región bisagra de los anticuerpos IgG4. La eliminación de la región bisagra da como resultado una molécula que es esencialmente la mitad del tamaño de los anticuerpos IgG4 tradicionales y tiene una región de unión univalente antes que la región de unión bivalente de los anticuerpos IgG4. También es bien conocido que los anticuerpos IgG4 son inertes y de este modo no interactúan con el sistema inmune, lo cual puede ser ventajoso para el tratamiento de enfermedades en donde no se desea una respuesta inmune, y esta ventaja se pasa a los UniBodies. Por ejemplo, los UniBodies pueden funcionar para inhibir o silenciar, pero no matar, las células a las cuales se unen. Adicionalmente, la unión del UniBody con las células cancerosas no las estimulan para que proliferen. Además, debido a que los UniBodies son aproximadamente la mitad del tamaño de los anticuerpos IgG4 tradicionales, estos pueden mostrar una mejor distribución en tumores sólidos más grandes con una eficacia potencialmente ventajosa. Los UniBodies son limpiados del cuerpo a una velocidad similar a la totalidad de anticuerpos IgG4 y están en condiciones de unirse con una afinidad similar para sus antígenos como anticuerpos totales. Más detalles sobre los UniBodies se pueden obtener con referencia a la publicación de patente WO2007/059782, la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Las moléculas de Affibody representan una nueva clase de proteínas de afinidad en base a un dominio de proteína de residuo 58-aminoácido, derivada de uno de los dominios de unión a IgG de proteína estafilocócica A. Este dominio de grupo de tres hélices ha sido usado como un andamio para la construcción de las bibliotecas fagémicas combinatorias, desde las que las variantes de Affibody que

tiene como objetivo las moléculas deseadas se pueden seleccionar usando la tecnología de presentación de fagos [Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA (1997) 'Binding proteínas selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain' *Nat Biotechnol* 15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA (2002) 'Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A' *Eur J Biochem.* 269:2647-55.]. La estructura simple y robusta de las moléculas del Affibody en combinación con su bajo peso molecular (6 kDa), las hacen apropiadas para una amplia variedad de aplicaciones, por ejemplo, como reactivos de detección [Ronmark J. *et al.* (2002) 'Construction y characterization of affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*' *J Immunol Methods* 261:199-211] y to inhibit receptor interactions [Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA (2003) 'Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering' *Protein Eng* 16:691-7]. Mayores detalles de Affibodies y métodos de producción de los mismos se pueden obtener con referencia a la Patente Estadounidense No. 5831012 la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Los Affibodies rotulados también pueden ser útiles en aplicaciones de formación de imágenes para determinar la abundancia de isoformas.

Las DARPins (Designed Ankyrin Repeat Proteínas) (proteínas diseñadas con repetición de anquirina) son un ejemplo de una tecnología de mimético de anticuerpo DRP (Designed Repeat Protein) (proteína con repetición diseñada) que se ha desarrollado para explotar las capacidades de unión de los polipéptidos que no son de anticuerpo. Las proteínas con repetición tales como las proteínas con repetición de anquirina o enriquecidas con leucina, son moléculas de unión ubicua, que se presentan, a diferencia de los anticuerpos, intra y extracelularmente. Su única arquitectura modular caracteriza las unidades estructurales de repetición

(repeticiones), que se juntan entre sí para formar dominios de repetición alargada que muestran superficies de unión a antígeno variable y modular. En base a su modularidad, se pueden generar bibliotecas combinatorias de polipéptidos con especificidades de unión altamente diversificadas. Esta estrategia incluye el diseño de consenso de las repeticiones autocompatibles que muestran residuos superficiales variables y su ensamblaje aleatorio en los dominios de repetición.

Las DARPins se pueden producir en sistemas de expresión bacteriana con rendimientos altos y pertenecen a las proteínas más estables conocidas. Se han seleccionado las DARPins altamente específicas, de alta afinidad para un rango amplio de proteínas diana, que incluyen receptores humanos, citoquinas, quinasas, proteasas humanas, virus y proteínas de membrana. Se pueden obtener DARPins que tienen afinidades en el rango de nanomolar de un solo dígito a picomolar.

Las DARPins se han usado en un amplio rango de aplicaciones, incluyendo ELISA, ELISA sándwich, análisis citométrico de flujo (FACS), inmunohistoquímica (IHC), aplicaciones de chip, purificación por afinidad o Western blot. Las DARPins también demostraron ser altamente activas en el compartimiento intracelular, por ejemplo, como proteínas marcadoras intracelular fusionadas con la proteína fluorescente verde (GFP). Las DARPins se usaron además para inhibir la entrada viral con IC50 en el rango pM. Las DARPins no son solamente ideales para bloquear las interacciones de proteína-proteína, si no además para inhibir las enzimas. Las proteasas, quinasas y transportadores han sido exitosamente inhibidas, muy a menudo de un modo de inhibición alostérico. Los enriquecimientos sumamente rápidos y específicos en el tumor y el tumor muy favorable para las proporciones de sangre forman las DARPins bien apropiadas para los planteamientos de diagnóstico o terapéuticos *in vivo*.

La información adicional respecto a las DARPin y otras tecnologías DRP se pueden encontrar en la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 2004/0132028, y la Publicación de Patente Internacional No. WO 02/20565, siendo ambas incorporadas aquí como referencia en su totalidad.

Los anticalinas representan una tecnología adicional de mimético de anticuerpo. Sin embargo en este caso la especificidad de unión se deriva de las lipocalinas, una familia de proteínas de bajo peso molecular que están natural y abundantemente expresadas en tejidos humanos y fluidos corporales. Las lipocalinas han evolucionado para realizar una serie de funciones in vivo asociadas con el transporte fisiológico y el almacenamiento de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Las lipocalinas tienen una estructura intrínseca robusta que comprende un tronco β altamente conservado que soporta cuatro circuitos en una terminal de la proteína. Estos circuitos forman la entrada a un bolsillo de unión y se diferencia de manera conformacional en esta parte de la molécula que da cuenta de la variación en la especificidad de unión entre las lipocalinas individuales.

Si bien la estructura total de los circuitos hipervariables soportados por un marco de lámina β conservado es reminiscente de inmunoglobulinas, las lipocalinas difieren considerablemente de los anticuerpos en términos de tamaño, estando compuestas de una única cadena de polipéptido de 160-180 aminoácidos que es marginalmente mayor que un único dominio de inmunoglobulina.

Las lipocalinas son clonadas y sus circuitos se someten a diseño para crear Anticalinas. Las bibliotecas de Anticalinas estructuralmente diversas han sido generadas y la presentación de Anticalina permite la selección y el tamizado de la función de unión, seguido por la expresión y producción de una proteína soluble para un posterior análisis en los sistemas procarióticos o eucarióticos. Los

estudios han demostrado exitosamente que las Anticalinas pueden desarrollarse, que son específicas para virtualmente cualquier proteína diana humana, que pueden aislarse y que se pueden obtener afinidades de unión en el rango nanomolar o superior.

Las Anticalinas también se pueden formatear como proteínas de direccionamiento dual, denominadas Duocalinas. Una Duocalina une dos dianas terapéuticas separadas en una proteína monomérica fácilmente producida usando procesos de elaboración estándar mientras se conserva la especificidad diana y la afinidad independientemente de la orientación estructural de sus dos dominios de unión.

La modulación de dianas múltiples mediante una sola molécula es particularmente ventajosa en enfermedades que se sabe que comprenden más de un único factor causal. Más aún, los formatos de unión bi o multivalente tales como Duocalinas tienen un potencial significativo en las moléculas de superficie celular de direccionamiento en la enfermedad, en la mediación de los efectos agonísticos en las vías de transducción de señal o la inducción de los efectos de internalización mejorada vía unión y agrupación de los receptores de superficie celular. Más aún, la estabilidad intrínseca alta de las Duocalinas es comparable con las Anticalinas monoméricas, ofreciendo una formulación flexible y potencial de administración para las Duocalinas.

La información adicional respecto a las Anticalinas se puede encontrar en la Patente Estadounidense No. 7,250,297 y la Publicación de Patente Internacional No. WO 99/16873, siendo ambas incorporadas aquí como referencia en su totalidad.

Otra tecnología de mimético de anticuerpo útil en el contexto de la presente invención son los Avímeros. Los Avímeros evolucionan de una familia grande de dominios del receptor extracelular humano mediante arrastramiento exón *in vitro* y presentación en fagos, generando proteínas de multidominio con propiedades de unión y de inhibición. Se ha demostrado que el enlace de dominios de unión independiente múltiple crea aidez y da como resultado una afinidad mejorada y especificidad comparado con las proteínas convencionales de unión a un solo antígeno. Otras ventajas potenciales incluyen una producción simple y eficiente de moléculas multidiana-específicas en *Escherichia coli*, termoestabilidad mejorada y resistencia a las proteasas. Los Avímeros con afinidades subnanomolares se han obtenido frente a una variedad de dianas.

Información adicional respecto a los Avímeros se puede encontrar en las Publicaciones de Patente Estadounidense Nos. 2006/0286603, 2006/0234299, 2006/0223114, 2006/0177831, 2006/0008844, 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0089932, 2005/0053973, 2005/0048512, 2004/0175756, todas las cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Los Versabodies representan otra tecnología de mimético de anticuerpo que podría usarse en el contexto de la presente invención. Los Versabodies son proteínas pequeñas de 3-5 kDa con >15% cisteínas, que forman un andamio de alta densidad de disulfuro, reemplazando el núcleo hidrófobo que tienen las proteínas típicas. El reemplazo de un número grande de aminoácidos hidrófobos, que comprende el núcleo hidrófobo, con un número pequeño de disulfuros da como resultado una proteína que es más pequeña, más hidrófila (menos agregación y unión no específica), más resistente a las proteasas y el calor, y tiene menor densidad de los epítomos de célula T, porque los residuos que contribuyen más a la presentación MHC son hidrófobos. Se sabe bien que todas

estas cuatro propiedades afectan la inmunogenicidad, y se espera que juntas causen una gran disminución de la inmunogenicidad.

La inspiración para los Versabodies proviene de los productos biofarmacéuticos inyectables naturales producidos por sanguijuelas, serpientes, arañas, escorpiones, caracoles, y anémonas, que se sabe que presentan inmunogenicidad inesperadamente baja. Comenzando con las familias de proteínas naturales seleccionadas, diseñando y tamizando el tamaño, la hidrofobicidad, el procesamiento de antígeno proteolítico y la densidad del epítipo se minimizan a niveles muy por debajo del promedio para las proteínas inyectables naturales.

Dada la estructura de los Versabodies, estos miméticos de anticuerpo ofrecen un formato versátil que incluye multivalencia, multiespecificidad, una diversidad de mecanismos de vida media, módulos de direccionamiento de tejido y la ausencia de la región del anticuerpo Fc. Más aún, los Versabodies son elaborados en *E. coli* a altos rendimientos, y debido a su hidrofiliidad y tamaño pequeño, los Versabodies son altamente solubles y pueden ser formulados a altas concentraciones. Los Versabodies son estables excepcionalmente calientes (se pueden hervir) y ofrecen una vida útil extendida.

Información adicional respecto a los Versabodies se puede encontrar en la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 2007/0191272 la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

La descripción detallada del fragmento de anticuerpo y las tecnologías de mimético de anticuerpo anteriormente proporcionadas no pretenden ser una lista completa de todas las tecnologías que podrían usarse en el contexto de la presente descripción. Por ejemplo, y además no a manera de limitación, una

variedad de tecnologías adicionales que incluyen tecnologías alternativas basadas en polipéptido, tales como fusiones de las regiones de determinación de la complementariedad como lo bosqueja Qui *et al.* (2007) *Nature Biotechnology* 25(8):921-929, la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad, así como las tecnologías basadas en ácido nucleico, tales como las tecnologías de aptámero ARN descritas en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,789,157, 5,864,026, 5,712,375, 5,763,566, 6,013,443, 6,376,474, 6,613,526, 6,114,120, 6,261,774, y 6,387,620, todas las cuales se incorporan aquí como referencia, se pueden usar en el contexto de de la presente invención.

Composiciones Farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o porción(es) de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención, formulados junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos, o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o biespecíficos) que se unen a diferentes epítomos en el antígeno diana o que tienen actividades de complementariedad.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en una terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anti-anticuerpo de la presente invención combinado con por lo menos otro agente antitumoral, o un agente antiinflamatorio o inmunosupresor. Los ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden usar en una terapia de combinación se describen más

detalladamente a continuación en la sección sobre los usos de los anticuerpos de la invención.

Según se usa aquí, un "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera o todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de retardo isotónico y de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador es apropiado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, el inmunoconjugado, o la molécula biespecífica, puede estar recubierto de un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparte efectos toxicológicos no deseados [ver, por ejemplo, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19]. Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono y dicarboxílico, ácidos alcanoico sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoico, ácidos aromáticos, ácidos alifático y aromático sulfónico y similares. Las sales de adición de base incluyen las derivadas de metales de tierra alcalina, tal como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína y similares.

Una composición farmacéutica de la invención puede incluir además un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes hidrosolubles, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabilsulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metal, tal como ácido cítrico, ácido etilenediaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Los ejemplos de portadores apropiados acuosos y no acuosos que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tal como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas apropiadas de los mismos, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tal como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de surfactantes.

Las composiciones pueden además contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse tanto mediante procesos de esterilización, arriba, y mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico de fenol, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada

por la inclusión de agentes que retardan la absorción tal como aluminio monoestearato y gelatina.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquiera de los medios o agentes convencionales se incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas tienen que ser típicamente estériles y estables bajo condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada apropiada para una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un solvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas apropiadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de surfactantes. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o

una combinación de ingredientes anteriormente enumerados, según se requiera, seguido por microfiltración por esterilización. Por lo general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos anteriormente enumerados. En el caso de los polvos estériles para la preparación de las soluciones de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente estéril y filtrada del mismo.

La cantidad del ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del sujeto que está siendo tratado, y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación individual será por lo general aquella cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Por lo general, fuera de 100 por ciento, esta cantidad fluctuará desde aproximadamente 0.01 por ciento a aproximadamente 99 por ciento del ingrediente activo, preferentemente desde aproximadamente 0.1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, más preferentemente desde aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento del ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, un único bolo puede administrarse, varias dosis divididas pueden administrarse durante el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en una forma unitaria de dosificación para

una fácil administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación según se usa aquí se refiere a las unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en colaboración con el portador farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación de la invención son dictadas por y dependen directamente de (a) las únicas características del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se va a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la formación de compuestos tales como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en los individuos.

Para la administración del anticuerpo, la dosificación fluctúa desde aproximadamente 0.0001 a 100 mg/kg, y más usualmente 0.01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden tener 0,3 mg/kg por peso corporal, 1 mg/kg por peso corporal, 3 mg/kg por peso corporal, 5 mg/kg por peso corporal o 10 mg/kg por peso corporal o en el rango de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar involucra administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada 6 meses. Los regímenes de dosificación preferida para un anticuerpo anti-BST1 de la invención incluyen 1 mg/kg por peso corporal o 3 mg/kg por peso corporal vía administración intravenosa, usando el anticuerpo dado los siguientes esquemas de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosificaciones, luego cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg por peso corporal una vez seguida por 1 mg/kg por peso corporal cada tres semanas.

En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la

dosificación de cada anticuerpo administrado cae dentro de los rangos indicados. El anticuerpo es usualmente administrado en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosificaciones individuales pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares según se indica mediante la medición de los niveles de sangre del anticuerpo al antígeno diana en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se regula para conseguir una concentración de anticuerpo de plasma de aproximadamente 1-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y en algunos métodos aproximadamente 25-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Alternativamente, el anticuerpo puede ser administrado como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la vida útil del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida útil más larga, seguido por los anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos, y los anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuente durante un periodo prolongado de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo el tratamiento por el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, se requiere algunas veces una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que el avance de la enfermedad se reduce o termina, y preferentemente hasta que el paciente muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

Los niveles reales de dosificación de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser variados para

obtener una cantidad de ingrediente activo para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleada, o el éster, sal o amida de los mismos, ruta de administración, tiempo de administración, velocidad de excreción del compuesto particular que es empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, las condiciones, la salud general y la historia médica anterior del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

Una "dosificación terapéuticamente efectiva" de un anticuerpo anti-BST1 de la invención da como resultado preferentemente una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los periodos sin síntoma de la enfermedad, o una prevención de la discapacidad o incapacidad debido a la aflicción de la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de los tumores mediados por la BST1, una "dosificación terapéuticamente efectiva" inhibe preferentemente el crecimiento celular o el crecimiento del tumor en por lo menos 20%, más preferentemente por menos 40%, incluso más preferentemente en por lo menos aproximadamente 60%, e incluso más preferentemente en por lo menos aproximadamente 80% respecto a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento del tumor puede ser evaluada en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede ser evaluada examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular, dicha inhibición puede medirse *in vitro* mediante ensayos conocidos por el experto en la materia. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o por

el contrario mejorar los síntomas en un sujeto. Un experto en la técnica estaría en condiciones de determinar dichas cantidades basado en dichos factores como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición particular o la ruta de administración seleccionada.

Una composición de la presente invención se puede administrar vía una o más rutas de administración usando una o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como será apreciado por el experto en la técnica, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las rutas preferidas de administración para los anticuerpos de la invención incluyen rutas de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras rutas de administración parenteral, por ejemplo mediante inyección o infusión. La frase "administración parenteral" según se usa aquí se refiere a los modos de administración diferentes a la administración enteral y tópica, usualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección o infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intrasternal.

Alternativamente, un anticuerpo de la invención puede ser administrado vía una ruta de administración no parenteral, tal como tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuesto activos pueden prepararse con portadores que protegerán el compuesto contra una rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de administración microencapsulada. Se pueden usar polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como etileno acetato de vinilo, polianhidridos, ácido

poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones son patentados o generalmente conocidos por los expertos en la técnica [ver, por ejemplo, *Sustained y Controlled Release Drug Delivery Systems* (1978) J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y].

Las composiciones terapéuticas pueden ser administradas con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una modalidad preferida, una composición terapéutica de la invención puede ser administrada con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos divulgados en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; o 4,596,556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: la Patente Estadounidense No. 4,487,603, la cual divulga una bomba de micro-infusión implantable para dispensar la medicación a una velocidad controlada; la Patente Estadounidense No. 4,486,194, la cual divulga un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la Patente Estadounidense No. 4,447,233, la cual divulga una bomba de infusión de medicación a una velocidad precisa de infusión; la Patente Estadounidense No. 4,447,224, la cual divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para administración continua de un fármaco; la Patente Estadounidense No. 4,439,196, la cual divulga un sistema de administración de fármaco osmótico que tiene compartimientos de múltiples cámaras; y la Patente Estadounidense No. 4,475,196, la cual divulga un sistema de administración de fármaco osmótico. Estas patentes se incorporan aquí como referencia. Muchos otros implantes, sistemas de administración, y módulos de este tipo son conocidos por los expertos en la técnica.

En ciertas modalidades, los anticuerpos monoclonales de la invención pueden formularse para asegurar una apropiada distribución *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos de los compuestos altamente

hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la BBB (si se desea), estos pueden ser formulados, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, ver, por ejemplo, las Patentes Estadounidense 4,522,811; 5,374,548; y 5,399,331. Los liposomas pueden comprender una o más fracciones que son selectivamente transportadas en las células u órganos específicos, de este modo se mejora la administración del fármaco direccionado [ver, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685]. Las fracciones ejemplares de direccionamiento incluyen folato o biotina (ver, por ejemplo, Patente Estadounidense 5,416,016.); manósidos [Umezawa *et al.* (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038]; anticuerpos [P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180]; receptor A de proteína surfactante [Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134]; p120 [Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090]; ver además K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Usos y Métodos

Los anticuerpos, las composiciones de anticuerpo y los métodos de la presente invención tienen numerosas utilidades de diagnóstico y terapéuticas *in vitro* e *in vivo* que comprenden la diagnosis y el tratamiento de trastornos mediados por la BST1.

En algunas modalidades, estas moléculas pueden administrarse a las células en el cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y para diagnosticar una variedad de trastornos. Según se usa aquí, el término "sujeto" está destinado a incluir humanos y animales no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas,

caballos, pollos, anfibios y reptiles. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos mediados por la actividad de la BST1. Los métodos son particularmente apropiados para tratar pacientes humanos que tienen un trastorno asociado con la expresión aberrante de BST1. Cuando los anticuerpos para BST1 se administran junto con otro agente, los dos pueden ser administrados en cualquier orden o de manera simultánea.

Dada la unión específica de los anticuerpos de la invención para la BST1, los anticuerpos de la invención se pueden usar para detectar específicamente la expresión de la BST1 en la superficie de las células y, además, se pueden usar para purificar la BST1 vía purificación por inmunoafinidad.

Más aún, dada la expresión de la BST1 en las células tumorales, los anticuerpos, las composiciones de anticuerpo y los métodos de la presente invención se pueden usar para tratar a un sujeto con un trastorno tumorigénico, por ejemplo, un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan BST1 incluyendo, por ejemplo leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica de células B, cáncer de mama, cáncer colorectal, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario y cáncer pancreático. Se ha demostrado que la BST1 se internaliza en la unión del anticuerpo como se ilustra en el siguiente Ejemplo 5, permitiendo de este modo que los anticuerpos de la invención se usen en cualquier mecanismo de acción de carga útil por ejemplo, un planteamiento ADC, un radioinmunoconjugado, o planteamiento ADEPT.

En una modalidad, los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas multiespecífica y moléculas y composiciones biespecíficas y multiespecíficas) de la invención se pueden usar para detectar los niveles de BST1, o los niveles de células que contienen la BST1 en su superficie de

membrana, cuyos niveles pueden ser luego vinculados con ciertos síntomas de enfermedad. Alternativamente, los anticuerpos se pueden usar para inhibir o bloquear la función de la BST1 que, a su vez, puede vincularse con la prevención o mejora de ciertos síntomas de enfermedad, implicando por lo tanto la BST1 como un mediador de la enfermedad. Esto puede conseguirse contactando una muestra y una muestra de control con el anticuerpo anti-BST1 bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y la BST1. Cualquiera de los complejos formados entre el anticuerpo y la BST1 son detectados y comparados en la muestra y el control.

En otra modalidad, los anticuerpos (por ejemplo, los anticuerpos monoclonales, las moléculas y las composiciones multiespecíficas y biespecíficas) de la invención pueden examinarse inicialmente para unir la actividad asociada con el uso terapéutico o de diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden examinarse usando los ensayos citométricos de flujo descritos en los siguientes Ejemplos.

Los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas, inmunoconjugados y composiciones multiespecíficos y biespecíficos) de la invención tienen una utilidad adicional en la terapia y el diagnóstico de las enfermedades relacionadas con la BST1. Por ejemplo, anticuerpos monoclonales, las moléculas multiespecíficas o biespecíficas y los inmunoconjugados se pueden usar para elicitarse *in vivo* o *in vitro* una o más de las siguientes actividades biológicas: inhibir el desarrollo de y/o la muerte de una célula que expresa BST1; mediar la fagocitosis o ADCC de una célula que expresa BST1 en presencia de células efectoras humanas, o bloquear la unión del ligando BST1 con BST1.

En una modalidad particular, los anticuerpos (por ejemplo, los anticuerpos monoclonal, las moléculas y las composiciones multiespecíficas y biespecíficas)

se usan *in vivo* para tratar, prevenir o diagnosticar una variedad de enfermedades relacionadas con la BST1. Los ejemplos de las enfermedades relacionadas con la BST1 incluyen, entre otros, tejidos de cáncer humano que representan leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica de célula B, cáncer de mama, cáncer colorectal, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario y cáncer pancreático.

Las rutas de administración apropiadas de las composiciones de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas e inmunoconjugados multiespecíficos y biespecíficos) de la invención *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas en la técnica y pueden ser seleccionadas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpo se pueden administrar mediante inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Las dosificaciones apropiadas de las moléculas usadas dependerá de la edad y el peso del sujeto y la concentración y/o formulación de la composición del anticuerpo.

Como se describió previamente, los anticuerpos anti-BST1 de la invención se pueden co-administrar con uno o más agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede ser enlazado con un agente (como un inmunocomplejo) o se puede administrar por separado del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo se puede administrar antes, después o concurrentemente con el agente o puede ser co-administrado con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia contra el cáncer, por ejemplo, radiación. Dichos agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes anti-neoplásicos tales como doxorubicina (adriamicina), sulfato de bleomicina cisplatino, carmustina, clorambucil, y hidroxiurea ciclofosfamida que, por sí mismos, son solamente efectivos a niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. El cisplatino es administrado en forma intravenosa como una dosis de 100 mg/kg una vez cada

cuatro semanas y la adriamicina se administra de manera intravenosa como una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. Otros agentes apropiados para la co-administración con los anticuerpos de la invención incluyen otros agentes usados para el tratamiento de cánceres, por ejemplo, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica de células B, cáncer de mama, cáncer colorectal, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario o cáncer pancreático, tal como Avastin[®], 5FU y gemcitabina. La co-administración de los anticuerpos anti-BST1 o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticancerígenos que operan vía diferentes mecanismos que producen un efecto citotóxico para las células tumorales humanas. Dicha co-administración puede solucionar los problemas debido al desarrollo de la resistencia a los fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que las harán no reactivas con el anticuerpo.

Las células efectoras diana-específicas, por ejemplo, las células efectoras enlazadas con las composiciones (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención también se pueden usar como agentes terapéuticos. Las células efectoras para el direccionamiento pueden ser leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, células naturales que matan y otras células portadoras del receptor de IgG- o IgA. Si se desea, las células efectoras pueden ser obtenidas a partir del sujeto que se va a tratar. Las células efectoras diana-específicas pueden administrarse como una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administradas puede estar en el orden de 10^8 - 10^9 , pero variará dependiendo del propósito terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para obtener la localización en la célula diana, por ejemplo, una célula tumoral que expresa BST1, y para afectar la muerte

celular mediante, por ejemplo, fagocitosis. Las rutas de administración también pueden variar.

La terapia con células efectoras diana-específicas puede realizarse conjuntamente con otras técnicas para la remoción de células diana. Por ejemplo, la terapia antitumoral que utiliza las composiciones (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención y/o las células efectoras armadas con estas composiciones se pueden usar conjuntamente con quimioterapia. Adicionalmente, se puede usar la inmunoterapia para dirigir dos poblaciones efectoras citotóxicas distintas hacia el rechazo de la célula tumoral. Por ejemplo, los anticuerpos anti-BST1 enlazados con anti-Fc-gamma RI o anti-CD3 pueden usarse conjuntamente con los agentes de unión específicos del receptor IgG- o IgA.

Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la invención también se pueden usar para modular los niveles FcγR o FcγR en las células efectoras, tal como mediante nivelación y eliminación de los receptores en la superficie celular. También se pueden usar mezclas de receptores anti-Fc para este propósito.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas e immunoconjugados multiespecíficos y biespecíficos) de la invención que tienen sitios de unión de complemento, tales como las porciones de IgG1, -2, o -3 o IgM que unen el complemento, también pueden usarse en presencia del complemento. En una modalidad, el tratamiento *ex vivo* de una población de células que comprende células diana con un agente de unión de la invención y apropiadas células efectoras puede ser complementado por la adición de un complemento o un complemento que contiene suero. La fagocitosis de las células diana recubiertas con un agente de unión de la invención puede ser mejorada mediante la unión de las proteínas del complemento. En otra modalidad las células diana

recubiertas con las composiciones (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención también pueden ser lisadas mediante el complemento. En incluso otra modalidad, las composiciones de la invención no activan el complemento.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas e immunoconjugados multiespecíficos y biespecíficos) de la invención también se pueden administrar junto con el complemento. En ciertas modalidades, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden anticuerpos, moléculas y suero o complemento multiespecífico o biespecífico. Estas composiciones pueden ser ventajosas cuando el complemento está localizado en estrecha proximidad con los anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas. Alternativamente, los anticuerpos, las moléculas multiespecíficas o biespecíficas de la invención y el complemento o suero se puede administrar de manera separada.

También dentro del ámbito de la presente invención hay kits que comprenden las composiciones del anticuerpo de la invención (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas biespecíficas o multiespecíficas, o immunoconjugados) e instrucciones de uso. El kit puede contener además uno o más reactivos adicionales, tal como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una actividad de complementariedad que se une a un epítipo en el antígeno de la BST1 distinto del primer anticuerpo).

En consecuencia, a los pacientes tratados con las composiciones del anticuerpo de la invención se les puede administrar adicionalmente (antes de, simultáneamente con, o después de la administración de un anticuerpo de la

invención) con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que mejora o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos.

En otras modalidades, el sujeto puede ser adicionalmente tratado con un agente que modula, por ejemplo, mejora o inhibe, la expresión o actividad de los receptores de Fc γ o Fc γ mediante, por ejemplo, tratamiento del sujeto con citoquina. Las citoquinas preferidas para administración durante el tratamiento con la molécula multiespecífica incluyen el factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de las colonias granulocito-macrófago (GM-CSF), el interferón- γ (IFN- γ), y el factor de necrosis tumoral (TNF).

Las composiciones (por ejemplo, los anticuerpos, las moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención también pueden usarse para las células diana que expresan Fc γ R o BST1, por ejemplo, para rotular dichas células. Para dicho uso, el agente de unión puede enlazarse con una molécula que puede ser detectada. De este modo, la invención proporciona métodos para la localización de células *ex vivo* o *in vitro* que expresan receptores Fc, tal como Fc γ R, o BST1. El rotulado detectable puede ser, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un co-factor de enzima.

En una modalidad particular, la invención proporciona métodos para detectar la presencia del antígeno de BST1 en una muestra, o medir la cantidad del antígeno BST1, comprendiendo contactar la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo monoclonal, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a BST1, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o una porción del mismo y BST1. La formación de un complejo es luego detectada, en donde una formación de complejo de diferencia entre la muestra comparada con la muestra de control es indicativo de la presencia de un antígeno de BST1 en la muestra.

En otras modalidades, la invención proporciona métodos para tratar un trastorno mediado por la BST1 en un sujeto, por ejemplo, cánceres humanos y enfermedades inflamatorias humanas, incluyendo las enfermedades de la invención.

En incluso otra modalidad, los inmunoconjugados de la invención se pueden usar para los compuestos diana (por ejemplo, agentes terapéuticos, etiquetas, citotoxinas, radiotoxinas, inmunosupresores, etc.) para las células que tienen receptores de superficie celular BST1 enlazando dichos compuestos con el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo anti-BST1 se puede conjugar con cualquiera de los compuestos de toxina descritos en las Patentes Estadounidenses Nos. 6,281,354 y 6,548,530, Solicitudes de Patentes Estadounidenses Nos. 2003/0050331, 2003/0064984, 2003/0073852, y 2004/0087497, o publicadas en WO 03/022806. De este modo, la invención proporciona además métodos para localizar *ex vivo* o *in vivo* las células que expresan BST1 (por ejemplo, con un rótulo detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un co-factor de enzima). Alternativamente, los inmunoconjugados se pueden usar para matar células que tienen receptores de superficie de célula BST1 direccionando las citotoxinas o las radiotoxinas hacia BST1.

Todas las referencias citadas en esta descripción, incluyendo sin limitación todos los documentos, publicaciones, patentes, solicitudes de patente, presentaciones, textos, informes, manuscritos, folletos, libros, publicaciones en Internet, artículos de revistas, publicaciones periódicas, hojas de datos de productos, y similares, se incorporan como referencia en esta descripción en su totalidad. La discusión de las referencias aquí citadas está destinada a simplemente resumir las afirmaciones hechas por sus autores, y no se hace

afirmación alguna de que cualquier referencia constituye técnica anterior y los solicitantes se reservan el derecho a cuestionar la exactitud y pertinencia de las referencias citadas.

Aunque la invención precedente ha sido descrita con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad del entendimiento, será fácilmente evidente para la persona entendida en la técnica a la luz de los planteamientos de esta invención que se pueden hacer a la misma ciertos cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu o ámbito de las reivindicaciones dependientes.

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos, los cuales no deberán interpretarse como una limitación posterior.

Ejemplo 1: Construcción de una Biblioteca de Presentación de Fago

Una proteína recombinante compuesta de aminoácidos 29-292 of BST1 (SEC ID NO:44) fue eucarísticamente sintetizada mediante métodos recombinantes estándar y se usó como antígeno para inmunización.

Inmunización y aislamiento mARN

Una biblioteca de presentación de fago para identificación de las moléculas de unión de BST1 se construyó de la siguiente manera. Ratones A/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me.) se inmunizaron intraperitonealmente con el antígeno BST1 recombinante (el dominio extracelular), usando 100 µg de proteína en el adyuvante completo de Freund, el día 0, y con 100 µg de antígeno el día 28. Los sangrados de prueba de los ratones se obtuvieron mediante punción del seno retro-orbital. Si, examinando los títulos, se considerara que son altos mediante ELISA usando el antígeno biotinilado BST1 inmovilizado vía neutravidina (Reacti-

Bind™) Placas de Poliestireno Recubiertas de NeutrAvidin(TM), Pierce, Rockford, Ill.), los ratones fueron reforzados con 100 µg de proteína el día 70, 71 y 72, con el posterior sacrificio y esplenectomía el día 77. Si los títulos del anticuerpo no se consideraron satisfactorios, los ratones fueron reforzados con 100 µg de antígeno el día 56 y se tomó un sangrado de prueba el día 63. Si se obtuvieron títulos satisfactorios, los animales fueron reforzados con 100 µg de antígeno el día 98, 99, y 100 y los bazos se cosecharon el día 105.

Los bazos fueron cosechados en una campana de flujo laminar y se transfirieron a una placa de Petri, recortando y descartando la grasa y el tejido conectivo. Los bazos se fueron macerados rápidamente con el émbolo a partir de una jeringa estéril de 5 cc en presencia de 1.0 ml de la solución D (25.0 g de tiocianato de guanidina (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), 29.3 ml de agua estéril, 1.76 ml 0.75 M citrato de sodio pH 7.0, 2.64 ml 10% sarkosyl (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.), 0.36 ml de 2-mercaptoetanol (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.). Esta suspensión del bazo fue impulsada a través de una aguja de calibre 18 hasta que las células fueron lisadas y la solución viscosa fue transferida a un tubo de centrifuga. La placa de Petri se lavó con 100 µl de la solución D para recuperar cualquier bazo remanente. Esta suspensión fue luego impulsada a través de una aguja de calibre 22 otras 5-10 veces.

La muestra se dividió uniformemente entre los dos tubos de microcentrifuga y se añadió lo siguiente, en orden, con mezcla mediante inversión después de cada adición: 50 µl 2 M de acetato de sodio pH 4.0, 0.5 ml fenol saturado en agua (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.), 100 µl cloroformo/alcohol isoamílico 49:1 (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.). La solución se agita en vórtex durante 10 segundos y se incubó en hielo durante 15 minutos. Después de la centrifugación a 14 krpm durante 20 minutos a 2-8°C, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. Se añadió un volumen igual de fenol saturado con

agua:cloroformo: alcohol isoamílico (50:49:1), y el tubo se agitó con vórtex durante diez segundos. Después de 15 minutos de incubación en hielo, la muestra fue centrifugada durante 20 minutos a 2-8°C, y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó con un volumen igual de isopropanol a -20°C durante un mínimo de 30 minutos. Después de la centrifugación a 14 krpm durante 20 min a 4°C, el sobrenadante fue aspirado, los tubos, giraron brevemente y todos los rastros de líquido se removieron de la bolita de ARN.

Las bolitas de ARN se disolvieron cada una en 300 µl de la solución D, se combinaron y se precipitaron con un volumen igual de isopropanol a -20°C durante un mínimo de 30 minutos. La muestra fue centrifugada a 14 krpm durante 20 minutos a 4°C, el sobrenadante se aspiró como antes, y la muestra se enjuagó con 100 µl de 70% de etanol enfriado con hielo. La muestra fue nuevamente centrifugada a 14 krpm durante 20 minutos a 4°C, la solución de etanol a 70% fue aspirada, y la bolita de ARN se secó al vacío. La bolita se suspendió nuevamente en 100 µl de agua estéril tratada con dietil pirocarbonato. La concentración fue determinada mediante A260 usando una absorbancia de 1.0 para una concentración de 40 µg/ml. Los ARNs se almacenaron a -80°C.

Preparación del ADN Complementario (cADN)

El ARN total purificado de bazos de ratón como se describió anteriormente se usó directamente como patrón para preparación de cADN. El ARN (50 µg) se diluyó a 100 µL con agua estéril, y se añadió 10 µL de 130 ng/µL oligo dT12 (sintetizado en el sintetizador de ADN de Applied Biosystems Modelo 392). La muestra se calentó durante 10 minutos a 70°C, luego se enfrió en hielo. Se añadió cuarenta µL 5* del primer regulador de filamento (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.), junto con 20 µL 0.1 M de ditiotreitól (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.), 10 µL 20 mM de trifosfatos de desoxinucleósido (dNTP's, Boehringer

Mannheim, Indianapolis, Ind.), y 10 μ L de agua en hielo. La muestra fue luego incubada a 37°C durante 2 minutos. Se añadió diez μ L de transcriptasa inversa (SuperscriptTM) II, Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.) y se continuó con la incubación a 37°C durante 1 hora. Los productos de cADN se usaron directamente para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Amplificación de los Genes de Anticuerpo mediante PCR

Para amplificar sustancialmente todos los genes de cadena H y L usando PCR, los cebadores fueron elegidos para que correspondan con sustancialmente todas las secuencias publicadas. Debido a que las secuencias de nucleótido de terminales amino de H y L contienen una considerable diversidad, 33 oligonucleótidos se sintetizaron para servir como cebadores 5' para las cadenas de H, y 29 oligonucleótidos se sintetizaron para servir como cebadores 5' para las cadenas kappa L como se describe en US 6,555,310. Las secuencias de nucleótido de región constante para cada cadena requirieron solamente un cebador 3' para las cadenas H y un cebador 3' para las cadenas kappa L.

Una reacción de 50 μ L se realizó para cada par cebador con 50 μ mol de cebador 5', 50 μ mol de cebador 3', 0.25 μ L Taq ADNA Polimerasa (5 unidades/ μ L, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), 3 μ L cADN (preparado como se describió), 5 μ L 2 mM dNTP's, 5 μ L 10* Taq tampón de ADN polimerasa con MgCl₂ (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), y H₂O a 50 μ L. La amplificación se realizó usando un termociclador GeneAmp(R) 9600 (Perkin Elmer, Foster City, Calif.) con el siguiente programa de termociclador: 94°C durante 1 minuto; 30 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos 72°C durante 6 minutos; 4°C.

Los productos dsADN del proceso PCR fueron luego sometidos a PCR asimétrico usando solamente un cebador 3' para generar sustancialmente solo el filamento antisentido de los genes diana. Se realizó una reacción de 100 μ L para cada producto dsADN con 200 μ mol del cebador 3', 2 μ L de un producto ds-ADN, 0.5 μ L Taq de ADN Polimerasa, 10 μ L 2 mM dNTP's, 10 μ L 10* Taq de tampón de ADN polimerasa con $MgCl_2$ (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), y H_2O a 100 μ L. El mismo programa PCR como el descrito anteriormente se usó para amplificar el (ss)-ADN de un solo filamento.

Purificación del y de un Solo Filamento mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento y Tratamiento con Quinasa de ADN de un Solo Filamento

Los productos ss-PCR de cadena H y los productos PCR de un solo filamento de cadena L se precipitaron con etanol añadiendo 2.5 volúmenes de etanol y 0.2 volúmenes de 7.5 M de acetato de amonio y se incubaron a $-20^{\circ}C$ durante por lo menos 30 minutos. El ADN se formó en bolitas mediante centrifugación en una centrifuga de Eppendorf a 14 krpm durante 10 minutos a $2-8^{\circ}C$. El sobrenadante se aspire cuidadosamente, y los tubos se hicieron girar brevemente una segunda vez. La última gota de sobrenadante fue removida con una pipeta. El ADN se secó al vacío durante 10 minutos a fuego medio. Los productos de cadena H fueron agrupados en 210 μ L de agua y los productos de cadena L se agruparon de manera separada en 210 μ L de agua. El y de un solo filamento se purificó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) usando HPLC de Hewlett Packard 1090 y un Gen-PakTM) columna de intercambio aniónico FAX (Millipore Corp., Milford, Mass.). La gradiente usada para purificar el ADN de un solo filamento se muestra en la Tabla 1, y la temperatura del horno fue $60^{\circ}C$. Se monitoreó la absorbancia a 260 nm. El ADN de un solo filamento eluido de la HPLC se recolectó en una fracción de 0.5 minuto. Las fracciones conteniendo el ADN de un solo filamento fueron etanol precipitado, en forma de

bolita y secado como se describió anteriormente. Las bolitas de ADN seco se agruparon en 200 µL de agua estéril.

Tabla 1 – gradiente de HPLC para purificación de ss.-ADN

Tiempo (min)	%A	%B	%C	Flujo (ml/min)
0	70	30	0	0.75
2	40	60	0	0.75
17	15	85	0	0.75
18	0	100	0	0.75
23	0	100	0	0.75
24	0	0	100	0.75
28	0	0	100	0.75
29	0	100	0	0.75
34	0	100	0	0.75
35	70	30	0	0.75

Tampón A es 25 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0
Tampón B es 25 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 8.0
Tampón C es 40 mm de ácido fosfórico

El ADN de un solo filamento fue 5'-fosforilado en la preparación para mutagénesis. Veinticuatro µL 10* de tampón de quinasa (United States Biochemical, Cleveland, Ohio), 10.4 µL 10 mM de adenosina-5'-trfosfato (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), y 2 µL de polinucleótido quinasa (30 unidades/µL, United States Biochemical, Cleveland, Ohio) se añadió a cada muestra, y los tubos se incubaron a 37°C durante 1 hora. Las reacciones se detuvieron incubando los tubos a 70°C durante 10 minutos. El ADN se purificó con una extracción de fenol equilibrado con Tris (pH>8.0, United States Biochemical, Cleveland, Ohio):cloroformo:alcohol isoamílico (50:49:1) y una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (49:1). Después de las extracciones, el ADN se precipitó con alcohol y se formaron bolitas como se describió anteriormente. Las bolitas de ADN se secaron, luego se disolvieron en 50 µL de agua estéril. La concentración fue determinada midiendo la absorbancia de una

alícuota del ADN a 260 nm usando 33 µg/ml para una absorbancia de 1.0. Las muestras se almacenaron a -20°C.

Preparación de Patrones de Uracilo Usados en la Generación de Bibliotecas de Fago de Anticuerpo de Bazo

Un ml de *E. coli* CJ236 (BioRAD, Hercules, Calif.) de cultivo durante la noche se añadió a 50 ml 2*YT en un frasco de agitación deflector de 250 ml. El cultivo se desarrolló a 37°C a OD600=0.6, se inoculó con 10 µl de una dilución de 1/100 del stock de fago del vector BS45 (descrito en la US 6,555,310) y cultivo continuado durante 6 horas. Aproximadamente 40 ml del cultivo se centrifuga a 12 krpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante (30 ml) fue transferido a un tubo nuevo de centrifuga y se incubó a temperatura ambiental durante 15 minutos después de la adición de 15 µl de 10 mg/ml de RNaseA (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.). Los fagos fueron precipitados mediante la adición de 7.5 ml de 20% de polietilenglicol 8000 (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.)/3.5M de acetato de amonio (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) e incubación en hielo durante 30 minutos. La muestra fue centrifugada a 12 krpm durante 15 min a 2-8°C. El sobrenadante fue cuidadosamente descartado, y el tubo se giró brevemente para remover todos los rastros del sobrenadante. La bolita se volvió a suspender en 400 µl de tampón de alto contenido de sal (300 mM NaCl, 100 mM de Tris pH 8.0, 1 mM de EDTA), y se transfirió a un tubo de 1.5 ml.

El stock de fagos se extrajo repetidamente con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico equilibrado (50:49:1) hasta que ningún rastro de interfaz blanca fue visible, y luego se extrajo con un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1). El ADN se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol y 1/5 volumen de 7.5 M acetato de amonio y se incubó 30 minutos a -20°C. El ADN se centrifugó a 14 krpm durante 10 minutos a 4°C, la bolita se lavó una

vez con 70% de etanol frío, y se secó al vacío. El ADN patrón de uracilo se disolvió en 30 µl de agua estéril y la concentración se determinó mediante A260 usando una absorbancia de 1.0 durante una concentración de 40 µg/ml. El patrón se diluyó a 250 ng/µL con agua estéril, se formó en parte alícuota y se almacenó a -20°C.

Mutagénesis del Patrón de Uracilo con ss-ADN y Electroporación en *E. coli* para Generar las Bibliotecas de Fago de Anticuerpo

Las bibliotecas de presentación de fagos fueron generadas introduciendo simultáneamente genes de cadena pesada y ligera de un solo filamento en un patrón de uracilo de vector de presentación de fago. Una mutagénesis típica se realizó en una escala de 2 µg mezclando lo siguiente en un tubo de reacción de PCR de 0.2 ml: 8 µl de (250 ng/µL) de patrón de uracilo, 8 µL de 10* tampón de reasociación (200 mM de Tris pH 7.0, 20 mM de MgCl₂, 500 mM de NaCl), 3.33 µl de un inserto de cadena pesada de un solo filamento tratado con quinasa (100 ng/µL), 3.1 µl de un inserto de cadena pesada de un solo filamento tratado con quinasa (100 ng/µL), y agua estéril a 80 µl. El ADN se fortaleció en un termociclador GeneAmp(R) 9600 usando el siguiente perfil térmico: 20 segundos a 94°C, 85°C durante 60 segundos, 85°C a 55°C de desnivel durante 30 minutos, mantenido a 55°C durante 15 minutos. El ADN se transfirió a hielo después de terminar el programa. La extensión/ligación se realizó añadiendo 8 µl de 10* de tampón de síntesis (5 mM cada dNTP, 10 mM de ATP, 100 mM de Tris pH 7.4, 50 mM de MgCl₂, 20 mM de DTT), 8 µL T4 ADN ligasa (1 U/µL, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), 8 µL diluido en T7 ADN polimerasa (1 U/µL, New England BioLabs, Beverly, Mass.) e incubando a 37°C durante 30 minutos. La reacción se detuvo con 300 µL de tampón de parada de mutagénesis (10 mM de Tris pH 8.0, 10 mM de EDTA). El ADN de mutagénesis se extrajo una vez con fenol equilibrado (pH>8):cloroformo:alcohol isoamílico (50:49:1), una vez con

cloroformo:alcohol isoamílico (49:1), y el ADN se precipitó con etanol a -20°C durante por lo menos 30 minutos. El ADN se formó en pelotitas y el sobrenadante se removió cuidadosamente como se describió anteriormente. La muestra se giró nuevamente de Nuevo y todos los restos de etanol se removieron con pipetman. La bolita se secó al vacío. El ADN se volvió a suspender en $4\ \mu\text{L}$ de agua estéril.

Un μL de ADN de mutagénesis (500 ng) se transfirió en $40\ \mu\text{L}$ electrocompetente *E. coli*/DH12S (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.) usando electroporación. Las células transformadas se mezclaron con aproximadamente 1.0 ml de células XL-1 durante la noche las cuales se diluyeron con 2*YT de caldo a 60% del volumen original. Esta mezcla fue luego transferida a un tubo de cultivo estéril de 15-ml y 9 ml de agar superior se añadió para poner en placas en una placa de agar LB de 150-mm. Las placas se incubaron durante 4 horas a 37°C y luego se transfirieron a 20°C durante la noche. Los fagos de anticuerpo de la primera vuelta se hicieron eluyendo el fago de estas placas en 10 ml de 2*YT, devanando los residuos, y captando el sobrenadante. Estas muestras son las bibliotecas de presentación de fago del anticuerpo usadas para seleccionar anticuerpos contra la BST1. La eficiencia de las electroporaciones se midió colocando en placas de $10\ \mu\text{L}$ de una dilución 10^{-4} de células suspendidas en placas de agar LB, seguido por incubación durante la noche de placas a 37°C . La eficiencia se calculó multiplicando el número de placas en la placa de dilución 10^{-4} por 106. Las eficiencias de electroporación de la biblioteca son típicamente mayores que 1×10^7 fagos bajo estas condiciones.

Transformación de *E. coli* mediante Electroporación

Las células de *E. coli* electrocompetentes fueron descongeladas en hielo. El ADN se mezcló con 40 L de estas células pipeteando suavemente las células hacia arriba y hacia abajo 2-3 veces, cuidando de no introducir una burbuja de

aire. Las células fueron transferidas a una cubeta de Gene Pulser (0.2 cm de espacio, BioRAD, Hercules, Calif.) que había sido enfriada con hielo, nuevamente teniendo cuidado de no introducir una burbuja de aire en la transferencia. La cubeta se colocó en el Generador de Impulsos de E. coli (BioRAD, Hercules, Calif.) y se sometió a electroporación fijando el voltaje en 1.88 kV de acuerdo con la recomendación del fabricante. La muestra transformada fue inmediatamente resuspendida en 1 ml de caldo 2*YT o 1 ml de una mezcla de 400 µl 2*YT/600 µl células XL-1 durante la noche y se procesó como lo dicta los procedimientos.

Colocación en Placas de Fago M13 o Células Transformadas con una Reacción de Mutagénesis del Vector de Presentación de Fago del Anticuerpo

Las muestras de fago se añadieron a 200 µL de un cultivo de noche de E. coli XL1-Blue cuando se colocaron en placas de agar LB de 100 mm o a 600 µL de células durante la noche cuando se coloca en placas de 150 mm en tubos estériles de cultivo de 15 ml. Después de añadir agar superior LB (3 ml para placas de 100 mm o 9 ml para placas de 150 mm, agar superior almacenado a 55°C (ver, Apéndice A1, Sambrook et al., arriba), la mezcla se distribuyó uniformemente en una placa de agar LB que había sido previamente calentada (37°C-55°C) para remover cualquier exceso de humedad en la superficie de agar. Las placas se enfriaron a temperatura ambiental hasta que se solidificó el agar superior. Las placas se invirtieron e incubaron a 37°C como se indicó.

Preparación de ciclasa 2 de ADP-ribosil biotinilado y Anticuerpos Biotinilados

El antígeno BST1 recombinante concentrado (dominio extracelular de longitud completa) fue extensamente dializado en BBS (20 mM de borato, 150 mM de NaCl, 0.1% de NaN₃, pH 8.0). Después de la diálisis, 1 mg de la BST1 (1 mg/ml en BBS) se hizo reaccionar con un exceso molar de 15 veces de biotin-XX-

NHS éster (Molecular Probes, Eugene, Oreg., solución stock a 40 mM en DMSO). La reacción se incubó a temperatura ambiental durante 90 minutos y luego se templó con taurina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) a una concentración final de 20 mM. La mezcla de reacción de biotinilación fue dializada luego frente a BBS a 2-8°C. Después de la diálisis, la BST1 biotinilada se diluyó en un tampón de cribado (40 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 20 mg/ml de BSA, 0.1% de Tween 20, pH 7.5), se clasificó en alícuotas, y se almacenó a -80°C hasta que fue necesario.

Los anticuerpos se hicieron reaccionar con 3-(N-maleimidilpropionil)biocitina (Molecular Probes, Eugene, Oreg.) usando una cisteína libre localizada en el terminal carboxi de la cadena pesada. Los anticuerpos se redujeron añadiendo DTT a una concentración final de 1 mM durante 30 minutos a temperatura ambiental. El anticuerpo reducido se pasó a través de una columna de desalación Sephadex G50 equilibrada en 50 mM de fosfato de potasio, 10 mM de ácido bórico, 150 mM de NaCl, pH 7.0. La 3-(N-maleimidilpropionil)-biocitina se añadió a una concentración final de 1 mM y se dejó proceder la reacción a temperatura ambiental durante 60 minutos. Las muestras fueron luego dializadas extensamente frente a BBS y se almacenaron a 2-8°C.

Preparación de Látex Magnético de Avidina

El látex magnético (Estapor, 10% de sólidos, Bangs Laboratories, Fishers, Ind.) fue resuspendido completamente y 2 ml se clasificó en alícuota en un tubo cónico de 15 ml. El látex magnético fue suspendido en 12 ml de agua destilada y se separó de la solución durante 10 min usando un imán (PerSeptive Biosystems, Framingham, Mass.). Si bien se mantiene la separación del látex magnético con el imán, el líquido se removi6 cuidadosamente usando una pipeta estéril de 10 ml. Este proceso de lavado se repiti6 otras tres veces. Después del lavado final, el látex fue resuspendido en 2 ml de agua destilada. En un tubo cónico separado de

50 ml, 10 mg de avidin-HS (NeutrAvidin, Pierce, Rockford, Ill.) se disolvió en 18 ml de 40 mM de Tris, 0.15 M de cloruro de sodio, pH 7.5 (TBS). Aunque se sometió a vórtex, los 2 ml de látex magnético lavado se añadió a avidin-HS diluido y la mezcla se mezcló otros 30 segundos. Esta mezcla se incubó a 45°C durante 2 horas, agitando cada 30 minutos. El látex magnético de avidina se separó de la solución usando un imán y se lavó tres veces con 20 ml de BBS como se describió anteriormente. Después del lavado final, el látex fue resuspendido en 10 ml de BBS y se almacenó a 4°C.

Inmediatamente antes del uso, el látex magnético de avidina fue equilibrado en un tampón de cribado (40 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 20 mg/ml de BSA, 0.1% Tween 20, pH 7.5). El látex magnético de avidina que necesitaba del experimento de cribado (200 µl/muestra) se añadió a un tubo de centrifuga estéril de 15 ml y se llevó a 10 ml con un tampón de cribado. El tubo se colocó en el imán durante 10 minutos para separar el látex. La solución se removió cuidadosamente con 10 ml de una pipeta estéril como se describió anteriormente. El látex magnético fue resuspendido en un tampón de cribado de 10 ml para empezar el segundo lavado. El látex magnético se lavó un total de 3 veces con el tampón de cribado. Después del lavado final, el látex fue resuspendido en el tampón de cribado hacia el volumen de inicio.

Ejemplo 2: Selección de Anticuerpos Policlonales Recombinantes a Antígeno de BST1

Los reactivos de unión que se unen específicamente con la BST1 se seleccionaron de las bibliotecas de presentación de fagos creadas a partir de ratones hiperinmunizados como se describe en el Ejemplo 1.

Cribado

Los fagos de anticuerpo de la primera vuelta se prepararon como se describió en el Ejemplo 1 usando un patrón de uracilo BS45. Las electroporaciones de ADN de mutagénesis se realizaron produciendo muestras de fago derivadas de diferentes ratones inmunizados. Para crear más diversidad en la biblioteca policlonal recombinante, cada muestra de fago fue cribada de manera separada.

Antes de la primera vuelta del cribado funcional con el antígeno de BST1 biotinilado, las bibliotecas del fago de anticuerpo se seleccionaron para la presentación del fago de las cadenas pesada y ligera en su superficie cribando con látex magnético 7F11 (como se describe en los Ejemplos 21 y 22 de la US 6,555,310). El cribado funcional de estas bibliotecas se realizó en principio como se describe en el Ejemplo 16 de la US 6,555,310. Específicamente, 10 μL de 1×10^{-6} M de antígeno de BST1 biotinilado se añadió a las muestras de fago (aproximadamente 1×10^{-8} M de la concentración final de la BST1), y la mezcla se dejó que se equilibre durante la noche a 2-8°C.

Después de conseguir el equilibrio, las muestras fueron cribadas con látex magnético de avidina para capturar el fago del anticuerpo unido a la BST1. El látex magnético de avidina equilibrado (Ejemplo 1), 200 μL de látex por muestra, se incubó con el fago durante 10 minutos a temperatura ambiental. Después de 10 minutos, aproximadamente 9 ml del tampón de cribado se añadió a cada muestra de fago, y el látex magnético se separó de la solución usando un imán. Después de una separación de 10 minutos, el fago no unido fue cuidadosamente removido usando una pipeta estéril de 10 ml. El látex magnético fue luego resuspendido en un tampón de cribado de 10 ml para empezar el segundo lavado. El látex se lavó

un total de tres veces como se describió anteriormente. Para cada lavado, los tubos se pusieron en contacto con el imán durante 10 minutos para separar el fago no unido del látex magnético. Después del tercer lavado, el látex magnético fue resuspendido en 1 ml del tampón de cribado y se transfirió a un tubo de 1.5 mL. Todo el volumen del látex magnético para cada muestra fue luego recolectado y resuspendido en 200 μ l 2*YT y se colocó en placas LB de 150 mm descrito en el Ejemplo 1 para ampliar el fago unido. Las placas se incubaron a 37°C durante 4 horas, luego durante la noche a 20°C.

Las placas de 150 mm usadas para amplificar el fago unido se usaron para generar la siguiente vuelta del fago de anticuerpo. Después de la incubación durante la noche, los fagos de anticuerpo de la segunda vuelta se eluyeron a partir de las placas de 150 mm pipeteando 10 mL de los medios 2*YT en el depósito y agitando suavemente la placa a temperatura ambiental durante 20 minutos. Las muestras de fago se transfirieron a tubos de centrifuga estériles y desechables de 15 ml con una tapa de sellado de la conexión, y los residuos de la placa LB se formaron en pelotitas mediante centrifugación de los tubos durante 15 minutos a 3500 rpm. El sobrenadante que contiene el fago de anticuerpo de la segunda vuelta fue luego transferido a un tubo nuevo.

Una segunda vuelta del cribado funcional se configuró diluyendo 100 μ L de cada stock de fago en 900 μ L del tampón de cribado en tubos de centrifuga estéril desechables de 15 ml. El antígeno de BST1 biotinilado fue luego añadido a cada muestra, como se describió para la primera vuelta del cribado, y las muestras de fago se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiental. Las muestras de fago fueron luego cribadas con látex magnético de avidina como se describió anteriormente. El progreso del cribado se monitoreó en este punto colocando en placas las alícuotas de cada muestra de látex en placas de agar LB de 100 mm para determinar el porcentaje de las células positivas kappa. La mayor parte del

látex de cada cribado (99%) se colocó en placas de agar LB de 150 mm para amplificar la unión del fago con el látex. Las placas de agar LB de 100 mm se incubaron a 37°C durante 6-7 horas, después de lo cual se transfirieron las placas a temperatura ambiental y se superpusieron a las placas los filtros de nitrocelulosa (tamaño del poro 0.45 mm, BA85 Protran, Schleicher and Schuell, Keene, N.H.).

Las placas con filtros de nitrocelulosa se incubaron durante la noche a temperatura ambiental y luego se desarrollaron con un conjugado kappa alcalina fosfatasa de cabra anti-ratón para determinar el porcentaje de las células positivas kappa como se describe a continuación. Las muestras de fago con menores porcentajes (<70%) de células positivas kappa en la población se sometieron a una vuelta de cribado con látex magnético 7F11 antes de realizar una tercera vuelta funcional de cribado durante la noche a 2-8°C usando el antígeno de BST1 biotinilado a aproximadamente 2×10^{-9} M. Esta vuelta de cribado también fue monitoreada para las células positivas kappa. Las muestras individuales de fago que tuvieron porcentajes positivos de kappa mayores a 80% se agruparon y se sometieron a una vuelta final de cribado durante la noche a 2-8°C a 5×10^{-9} M. Los genes del anticuerpo BST1 contenidos en el fago eluido de esta cuarta vuelta de cribado funcional se subclonaron en el vector de expresión, pBRncoH3.

El proceso de subclonación se realizó por lo general como se describió en el Ejemplo 18 de la US 6,555,310. Después de la subclonación, el vector de expresión se sometió a electroporación en células DH10B y la mezcla se desarrolló durante la noche en 2*YT conteniendo 1% de glicerol y 10 µg/ml de tetraciclina. Después de una segunda vuelta de desarrollo y selección en tetraciclina, las alícuotas de las células se congelaron a -80°C, como la fuente para la producción del anticuerpo policlonal de BST1. Los anticuerpos monoclonales se seleccionaron de estas mezclas policlonales colocando en

placas una muestra de la mezcla en placas de agar LB conteniendo 10 µg/ml de tetraciclina y tamizando los anticuerpos que reconocieron la BST1.

Expresión y Purificación de Anticuerpos Recombinantes Frente a ciclasa 2 ADP-ribosil

Un inóculo en frasco de agitación se generó durante la noche de un banco de células a -70°C en un agitador de incubación Innova 4330 (New Brunswick Scientific, Edison, N.J.) fijado a 37°C, 300 rpm. El inóculo se usó para sembrar 20 L de un fermentador (Applikon, Foster City, Calif.) conteniendo un medio de cultivo definido [Pack et al. (1993) Bio/Technology 11: 1271-1277] suplementado con 3 g/L de L-leucina, 3 g/L de L-isoleucina, 12 g/L de digerido de caseína (Difco, Detroit, Mich.), 12.5 g/L de glicerol y 10 µg/ml de tetraciclina. La temperatura, el pH y el oxígeno disuelto en el fermentador se controlaron a 26°C, 6.0-6.8 y 25% de saturación, respectivamente. La espuma se controló mediante la adición de polipropilenglicol (Dow, Midland, Mich.). El glicerol se añadió al fermentador en un modo de alimentación por lotes. La expresión Fab se indujo mediante la adición de L(+)-arabinosa (Sigma, St. Louis, Mo.) a 2 g/L durante la última fase de desarrollo logarítmico. La densidad celular se midió mediante densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro UV-1201 (Shimadzu, Columbia, Md.). Después de la conclusión de la ejecución y regulación del pH a 6.0, el cultivo se pasó dos veces a través de un Microfluidizer M-210B-EH (Microfluidics, Newton, Mass.) a 17,000 psi. La homogenización de alta presión de las células liberaron el Fab en el sobrenadante de cultivo.

La primera etapa en la purificación fué cromatografía de afinidad metálica inmovilizada en lecho expandido (EB-IMAC). La resina de quelación StreamlineTM (Pharmacia, Piscataway, N.J.) se cargó con 0.1 M de NiCl₂ y luego se expandió y equilibró en 50 mM de acetato, 200 mM de NaCl, 10 mM de imidazol, 0.01% de

NaN_3 , tampón con pH 6.0 fluyendo en dirección hacia arriba. Una solución de stock se usó para hacer homogéneo el cultivo a 10 mM de imidazol, después de lo cual se diluyó dos veces o más en un tampón de equilibrio para reducir el contenido de sólidos húmedos a menos de 5% por peso. Luego se cargó en la columna Streamline fluyendo en dirección hacia arriba a una velocidad superficial de 300 cm/hr. Los restos celulares pasaron sin obstáculos, pero el Fab fue capturado por medio de la interacción de alta afinidad entre níquel y la etiqueta hexahistidina en la cadena pesada de Fab. Después del lavado, el lecho expandido se convirtió en un lecho empaquetado y el Fab se eluyó con 20 mM borato, 150 mM de NaCl, 200 mM de imidazol, 0.01% de NaN_3 , tampón con pH 8.0 fluyendo en dirección hacia abajo.

La segunda etapa en la purificación usó cromatografía de intercambio iónico (IEC). La resina Q Sepharose FastFlow (Pharmacia, Piscataway, N.J.) se equilibró en 20 mM de borato, 37.5 mM de NaCl, 0.01% de NaN_3 , pH 8.0. La fuente de elución Fab de la etapa EB-IMAC se diluyó cuatro veces en 20 mM de borato, 0.01% de NaN_3 , pH 8.0 y se cargó en la columna IEC. Después de lavar, el Fab fue eluido con 37.5-200 mM de gradiente de sal NaCl. Las fracciones de elución se evaluaron para la pureza usando un sistema Xcell II™ SDS-PAGE (Novex, San Diego, Calif.) antes del agrupamiento. Finalmente, la agrupación de Fab se concentró y se sometió a diafiltración en 20 mM de borato, 150 mM de NaCl, 0.01% de NaN_3 , tampón con pH 8.0 para almacenamiento. Esto se consiguió en un sistema Sartocn Slice™ adecuado con un casete de 10,000 MWCO (Sartorius, Bohemia, N.Y.). Los rendimientos de la purificación final fueron típicamente 50%. La concentración del Fab purificado se midió mediante absorbancia UV a 280 nm, asumiendo una absorbancia de 1.6 para una solución de 1 mg/ml.

299
195

Ejemplo 3: Especificidad de los Anticuerpos Monoclonales respecto a la BST1
Determinada por Análisis de Citometría de Flujo

La especificidad de los anticuerpos frente a la BST1 seleccionada en el Ejemplo 2 se examinó mediante citometría de flujo. Para examinar la capacidad de los anticuerpos para unirse con la proteína BST1 de superficie celular, los anticuerpos se incubaron con células que expresan BST1, A549 y H226, de adenocarcinoma de pulmón humano y carcinam escamoso de pulmón humano, respectivamente. Las células se lavaron en un tampón FACS (DPBS, 2% FBS), se centrifugaron y se resuspendieron en 100µl del anticuerpo BST1 primario diluido (también diluido en el tampón FACS). El complejo de anticuerpo-A549 se incubó en hielo durante 60 minutos y luego se lavó dos veces con tampón FACS como se describió anteriormente. La bolita de célula-anticuerpo se resuspendió en 100µl del anticuerpo secundario diluido (también diluido en el tampón FACS) y se incubó en hielo durante 60 minutos en hielo. La bolita se lavó como antes y se resuspendió en 200µl de tampón FACS. Las muestras se cargaron en el citómetro de flujo BD FACScanto II y la información se analizó usando el software BD FACSdiva.

RESULTADOS

Los resultados del análisis de citometría de flujo demostró que 4 anticuerpos monoclonales designados BST1_A1, BST1_A2 y BST_A3 se unieron de manera efectiva a la BST1 humana de superficie celular. La Figura 3a muestra las especificidades de unión de BST1_A1 y BST1_A2 a BST1 en las células A549 y H226, respectivamente. La Figura 3b muestra las especificidades de unión BST1_A3 a BST1 en las células A549 y H226. Los resultados indican una unión fuerte de esos anticuerpos frente a BST1 en A549 y H226.

Ejemplo 4: Caracterización Estructural de los Anticuerpos Monoclonales a BST1

Las secuencias de cADN que codifican las regiones variables de los anticuerpos monoclonales BST1_A2 y BST1_A1 se obtuvieron usando técnicas PCR estándar y se formaron en secuencias usando técnicas estándar de formación de secuencias de ADN.

Las secuencias de anticuerpo pueden ser sometidas a mutagénesis para revertirse a los residuos de la línea germinal en uno o más residuos.

Las secuencias de nucleótido y de aminoácido de la región variable de cadena pesada de BST1_A2 son SEC ID NO: 10 y 2, respectivamente.

Las secuencias de nucleótido y de aminoácido de la región variable de cadena ligera de BST1_A2 son SEC ID NO: 14 y 6, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de BST1_A2 con las conocidas secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal de murino demostró que la cadena pesada de BST1_A2 utiliza un

segmento V_H de la línea germinal de murino V_H 1-39. El análisis posterior de la secuencia BST1_A2 V_H que utiliza el sistema Kabat de la determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en las SEC ID NOs:38, 42 y 46, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias BST1_A2 CDR1 y CDR2 V_H con la secuencia V_H 1-39 de línea germinal se muestran en la Figura 1a y 1b.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera BST1_A2 con las conocidas secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal de murino demostró que la cadena ligera BST1_A2 utiliza un segmento V_K de la línea germinal de murino V_K 4-55. El posterior análisis de la secuencia BST1_A2 V_K que utiliza el sistema Kabat de la determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en las SEC ID NOs:49, 52 y 55, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias BST1_A2 CDR1, CDR2 y CDR3 V_K con las secuencias V_K 4-55 de línea germinal se muestran en las Figuras 2a, 2b y 2c.

Las secuencias de nucleótido y de aminoácido de la región variable de cadena pesada de BST1_A1 son las SEC ID NO: 9 y 1, respectivamente.

Las secuencias de nucleótido y de aminoácido de la región variable de cadena ligera de BST1_A1 son las SEC ID NO: 13 y 5, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de la BST1_A1 con las conocidas secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal de murino demostró que la cadena pesada de BST1_A1 utiliza un segmento V_H de la línea germinal de murino V_H 1-80. El análisis posterior de la secuencia de BST1_A1 V_H utilizando el sistema de Kabat de la determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de

cadena pesada como se muestra en las SEC ID NOs:37, 41 y 45, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias BST1_A1 CDR1 y CDR2 V_H con la secuencia V_H 1-80 de línea germinal se muestran en las Figuras 1a y 1b.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de la BST1_A1 con las conocidas secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal de murino demostró que la cadena ligera de BST1_A1 utiliza un segmento V_K de la línea germinal de murino V_K 4-74. El análisis posterior de la secuencia BST1_A1 V_K que utiliza el sistema de Kabat de la determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en las SEC ID NOs:48, 51 y 54, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias de BST1_A1 CDR1, CDR2 y CDR3 V_K con las secuencias V_K 4-74 de línea germinal se muestran en las Figuras 2a, 2b y 2c.

Las secuencias de nucleótido y de aminoácido de la región variable de cadena pesada de BST1_A3 son las SEC ID NO: 54 y 52, respectivamente.

Las secuencias de nucleótido y de aminoácido de la región variable de cadena ligera de BST1_A3 son las SEC ID NO: 55 y 53, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de BST1_A3 con las conocidas secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal de murino demostró que la cadena pesada de BST1_A3 utiliza un segmento V_H de la línea germinal V_H de murino 69-1. El análisis posterior de la secuencia de BST1_A3 V_H que utiliza el sistema de Kabat de la determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en las SEC ID NOs: 56, 57 y 58, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias BST1_A3 CDR1 y CDR2 V_H

con las secuencias 69-1 de la línea germinal V_H de murino se muestran en las Figuras 1a y 1b.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de BST1_A3 con las conocidas secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal de murino demostró que la cadena ligera de BST1_A3 utiliza un fragmento V_K de la línea germinal 44-1 V_K de murino. El análisis posterior de la secuencia de la BST1_A3 V_K que utiliza el sistema de Kabat de la determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en las SEC ID NOs: 59, 60 y 61, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias BST1_A3 CDR1, CDR2 y CDR3 V_K con las secuencias 44-1 de la línea germinal V_K de murino se muestran en las Figuras 2a, 2b y 2c.

Ejemplo 5: Internalización y MabZAP de BST1_A1 y BST1_A2 en Células A549 y H226.

Internalización de BST1_A1 y BST1_A2 mediante H226 y A549 se investigó usando un ensayo MabZap. El ensayo MabZAP mostró la internalización de los anticuerpos monoclonales anti-BST1 mediante la unión de un anticuerpo secundario IgG antihumano conjugado con la saporina toxina. (Advanced Targeting System, San Diego, CA, IT-22-100). Primero, BST1 Fab se unió con la superficie de las células. Luego, los anticuerpos MabZAP se unieron a los anticuerpos primarios. Luego, el complejo MabZAP se internalizó mediante las células. La entrada de la Saporina en las células dio como resultado inhibición de la síntesis de proteína y eventual muerte celular.

El ensayo MabZAP se realizó de la siguiente manera. Cada una de las células fue sembrada a una densidad de 5×10^3 células por cavidad. El anticuerpo

monoclonal anti-BST1 o un IgG humano de control de isótopo se diluyó de manera serial luego se añadió a las células y se incubó durante 15 minutos a 25°C. El MabZAP se añadió luego y se incubó durante 72hr a 37°C. La viabilidad celular en las placas se detectó mediante el Kit de Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo® (Promega, G7571) y las placas fueron leídas y analizadas usando Promega Glomax. La muerte celular fue proporcional a la concentración de anticuerpos monoclonales anti-BST1. Las Figuras 4a y 4b muestran que los anticuerpos monoclonales anti-BST1, BST1_A1 y BST1_A2 fueron internalizados eficientemente mediante las células H226 y A549, en comparación con el anticuerpo de control de isótopo IgG antihumano.

Ejemplo 6: Humanización de BST1_A2

Para diseñar secuencias humanizadas de BST1_A2 V_H y V_L, los aminoácidos de marco importantes para la formación de la estructura de CDR se identificaron usando el modelo tridimensional. Las V_H y V_L humanas, secuencias con altas homologías con BST1_A2 también se seleccionaron de la base de datos GenBank. Las secuencias CDR junto con los residuos de aminoácido de marco identificados fueron injertados desde BST1_A2 a las secuencias de marco humanas (Figuras 5-7).

Ejemplo 7 Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo Mediada por Anti-BST1 mAbs

En primer lugar 25µl de anticuerpos anti-BST1 parental y no fucosilados (BST1_A2 y BST1_A2_NF) a concentraciones que fluctúan de 10nm/L a 0.1nm/L se añadió a cavidades separadas de una placa de fondo v de 96 cavidades junto con 50µl de células A549 y U937 que expresan BST1. Luego se añadió 25µl de células efectoras a las cavidades para producir un efector final: proporción (E: T)

diana de 10:1 y 25:1. La placa fue luego girada suavemente a 1000rpm durante 2 minutos, después de lo cual se incubó durante 4 horas a 37°C, incubador a 5% de CO₂. A 3 horas posterior a la incubación, 10µl de una solución de lisis se añadió a cada una de las cavidades que contiene células que expresan BST1 solas para medir la liberación máxima de LDH, y un grupo de cavidades que contiene medios solos para el control de corrección del volumen.

Después de la incubación, las células se agitaron suavemente a 1000rpm durante 2 minutos, después de lo cual 50µl del sobrenadante se transfirió a una placa de 96 cavidades de fondo plano. Usando el ensayo de Citotoxicidad No Radioactivo CytoTox 96® disponible en Promega (Cat #: G1780), los componentes del kit se reconstituyeron de acuerdo con las especificaciones del fabricante y luego se añadió a cada cavidad 50 µl de la mezcla de sustrato. Luego la placa se cubrió y se dejó incubar durante 30 minutos a 25°C protegida de la luz. Después de esto, 50 µl de Solución para Detener se añadió a cada cavidad y la absorbancia se registró a 490nm usando el lector de placas varioskan.

Usando un anticuerpo conocido para incitar la muerte celular vía ADCC como control positivo y un control de isótopo IgG1 humano como un control negativo, los resultados muestran que BST1_A2 y BST1_A2_NF eran capaces de elicitar ADCC en células A549 y U937 que expresan BST1. En las células A549 que expresan BST1, BST1_A2_NF se mostraron a aproximadamente 45% de muerte a 10nmol/L (Figura 8a). En las células U937 que expresan BST1, BST1_A2 se mostraron a aproximadamente 20% de muerte en 1nmol/L y BST1_A2_NF se mostraron a aproximadamente 45% de muerte en 1nmol/L (Figura 8b).

Ejemplo 8: Especificidad de Anticuerpos Monoclonales a BST1 Determinada por
Análisis de Citometría de Flujo en pacientes con AML

209
202

La capacidad de BST_A2 para unirse a linfoblastos de pacientes con AML se examinó mediante Análisis de Citometría de Flujo. Se tomó la sangre de 20 pacientes con AML. Usando el procedimiento como el descrito en el Ejemplo 3, se demostró que BST_A2 se une a los blastos de AML de aproximadamente 80% de pacientes con AML.

206
203

LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID No	Descripción	Secuencia
1	aa VH_A1	MKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFNSWINWV KQRPGQGLEWIGQIYPGDYDTNYNGKFKGKATLTADYSSSTAYMQLNSLTSEDSAVY FCARGGSIYYGNLGFDDWVGAGTTTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCL VKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSSETVTCNVA HPASSTKVDDKIVPRDCHHHHHHH MKQSTIALALLPLLFTPVAKAQAYLQQSGPELVKAGASVKMSCKASGYSFIEYTINWVK QSHGKSLEWIGNIDPYYGTTYNQMF TGKATLTVDQSSNTAYMQLKSLTSEDSAVYF CARGSAWFPYWGQGLTVTVSAAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPE PVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSSETVTCNVAHPASSTK VDKKIVPRDCHHHHHHH
2	aa VH_A2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEMVLTQSPAIMSTSLGERVTMTCTASSRVSSSYLH WYQQKPGSSPKLWIYSTNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQY HRSPYTFGGGKTLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKI DGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVK SFNRNES MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMSQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVTYMYWY QQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVVPRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDTATYYCQQWSN YPLTFGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSF NRNES
3	aa VK_A1	acgcttgtacatggagaaaataaagtgaaacaaagcactattgcactggcactctaccgctctattaccctgtggca aaagcccagggtgaagctfcagcagtcggggctgagctggtagggcctgctcagtggaagattcctgcaaggctt ctggctacgcattcagtaactcctggataaactgggtgaagcagaggcctggacagggctctgagtgaggatggacagatt tatcctggagattatgataactacaatggaaaattcaagggtaaagccacactgactgcagactactcctccagcac agcctacatgcagctcaacagcctaactctgaggactctgcggctctattctgtgcaaggggggagtcgatctactatggt aacctcgggttctcgaigtctggggcgaggaccaggtcacctgtcctcagccaaaacgacacccccatctgtcta tccactggccccgtgatctgtgcccactaaactccatggtgacctgggatgcctggtaagggctattccctgagcc agtgcagtgacctggaaactctggatccctgtccagcgggtgtgcacacctccagctgctcctgcagctgcacctctacact ctgagcagctcagtgactgtccctccagcacctggcccagcgagaccgtcacctgcaacgtgcccacccggccagc agcaccaagggtggacaagaaaattgtgccagggtattgtcatcatcaccatcaccatcactaattgacagcttatcatcg atangct
4	aa VK_A2	aaaacccctggcggtacccacgcttgtacatggagaaaataaagtgaaacaaagcactattgcactggcactctaccgc tctattaccctgtggcaaaagcccaggcttatctacagcagctctggacctgagctggaaggctggcgctcagtgaa gatgtcctgcaaggcttctggttactcattcattgagtacaccataaaactgggtgaacagagccatgaaagagcctga gtggattgaaatattgatccttattatggaaccactattacaatcagatgttcacgggcaaggccaattgactgtagacc aatctccaacactgcctacatgcagctcaagagcctgacatctgaggactctgcagctctattctgtgcaagaggctccgc ctggtttcttactggggccaggggactctgactgtctctgcagccaaaacgacacccccatctgtctatccactggcc cctggatctgtgcccactaaactccatgggtgacctgggtgacctggtaagggctattccctgagccagtgacagtg acctggaactctggatccctgtccagcgggtgtgcacacctccagctgtcctgcagctgcacctctacactctgagcagct cagtgactgtccccctcagcacctggcccagcgagaccgtcacctgcaacgttgcacccggccagcagcaccaag gtggacaagaaaattgtgccagggtattgtcatcatcaccatcaccatcactaattgacagcttatcatcgat gttttttggaaggagtgaaacgatgaaatacctattgcctacggcagccgctggattgttattactcgtgcccacccagcc atggccgaaatggttctcaccagctctccagcaatcatgtctacatctctaggggaacgggtcaccatgacctgcactgcc agctcacgtgtaagttccagttacttgactggtaccagcagaagccaggatcctcccccactctggatttatgtacat ccaacctggcttctggagtccagctcgtcctcagtggtgagtggtctgggacctctactctctcacaatcagcagcatgga ggctgaagatgtctgccacttattactgccaccagtatcatcgttccccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaa taaaacgggctgatgtctgcaccaactgtatccatctccaccatccagtgagcagtgtaacatctggagggtcctcagtcg tgtgtctctgaacaacttctaccccaaagacatcaatgtcaagtggaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgctc ctgaacagttggactgatcaggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagcacctcagctgaccaaaggacg agtatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcacccattgtcaagagcttcaacag gaatgagtcctaagtgattagctaattctagaacg
5	nt VH_A1	actctctactgtttctccatacccggttttttgatggagtgaaacgatgaaatacctattgcctacggcagccgctggattgtta
6	nt VH_A2	ttactcgtgcccacccagccatggccgacatcggtatgtctcagctccagcaatcatgtctcagctcctccaggggagaag
7	nt VK_A1	
8	nt VK_A2	

203
204

		gtcaccatgacctgcagtgccagctcaagtgtacttacatgtactggtaccagcagaagccaggatcctccccagact cctgatttatgacacatccaacctggcttctggagtcctgttcgcttcagtgccagtggtggtggtgacctctactctcaca atcagccgaatggaggctgaagatactgccacttattactgccagcagtgaggtaattaccactcacgttcggtgctggg accaagctggagctgaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatctccaccatccagtgagcagttaacatctgg aggcgctcagtcgtgtcttctgaacaactctaccccaaagacatcaatgtcaagtgaagattgatggcagtgaaag acaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagcacctcacgt tgaccaaggacgagatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcacccattgtcaa gagcttcaacaggaatgagcttaagtgattagctaattctagaacgcgcacttgccactggccgtcgtttta
9	aa VH_CDR1_A1	GYAFSNSWINW
10	aa VH_CDR1_A2	GYSFIEYTINW
11	aa VH_CDR2_A1	GQIYPGDYDTNYNGKFK
12	aa VH_CDR2_A2	GNIDPYYGTTYNQMFT
13	aa VH_CDR3_A1	ARGGSIYYGNLGFFDV
14	aa VH_CDR3_A2	ARGSAWFPY
15	aa VK_CDR1_A1	TASSRVSSSYLH
16	aa VK_CDR1_A2	SASSSVTYMY
17	aa VK_CDR2_A1	STSNLAS
18	aa VK_CDR2_A2	DTSNLAS
19	aa VK_CDR3_A1	HQYHRSPYT
20	aa VK_CDR3_A2	QQWSNYPLT
21	nt VH_CDR1_A1	ggctacgcattcagtaactcctggataaactgg
22	nt VH_CDR1_A2	ggttactcattcattgagtacaccataaactgg
23	nt VH_CDR2_A1	ggacagatttatcctggagattatgataactacaatggaaaattcaag
24	nt VH_CDR2_A2	ggaaatattgatccttattatgaaccactattacaatcagatgttcacg
25	nt VH_CDR3_A1	gcaagggggggaatgatctactatggtaacctcggttcttcgatgtc
26	nt VH_CDR3_A2	gcaagaggctccgcctggttccttac
27	nt VK_CDR1_A1	actgccagctcacgtgtaagttccagttactgcac
28	nt VK_CDR1_A2	agtgccagctcaagtgtacttacatgtac
29	nt VK_CDR2_A1	agtacatccaacctggcttct
30	nt VK_CDR2_A2	gacacatccaacctggcttct
31	nt VK_CDR3_A1	caccagtatcatcggtccccgtacacg
32	nt VK_CDR3_A2	cagcagtgaggtaattaccactcacg
	IGHV1-80*01 (Genebank:	
33	AC160990 Musmus) nt	ggctacgcattcagtagctactggatgaactgg
	138392-138424	
	IGHV1-80*01 (Genebank:	
34	AC160990 Musmus) nt	ggacagatttatcctggagatggtgataactacaacggaaagtcaag
	138461-138511	
	IGHV1-39*01 (Genebank:	
35	AC079181 Musmus) nt	ggttactcattcactgactacaacatgaactgg
	153362-153394	
	IGHV1-39*01 (Genebank:	
36	AC079181 Musmus) nt	ggagtaattaatcctaactatggtactactagctacaatcagaagtcaag
	153431-153481	
	IGKV4-74*01 (Genebank:	
37	AJ231217 Musmus) nt 496-	actgccagctcaagtgtgaagttccagttactgcac
	531	
	IGKV4-74*01 (Genebank:	
38	AJ231217 Musmus) nt 577-	agcacatccaacctggcttct
	597	
	IGKV4-74*01 (Genebank:	
39	AJ231217 Musmus) nt 691-	caccagtatcatcggtccccacca
	718	
	IGKV4-55*01 (Genebank:	
40	AJ231225 Musmus) nt 523-	agtgccagctcaagtgtgaagttacatgtac
	552	
41	IGKV4-55*01 (Genebank:	gacacatccaacctggcttct

204
205

	AJ231225 Musmus) nt 598-618	
	IGKV4-55*01 (Genebank:	
42	AJ231225 Musmus) nt 715-739	cagcagtgaggagtagtaccaccca
		MAAQGCAASRLQLLLQLLLLLLLAAGGARARWRGEGTSAHLRDI FLGRCAEYRALL SPEQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSVLP SDYDLFINLSRHSIPRDKSLFWENSHLLV 43 ADP-ribosyl cyclase 2 NSFADNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQKNDSGLDYQSCPTSEDCENNPVDSF (CD157; BST1) WKRA SIQYSKDSSGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGFADYEIPNLQKEKITRIEIVWMHEIG GPNVESC GEGSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAA ATQRKAPSLYTEQRAGLIIPFLVLASRTQL GARARWRGEGTSAHLRDI FLGRCAEYRALLSPEQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSV LPSDYDLFINLSRHSIPRDKSLFWENSHLLVNSFADNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSW 44 aa 29 – 292 of ADP-ribosyl CRQKNDSGLDYQSCPTSEDCENNPVDSFWKRA SIQYSKDSSGVIHVMLNGSEPTGA cyclase 2 (CD157; BST1) YPIKGFADYEIPNLQKEKITRIEIVWMHEIGGPNVESC GEGSMKVLEKRLKDMGFQYS CINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRK QAYLQQSGPELVKAGASVKMSCKASGYSFIEYTINWVKQSHGKSLEWIGNIDPYGTT 45 A2 VH (amino acids 21-137 TYYNQMFTGKATLTV DQSSNTAYMQLKSLTSEDSAVYFCARGSAWFPYWGQGLTVT SEQ ID No:2) VSA QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYSF IEYTINWVRQ 46 VH1 - Humanised VH_A2 APGQGLEWIGNIDPYGTTY NQMFTGRATL TVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYYCARGSAWF PYWGQGLTV TVSS QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYSF TXXXXXWVRQ APGQGLEWMG 47 BF238102 VH XXXXXXXXXXX XXXXXRVTL TRDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYYCARXXXXX XXXWGQGLTV PVSS DIVMSQSPA IMSASPGEKV TMTCSAS-SS VTMYWYQQKPGSSPRLLIY 48 A2 VL (amino acids 22-128 DTSNLASGVP VRFSGSGSGT SYSLTISRMEAEDTATYYCQ QWSNYPLTFG SEQ ID No:4) AGTKLELK DIQMTQSPS SLSASVGD RV TITCSAS-SS VTMYWYQQKPGKAPKLLIY 49 VL1 - Humanised VK_A2 DTSNLASGVP SRFSGSGSGT DYTLTISLQPEDFATYYCQ QWSNYPLTFG QGTKVEIK DIQMTQSPS SLSASVGD RV TITCXXXXX XXXXWYQQKPGKAPKLLIY 50 X72441 VL XXXXXXGVP SRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCX XXXXXXXXFG QGTKVEIK 51 VH1_CDR2 NIDPYGTTYYNQMFQ MKQSTIALALLPLFTPVAKAQVQLQQSRAELVMPGASVKMSCKTSGYTFSDYVWHW VRQRPQG LEWIGAIDGSDTFNDYSQKFGRATLTVDESSSTVYMQLSLTS EDSAV 52 aa VH_A3 YYCARGLLQYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQNSMVTLGCLVKGYFP EPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSETVTCNVAHPASST KVDKKIVPRDCHHHHHHH MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIQLTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLA WYQ QKQKSPQLLVYNTKLTGEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYCQH HYGT 53 aa VK_A3 PFTFGSGTKLEIKRAAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKWKIDGS ERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN RNES gtgaacaaagcactattgcactggcactctaccgctctattaccctgtggcaaaagcccagggtccagctgcagcag tctagggtgaactgtgatgcctggggtcctcagtgaaatgtcctgaagactctggctacacattctctgactactgggt acactgggtgaggcagaggcctggacaaggccttgatggatcggagcgattgatggttctgatactttaatgactaca gtcagaagttaagggcagggccacattgactgtagacgaatcctccagcacagtctacatgcaactcagcagcctgac atctgaggactctgcgtctattactgtgaaggggggcttctcagtgactgggccaaggcaccactctcacagtctc 54 nt VH_A3 ctacgcaaaacgacacccccatctgtctatccactggcccctggatctgctgcccactaactccatggtgacctgg gatgcctgtcaagggctatttcctgagccagtacagtgacctggaactctggatccctgacagcggtgtgcacacct tcccagctgtcctgcagtctgacctctacactctgagcagctcagtgactgtccctccagcacctggcccagcgagacc gtcacctgcaacgtgtcccacccggccagcagcaccaagggtgacaagaaaattgtgccagggtgtcatcatcac catcaccatcactaa atgaatactattgcctacggcagccgctggattgttactcgtgctgcccaccagcatggccgacattcagctgacc 55 nt VK_A3 cagctccagcctccctatctgcatctgtgggagaaactgtcaccatcacatgtcagcaagtgaaaacatttacagttatt

205
206

		agcatggtatcagcagaaacagggaaaatctcctcagctcctggtctataatacaaaaaccttaggagaagggtgtgcca
		tcaagggtcagtggcagtggtcgggcacacaattttctgaagatcaacagcctgcagcctgaagattttgggagttatt
		actgtcaacatcattatggtactccattcacgttcggctcggggacaaagttggaaataaaacgggctgatgctgcacca
		actgtatccatctcccaccatccagtgagcagttaacatctggagggtgcctcagtcgtgtcttgaacaactctacccc
		aaagacatcaatgtcaagtgaagattgatggcagtgaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggac
		agcaaagacagcacctacagcatgagcagcacccctcacgttgaccaaggacgagatgaacgacataacagctata
		cctgtgagggccactcacaagacatcaactcaccattgtcaagagctcaacaggaatgagcttaa
56	aa VH_CDR1_A3	GYTFSDYWVHW
57	aa VH_CDR2_A3	GAIDGSDTFNDYSQKFK
58	aa VH_CDR3_A3	ARGGLLQY
59	aa VK_CDR1_A3	RASENIYSYLA
60	aa VK_CDR2_A3	NTKTLGE
61	aa VK_CDR3_A3	QHHYGTPT
62	nt VH_CDR1_A3	ggctacacattctgactactgggtacactgg
63	nt VH_CDR2_A3	ggagcgattgatggtctgatacttttaatgactacagtcagaagttaag
64	nt VH_CDR3_A3	gcaagggggggccttcttcagtac
65	nt VK_CDR1_A3	cgagcaagtgaacacattacagttatttagca
66	nt VK_CDR2_A3	aatacaaaaaccttaggagaa
67	nt VK_CDR3_A3	caacatcattatggtactccattcacg
68	IGHV1-69*01 (AC073939)	ggctacacctcaccagctactggatgcactgg
69	IGHV1-69*01 (AC073939)	ggagagattgatcctctgatagttataactacaatcaaaagtcaag
70	IGKV12-44*01 (AJ235955)	cgagcaagtgagaatatttacagttatttagca
71	IGKV12-44*01 (AJ235955)	aatgcaaaaaccttagcagaa
72	IGKV12-44*01 (AJ235955)	caacatcattatggtactcctcc

206
208**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo que se une específicamente a BST1, comprendiendo dicho anticuerpo:
 - a) una región variable de cadena pesada que comprende:
 - i) una primera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 10;
 - ii) una segunda vhCDR que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NO: 12 y SEC ID NO: 51; y
 - iii) una tercera vhCDR que comprende una SEC ID NO: 14; y
 - b) una región variable de cadena ligera que comprende:
 - i) una primera vlCDR que comprende una SEC ID NO: 16;
 - ii) una segunda vlCDR que comprende una SEC ID NO: 18; y
 - iii) una tercera vlCDR que comprende una SEC ID NO: 20.
2. Un anticuerpo que se une especialmente con BST1, comprendiendo dicho anticuerpo:
 - a) una región variable de cadena pesada que comprende:
 - j) una primera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 9;
 - ii) una segunda vhCDR que comprende la SEC ID NO: 11; y
 - iii) una tercera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 13; y
 - b) una región variable de cadena ligera que comprende:
 - j) una primera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 15;
 - ii) una segunda vlCDR que comprende la SEC ID NO: 17; y
 - iii) una tercera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 19.
3. Un anticuerpo que se une específicamente con BST1, comprendiendo dicho anticuerpo:
 - a) una región variable de cadena pesada que comprende:
 - k) una primera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 56;
 - ii) una segunda vhCDR que comprende la SEC ID NO: 57; y

207
208

- iii) una tercera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 58; y
 - b) una región variable de cadena ligera que comprende:
 - k) una primera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 59;
 - ii) una segunda vlCDR que comprende la SEC ID NO: 60; y
 - iii) una tercera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 61.
4. Un anticuerpo variante que comprende regiones variables variantes de un anticuerpo original, en donde el anticuerpo original comprende:
- a) una primera vhCDR que comprende la SEC ID N O: 10;
 - b) una segunda vhCDR que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID NO: 12 y la SEC ID NO: 51;
 - c) una tercera vhCDR que comprende la SEC IF NO: 14;
 - d) una primera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 16;
 - e) una segunda vlCDR que comprende la SEC ID NO: 18; y
 - f) una tercera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 10;
- en donde dicho anticuerpo variante tiene de uno a cuatro cambios de aminoácido colectivamente en dicha primera vhCDR, dicha segunda vhCDR, dicha tercera vhCDR, dicha primera vlCDR, dicha segunda vlCDR y dicha tercera vlCDR.
5. Un anticuerpo variante que comprende regiones variables variantes de un anticuerpo original, en donde el anticuerpo original comprende:
- a) una primera vhCDR que comprende la SEC ID N O: 19;
 - b) una segunda vhCDR que comprende la SEC ID NO: 11;
 - c) una tercera vhCDR que comprende la SEC IF NO: 13;
 - d) una primera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 115;
 - e) una segunda vlCDR que comprende la SEC ID NO: 17; y
 - f) una tercera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 19;
- en donde dicho anticuerpo variante tiene de uno a cuatro cambios de aminoácido colectivamente en dicha primera vhCDR, dicha segunda

vhCDR, dicha tercera vhCDR, dicha primera vlCDR, dicha segunda vlCDR y dicha tercera vlCDR.

6. Un anticuerpo variante que comprende regiones variables variantes de un anticuerpo original, en donde el anticuerpo original comprende:
 - a) una primera vhCDR que comprende la SEC ID N O: 56;
 - b) una segunda vhCDR que comprende la SEC ID NO: 57; y
 - c) una tercera vhCDR que comprende la SEC IF NO: 58;
 - d) una primera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 59;
 - e) una segunda vlCDR que comprende la SEC ID NO: 60; y
 - f) una tercera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 61;en donde dicho anticuerpo variante tiene de uno a cuatro cambios de aminoácido colectivamente en dicha primera vhCDR, dicha segunda vhCDR, dicha tercera vhCDR, dicha primera vlCDR, dicha segunda vlCDR y dicha tercera vlCDR.
7. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 4, que comprende:
 - a) una cadena pesada por lo menos 95% idéntica a la SEC ID NO: 2 y una cadena ligera por lo menos 95% idéntica a la SEC ID NO: 4.
8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:
una región variable de cadena pesada de la SEC ID NO: 2,
una región variable de cadena ligera de la SEC ID NO: 4.
9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2 o 5 que comprende:
 - c) una cadena pesada por lo menos 95% idéntica a la SEC ID NO: 1, y
 - d) una cadena ligera por lo menos 95% idéntica a la SEC ID NO: 3.
10. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2 que comprende:

- e) una región variable de cadena pesada de la SEC ID NO: 1, y
 - f) una región variable de cadena ligera de la SEC ID NO: 3.
11. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:
- g) una cadena pesada por lo menos 95% idéntica a la SEC ID NO: 45, y
 - h) una cadena ligera por lo menos 95% idéntica a la SEC ID NO: 46.
12. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 11 que comprende:
- i) una región variable de cadena pesada de la SEC ID NO: 45, y
 - j) una región variable de cadena ligera de la SEC ID NO: 46.
13. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3 o 6 que comprende:
- k) una cadena pesada por lo menos 95% idéntica a la SEC ID NO: 52, y
 - l) una cadena ligera por lo menos 95% idéntica a la SEC ID NO: 53.
14. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 13 que comprende:
- m) una región variable de cadena pesada de la SEC ID NO: 52, y
 - n) una región variable de cadena ligera de la SEC ID NO: 53.
15. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que une un epítipo en BST1 reconocido por un anticuerpo establecido en cualquiera de las reivindicaciones precedentes incluyendo cambios de ADN y aminoácido que mantienen por lo menos 80% de la unión a BST1 de las secuencias originales.
16. El anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que comprende una fracción unida covalentemente.

17. El anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 13 en donde dicha fracción es un fármaco.
18. El anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicho fármaco se selecciona del grupo que consiste de un maitansinoide, una dolastatina, una auristatina, un tricoteceno, una calicheamicina CC1065 y derivados de los mismos.
19. El anticuerpo aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en donde dicho anticuerpo induce la citotoxicidad mediada por una célula dependiente de un anticuerpo (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o la citotoxicidad de la célula T.
20. El anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el anticuerpo es un anticuerpo diseñado que tiene una unión incrementada a los receptores de Fc y/o una potencia incrementada para ADCC, y/o un anticuerpo biespecífico.
21. El anticuerpo aislado de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico o multiespecífico que se une específicamente con un primer antígeno que comprende BST1 y un segundo antígeno seleccionado del grupo que consiste de antígeno CD3 y antígeno CD5.
22. Un ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
23. Un ácido nucleico que codifica una cadena ligera del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

177
271
212

24. Una célula huésped que contiene los ácidos nucleico de la reivindicación 22 y/o 23.
25. Un método para hacer un anticuerpo que comprende cultivar una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 24, bajo condiciones en donde el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo está expresado y aislar opcionalmente el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo.
26. Un método para tratar una enfermedad que comprende administrar a un paciente que lo necesita un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo es internalizado mediante una célula que expresa BST1, comprendiendo dicho anticuerpo un conjugado de fármaco covalentemente unido.
27. Un método para tratar una enfermedad que comprende administrar a un paciente que lo necesita un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde el anticuerpo induce la citotoxicidad mediada por una célula dependiente del anticuerpo (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o la citotoxicidad de la célula T.
28. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26-27, en donde dicha enfermedad es cáncer, incluyendo leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica de célula B, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario y cáncer pancreático.

29. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26-27, en donde dicha enfermedad es una enfermedad inflamatoria, incluyendo asma, gota, enfermedad de Crohns, lupus, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, diabetes y aterosclerótica.
30. Un anticuerpo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-18 para usar en terapia o para usar como un medicamento.

ANTICUERPOS**RESUMEN TÉCNICO**

La invención proporciona anticuerpos que se unen a la ciclasa 2 ADP-ribosil. También se proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, vectores de expresión, células huésped y métodos para expresar los anticuerpos. Los anticuerpos pueden usarse para el tratamiento de cánceres humanos, incluyendo leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica de célula B, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario y cáncer pancreático y enfermedades inflamatorias humanas, incluyendo asma, gota, enfermedad de Crohns, lupus, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, diabetes y aterosclerosis.

27A
215

Alineaciones VH CDR1

A1

SEQ ID No: 21 ggctacgcattcagtaactcctggataaactgg
SEQ ID No: 33 ggctacgcattcagtagctactggatgaactgg
***** ** *****

A2

SEQ ID No: 22 ggttactcattcattgagtaaccataaactgg
SEQ ID No: 35 ggttactcattcactgactacaacatgaactgg
***** *** **** *

A3

SEQ ID No: 62 ggctacacattctctgactactgggtacactgg
SEQ ID No: 68 ggctacaccttcaccagctactggatgcactgg
***** * ***** *

Figura 1a

Alineaciones VH CDR2

A1

SEQ ID No: 23 ggacagattttatcctggagattatgataactaactacaatggaaaattcaag
SEQ ID No: 34 ggacagattttatcctggagatggtgataactaactacaacggaaagttcaag
***** *****

A2

SEQ ID No: 24 ggaaatattgatccttattatggaaccacttattacaatcagatgttcacg
SEQ ID No: 36 ggagtaattaatcctaactatggtactactagctacaatcagaagttcaag
*** * ***** *

A3

SEQ ID No: 63 ggagcgattgatggttctgatacttttaatgactacagtcagaagtttaag
SEQ ID No: 69 ggagagattgatccttctgatagttataactaactacaatcaaaagttcaag
***** ***** * * *****

Figura 1b

215



218
216

- 2/6 -

Alineaciones VK CDR1

A1

```
SEQ ID No: 27      actgccagctcacgtgtaagttccagttacttgcac
SEQ ID No: 37      actgccagctcaagtgtaagttccagttacttgcac
*****
```

A2

```
SEQ ID No: 28      agtgccagctcaagtgtaacttacatgtac
SEQ ID No: 40      agtgccagctcaagtgtaagttacatgtac
*****
```

A3

```
SEQ ID No: 65      cgagcaagtgaaaacatttacagttatttagca
SEQ ID No: 70      cgagcaagtgagaatatttacagttatttagca
***** ** *****
```

Figura 2a

Alineaciones VK CDR2

A1

```
SEQ ID No: 29      agtacatccaacctggcttct
SEQ ID No: 38      agcacatccaacctggcttct
** *****
```

A2

```
SEQ ID No: 30      gacacatccaacctggcttct
SEQ ID No: 41      gacacatccaacctggcttct
*****
```

A3

```
SEQ ID No: 66      aatacaaaaaccttaggagaa
SEQ ID No: 71      aatgcaaaaaccttagcagaa
*** *****
```

Figura 2b

Alineaciones VK CDR3

A1

```
SEQ ID No: 31      caccagtatcatcggttccccgtacacg
SEQ ID No: 39      caccagtatcatcggttccccaccca--
***** **
```

A2

```
SEQ ID No: 32      cagcagtggagtaattaccactcacg
SEQ ID No: 42      cagcagtggagtagttaccaccca--
***** **
```

A3

```
SEQ ID No: 67      caacatcattatggtactccattcacg
SEQ ID No: 72      caacatcattatggtactcctcc----
*****
```

Figura 2c

7/6
2/8

- 3/6 -

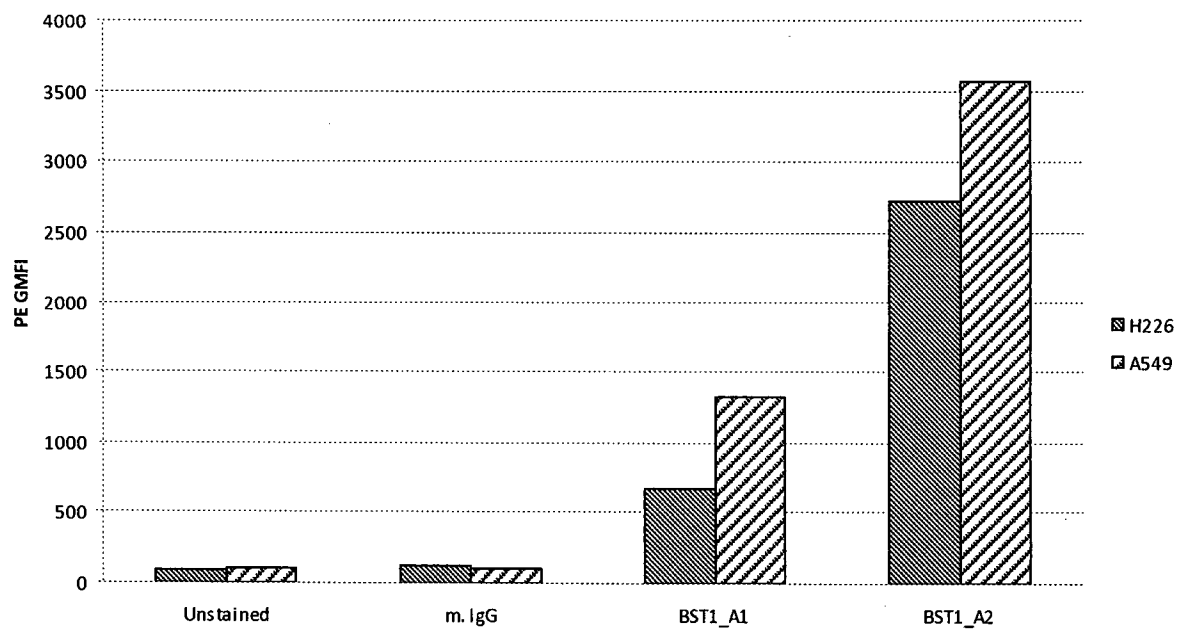


Figura 3a

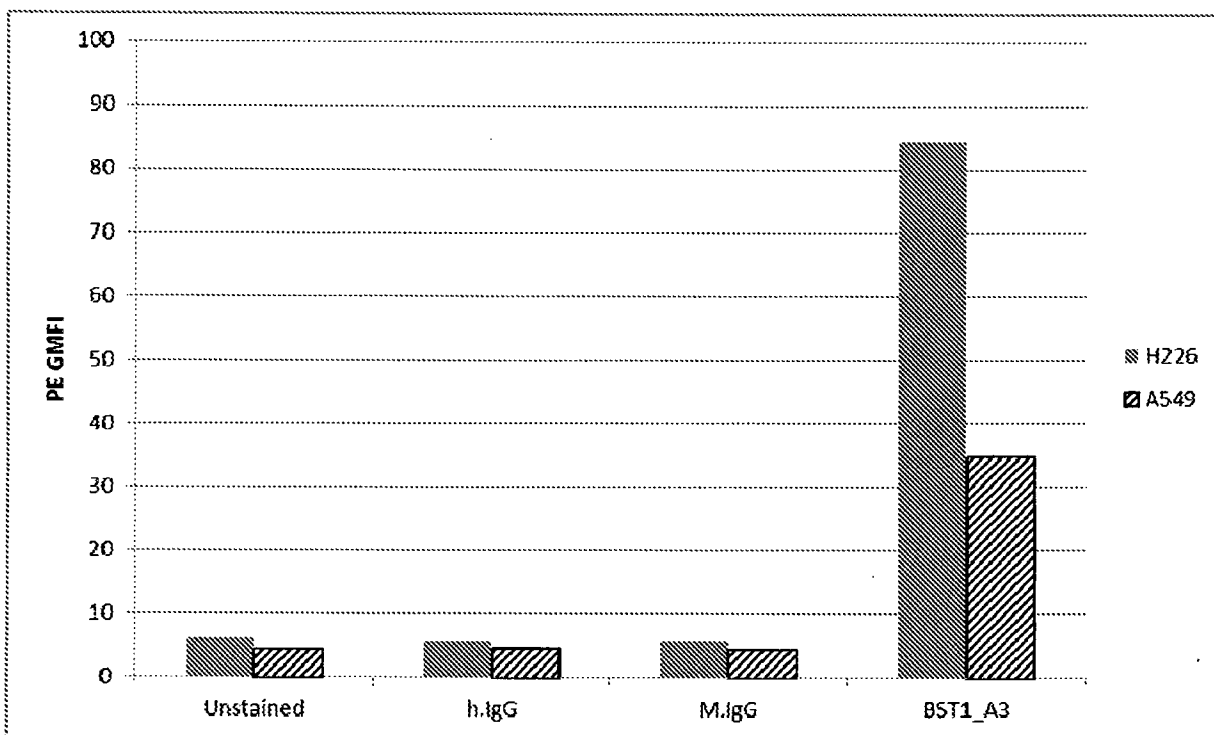


Figura 3b

277
218

- 4/6 -

Internalización: BST1_A2 vs H226

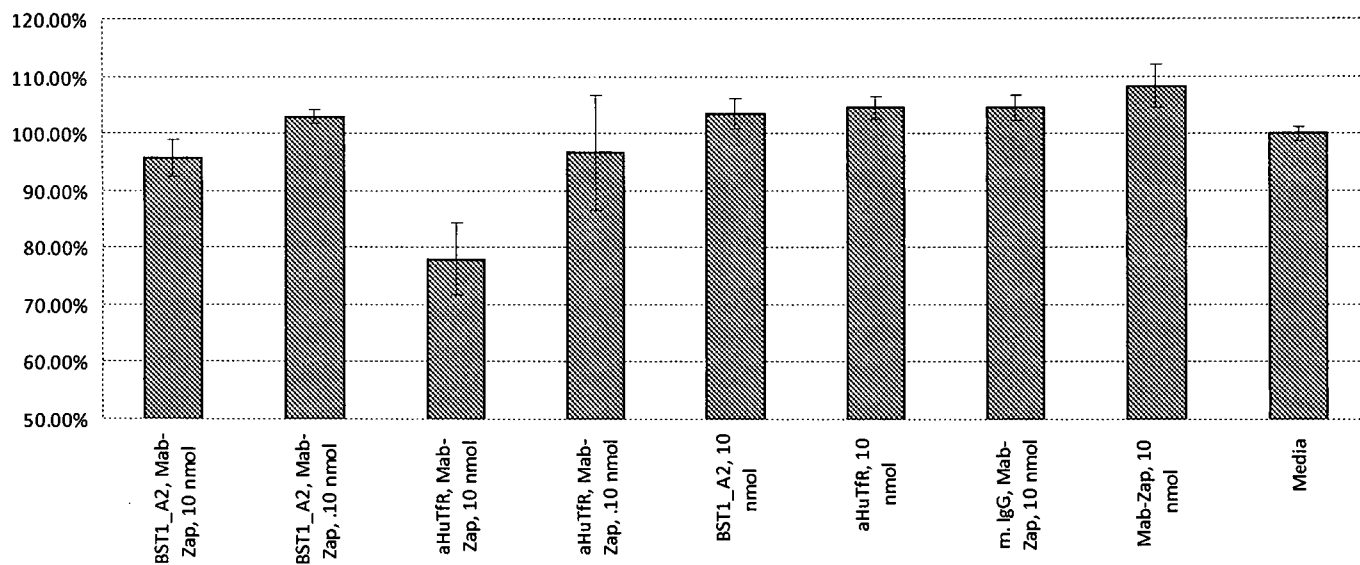


Figura 4a

Internalización: BST1_A2 vs A549

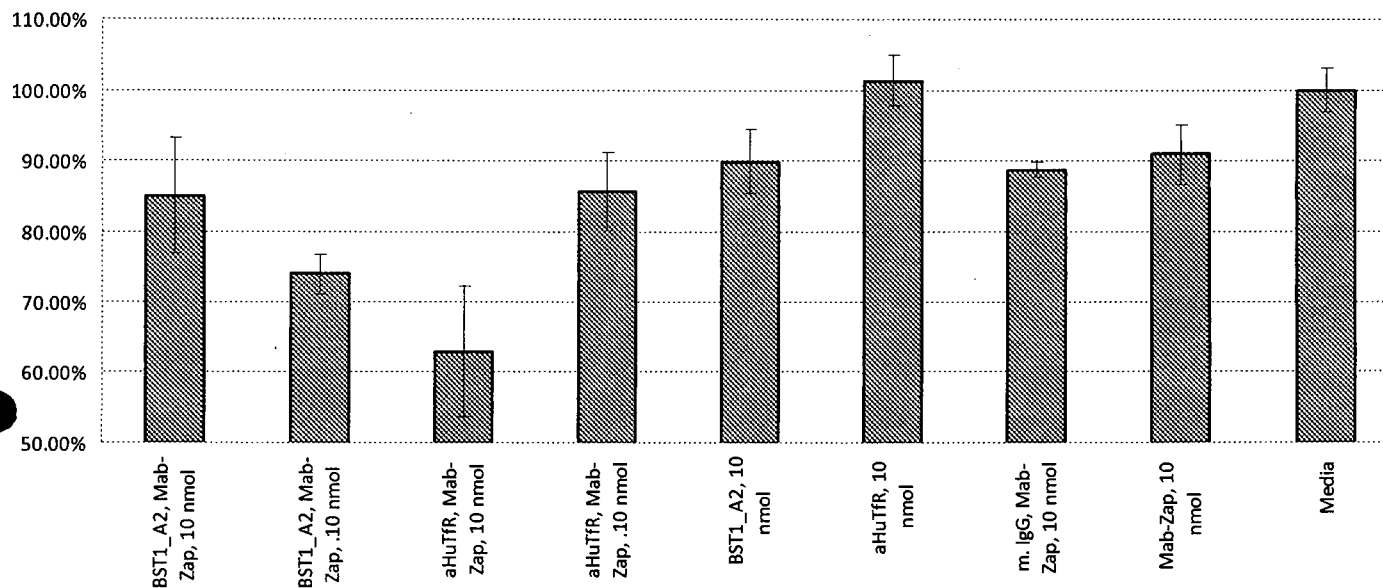


Figura 4b

218
219

- 5/6 -

	1	2	3	4
	123456789	0123456789	0123456789	0123456789
SEQ ID No: 45	QAYLQOSGP	ELVKAGASVK	MSCKASGYSF	IEYTINWVKQ SHGKSLEWIG
SEQ ID No: 46	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYSF	IEYTINWVRQ APGQGLEWIG
SEQ ID No: 47	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYSF	TXXXXXWVRQ APGQGLEWMG

	5	6	7	8
	01223456789	0123456789	0123456789	012223456789
SEQ ID No: 45	NIDPYYGTTY	NQMFTG KATL	TVDQSSNTAY	MQLKSLTSEDSAV
SEQ ID No: 46	NIDPYYGTTY	NQMFTGR ATL	TVDTISISTAY	MELSRLRSDDTAV
SEQ ID No: 47	XXXXXXXXXXXX	XXXXXXRVTL	TRDTSISTAY	MELSRLRSDDTAV

	1	1
	9	0
	0123456789	0123456789
SEQ ID No: 45	YFCARGSAWF	-PYWGQGLTV TVSA
SEQ ID No: 46	YYCARGSAWF	-PYWGQGLTV TVSS
SEQ ID No: 47	YYCARXXXXX	XXXWGQGLTV PVSS

Figura 5

	1	2	3
	123456789	0123456789	0123456789
SEQ ID No: 48	DIVMSQSPA	IMSASPGKVV	TMTCSAS-SS VTYMYWYQQK
SEQ ID No: 49	DIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCSAS-SS VTYMYWYQQK
SEQ ID No: 50	DIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCXXXXXX XXXXXWYQQK

	4	5	6	7
	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
SEQ ID No: 48	PGSSPRLLIY	DTSNLAS GVP	VRFSGSGSGT	SYSLTISRME
SEQ ID No: 49	PGKAPKLLIY	DTSNLAS GVP	SRFSGSGSGT	DYTLTISSLQ
SEQ ID No: 50	PGKAPKLLIY	XXXXXXXXGVP	SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ

		1
	8	9
	0123456789	0123456789
SEQ ID No: 48	AEDTATYYCQ	QWSNYPL TFG AGTKLELK
SEQ ID No: 49	PEDFATYYCQ	QWSNYPL TFG QGTVKEIK
SEQ ID No: 50	PEDFATYYCX	XXXXXXXXXFG QGTVKEIK

Figura 6

SEQ ID No: 12	GNIDPYYGTTYYNQMFT
SEQ ID No: 51	GNIDPYYGTTYYNQMFO

Figura 7

279
220

- 6/6 -

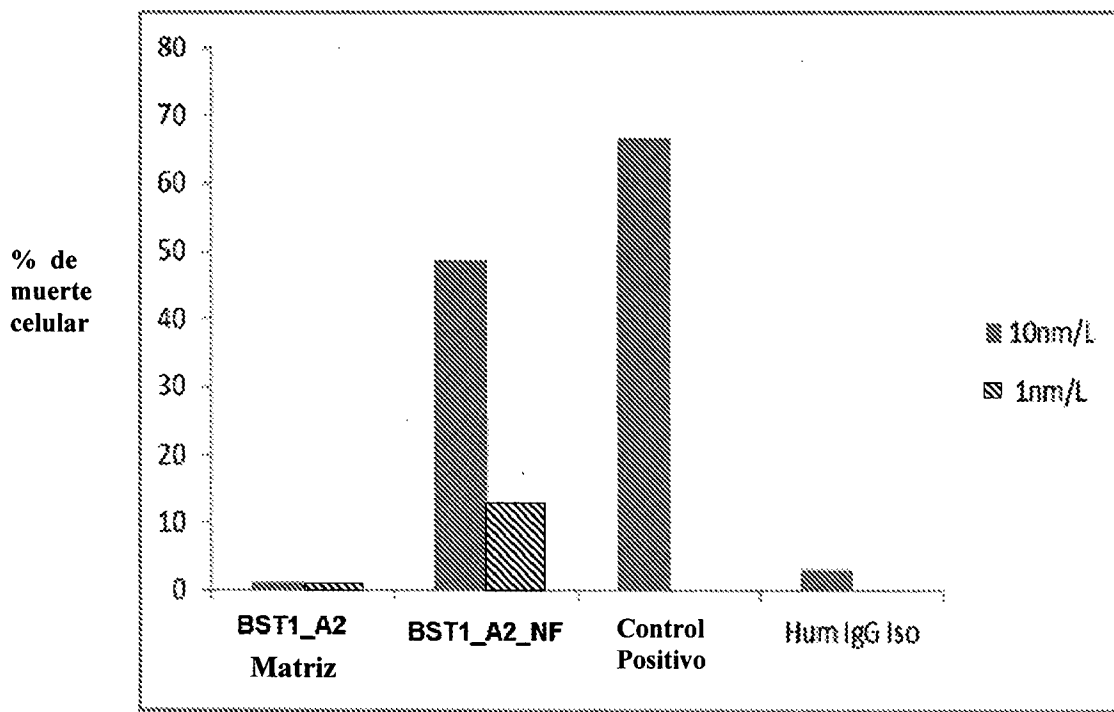


Figura 8a

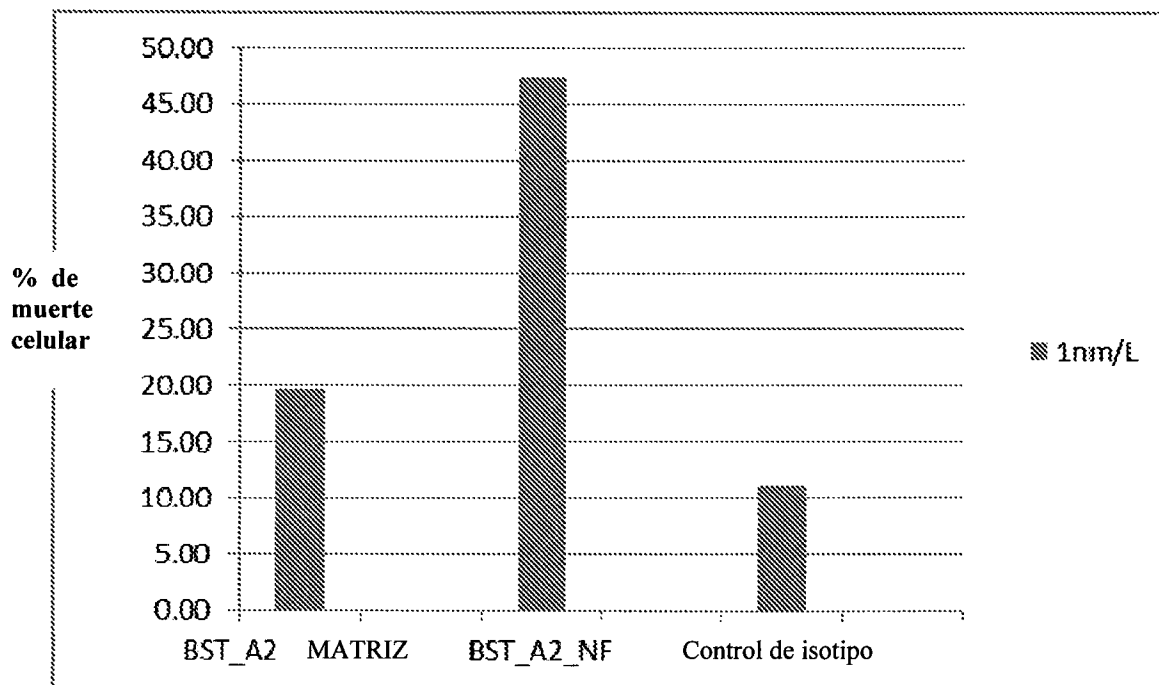


Figura 8b

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

220
221



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 133391

Bogotá D.C., Diciembre 23 de 2013 - 16:06:52

RECIBIDO DE : TRIANA URIBE & MICHELSEN LTDA

NI 830.001.432

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426500093	23/12/2013	1.200.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
22 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	660.000.00
				\$660.000.00

SON: **SEISCIENTOS SESENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-299760- -00000-0000

Fecha: 2013-12-24 14:02:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCREACI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 22 222

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Diciembre 23 de 2013 - 16:06:52

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 133390

Bogotá D.C., Diciembre 23 de 2013 - 16:06:52

RECIBIDO DE : TRIANA URIBE & MICHELSEN LTDA

NI 830.001.432

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426500093	23/12/2013	1.200.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-299760- -00000-0000

Fecha: 2013-12-24 14:02:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCREACI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 221 222

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Diciembre 23 de 2013 - 16:06:52



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-299760- -00000-0000

Fecha: 2013-12-24 14:02:17

Dep. 2020 DIR.NUEVASCREACI

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 221

222

PATENTE DE INVENCION ☐MODELO ☐

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐