

ANTICUERPOS ANTI-MCAM Y MÉTODOS DE USO ASOCIADOS

REFERENCIAS CRUZADAS CON SOLICITUDES RELACIONADAS

5 La presente invención reclama prioridad de la
Solicitud Provisional Estadounidense No. 61/952,116,
presentada el 12 de marzo de 2014, la Solicitud Provisional
Estadounidense No. 61/952,833, presentada el 13 de marzo de
2014, la Solicitud Provisional Estadounidense No. 62/023,724,
10 presentada el 11 de julio de 2014, y la Solicitud Provisional
Estadounidense No. 62/068,419, presentada el 24 de octubre de
2014, cada una de las solicitudes antes mencionadas se
incorpora en su totalidad en este documento para todos los
propósitos.

**REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS, UNA TABLA O UN LISTADO
DE PROGRAMA DE COMPUTO**

15 El listado de secuencias escrito en el archivo
4589SEQLIST.txt, creado el 4 de marzo de 2015 para
20 "ANTICUERPOS ANTI-MCAM Y MÉTODOS DE USO ASOCIADOS" es de 154
kilobytes. La información contenida en este archivo se
incorpora aquí como referencia.

ANTECEDENTES

25 Un subconjunto de células T CD4+, denominadas
células TH17 (células T 17 auxiliares), ha sido implicado en
la patogénesis de varias enfermedades autoinmunes, en
particular las condiciones neuroinflamatorias que implican la

infiltración al SNC de las células T, tales como esclerosis múltiple y el modelo animal, encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Se ha reportado que las células TH17 secretan una serie de citocinas selectas incluyendo IL-17 e IL-22. Se ha reportado que las células TH17 se someten a captación específica y a infiltración tisular. Se ha reportado que el MCAM es expresado en las células TH17 y se une a laminina alfa-4 como un ligando.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION REIVINDICADA

La invención proporciona anticuerpos que comprenden una región madura variable de cadena pesada que comprende los tres CDRs de Kabat de la SEQ ID NO: 161, excepto que la posición 32 (numeración de Kabat) puede ser N, S o Q, y la posición 33 (numeración de Kabat) puede ser G o A, y en donde la posición 1 (numeración de Kabat) está ocupada por E, y una región madura variable de cadena ligera que comprende los tres CDRs de Kabat de la SEQ ID NO: 123. En algunos anticuerpos, la región madura variable de cadena pesada es por lo menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 161, y la región madura variable de cadena ligera es por lo menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 123. Algunos de estos anticuerpos son anticuerpos humanizados. En algunos de dichos anticuerpos, la región madura variable de cadena pesada es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 161, y la región madura variable de cadena ligera es por lo menos 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 123. En algunos de dichos anticuerpos, la región madura variable de cadena pesada es

por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 161, y la región madura variable de cadena ligera es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 123. En algunos de dichos anticuerpos, la región madura variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:160, o SEQ ID NO:161, y en donde la región madura variable de cadena ligera es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID NO:123. En algunos de dichos anticuerpos, la región madura variable de cadena pesada es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 161 y la región madura variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122, o SEQ ID NO:123. En algunos de dichos anticuerpos, la región madura variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:160, o SEQ ID NO:161, y la región madura variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122, o SEQ ID NO:123. En algunos de dichos anticuerpos, la región variable madura de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 161 y la región madura variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:123. En algunos de dichos anticuerpos, la región constante de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 171 o 172 y/o la región constante de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:168.

La invención proporciona además anticuerpos anti-MCAM que se unen a MCAM humano (SEQ ID NO: 11) en un epítopo

que incluye residuo de aminoácido 141. En algunos anticuerpos, el epítipo comprende residuo de aminoácido 145. En algunos anticuerpos, el epítipo comprende por lo menos cinco residuos de aminoácidos contiguos de MCAM humano
5 incluyendo residuo de aminoácido 141. En algunos dichos anticuerpos, el anticuerpo no es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de:

(a) clon 15 que tiene una región madura variable de cadena pesada que corresponde a la SEQ ID NO:18 y una región
10 madura variable de cadena ligera que corresponde a la SEQ ID NO:13;

(b) clon 17 que tiene una región madura variable de cadena pesada que corresponde a la SEQ ID NO:7 y una región
15 madura variable de cadena ligera que corresponde a la SEQ ID NO:2;

(c) 1174.1.3 que tiene una región madura variable de cadena pesada que corresponde a la SEQ ID NO:35 y una
región madura variable de cadena ligera que corresponde a la SEQ ID NO:30;

20 (d) 1414.1.2 que tiene una región madura variable de cadena pesada que corresponde a la SEQ ID NO:45 y una
región madura variable de cadena ligera que corresponde a la SEQ ID NO:40;

(e) 1415.1.1 que tiene una región madura variable
25 de cadena pesada que corresponde a la SEQ ID NO:55 y una
región madura variable de cadena ligera que corresponde a la SEQ ID NO:50;

(f) 1749.1.3 que tiene una región madura variable

de cadena pesada que corresponde a la SEQ ID NO:65 y una región madura variable de cadena ligera que corresponde a la SEQ ID NO:60;

5 (g) 2120.4.19 que tiene una región madura variable de cadena pesada que corresponde a la SEQ ID NO:77 y una región madura variable de cadena ligera que corresponde a la SEQ ID NO:70;

10 (h) 2107.4.10 que tiene una región madura variable de cadena pesada que corresponde a la SEQ ID NO:89 y una región madura variable de cadena ligera que corresponde a la SEQ ID NO:84; y

(i) un anticuerpo que comprende CDRs sustancialmente de los anticuerpos monoclonales 1174.1.3, 1414.1.2 , 1415.1.1, 1749.1.3, 2120.4.19, y 2107.4.10. En 15 algunos dichos anticuerpos, el anticuerpo es monoclonal. En algunos dichos anticuerpos, el anticuerpo es quimérico, humanizado, revestido y humano.

En algunos dichos anticuerpos, el anticuerpo no es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de:

20 (a) clon 15 que tiene una región madura variable de cadena pesada que corresponde a la SEQ ID NO:18 y una región madura variable de cadena ligera que corresponde a la SEQ ID NO:13;

25 (b) clon 17 que tiene una región madura variable de cadena pesada que corresponde a la SEQ ID NO:7 y una región madura variable de cadena ligera que corresponde a la SEQ ID NO:2;

(c) 1174.1.3 que tiene una región madura variable

de cadena pesada que corresponde a la SEQ ID NO:35 y una
región madura variable de cadena ligera que corresponde a la
SEQ ID NO:30;

(d) 1414.1.2 que tiene una región madura variable
5 de cadena pesada que corresponde a la SEQ ID NO:45 y una
región madura variable de cadena ligera que corresponde a la
SEQ ID NO:40;

(e) 1415.1.1 que tiene una región madura variable
de cadena pesada que corresponde a la SEQ ID NO:55 y una
10 región madura variable de cadena ligera que corresponde a la
SEQ ID NO:50;

(f) 1749.1.3 que tiene una región madura variable
de cadena pesada que corresponde a la SEQ ID NO:65 y una
región madura variable de cadena ligera que corresponde a la
15 SEQ ID NO:60;

(g) 2120.4.19 que tiene una región madura variable
de cadena pesada que corresponde a la SEQ ID NO:77 y una
región madura variable de cadena ligera que corresponde a la
SEQ ID NO:70, 71 o 72;

(h) 2107.4.10 que tiene una región madura variable
20 de cadena pesada que corresponde a la SEQ ID NO:89 y una
región madura variable de cadena ligera que corresponde a la
SEQ ID NO:82 u 84; y

(i) un anticuerpo que comprende CDRs
25 sustancialmente de los anticuerpos monoclonales 1174.1.3,
1414.1.2 , 1415.1.1, 1749.1.3, 2120.4.19, y 2107.4.10. En
algunos dichos anticuerpos, el anticuerpo es monoclonal. En
algunos dichos anticuerpos, el anticuerpo es quimérico,

humanizado, revestido y humano.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos mencionados.

5 La invención proporciona además formulaciones farmacéuticas que comprenden (a) cualquier anticuerpo aquí descrito presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 1 mg/mL a aproximadamente 100 mg/mL; (b) un tampón, tal como tampón de histidina, presente en una
10 concentración dentro del rango de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM; (c) un azúcar y/o poliol, tal como sacarosa o trehalosa, presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 260 mM; y (d) un surfactante, tal como polisorbato 20, presente en
15 una concentración dentro del rango de aproximadamente 0.005% a aproximadamente 0.05% en peso; en donde la formulación se caracteriza por un pH dentro del rango de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7.

 Una formulación farmacéutica ejemplar comprende (a)
20 cualquier anticuerpo aquí descrito, en donde el anticuerpo está presente en una concentración de aproximadamente 40 mg/mL; (b) tampón de histidina presente en una concentración de aproximadamente 20 mM; (c) sacarosa presente en una concentración de aproximadamente 220 mM; (d) polisorbato 20
25 presente en una concentración de aproximadamente 0.02%; y (e) un pH de aproximadamente 6.0.

 Otra formulación farmacéutica ejemplar comprende (a) cualquier anticuerpo aquí descrito, en donde el

anticuerpo está presente en una concentración de aproximadamente 40 mg/mL; (b) tampón de histidina presente en una concentración de aproximadamente 20 mM; (c) trehalosa presente en una concentración de aproximadamente 220 mM; (d) 5 polisorbato 20 presente en una concentración de aproximadamente 0.02%; y (e) un pH de aproximadamente 6.5.

Algunas formulaciones proporcionadas por la invención comprenden además un agente de carga, son estériles, y/o son estables en congelación y descongelación. 10 En algunas formulaciones, por lo menos el 65% de anticuerpos aparece como un solo pico en cromatografía de interacción hidrófoba después del almacenamiento durante por lo menos 30 días a 38-42°C y/o después del almacenamiento durante por lo menos 3 meses a 38-42°C. En algunas formulaciones, no más del 15 5% de proteína agregada en peso en cromatografía por exclusión de tamaño de alto rendimiento después del almacenamiento durante por lo menos 30 días a 38-42°C y/o después del almacenamiento durante por lo menos 3 meses a 38-42°C.

20 Las formulaciones de anticuerpos proporcionadas por la invención pueden estar en forma de una formulación liofilizada. Por ejemplo, una formulación liofilizada representativa puede comprender: (a) cualquier anticuerpo aquí descrito; (b) tampón de histidina; (c) sacarosa o 25 trehalosa; y (d) polisorbato 20. Las formulaciones liofilizadas pueden comprender aproximadamente 10 mg a aproximadamente 40 mg de anticuerpo y polisorbato 20 a una concentración dentro del rango de aproximadamente 0.005% a

aproximadamente 0.05% en peso. Tras la reconstitución, las formulaciones liofilizadas pueden comprender de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM de tampón de histidina y aproximadamente 200 mM a aproximadamente 260 mM de sacarosa o trehalosa. Tras la reconstitución, las formulaciones liofilizadas producen una solución acuosa que tiene un pH de entre aproximadamente 6 a aproximadamente 7, tal como pH 6.0 o 6.5.

Tras la reconstitución, la formulación liofilizada ejemplar puede comprender: (a) cualquier anticuerpo aquí descrito, que está presente en una concentración de aproximadamente 40 mg/mL; (b) tampón de histidina presente en una concentración de aproximadamente 20 mM; (c) sacarosa presente en una concentración de aproximadamente 220 mM; (d) polisorbato 20 presente en una concentración de aproximadamente 0.2 g/L; y (e) un pH de aproximadamente 6.0. Tal formulación liofilizada puede comprender aproximadamente 200 mg de anticuerpo, aproximadamente 15.5 mg de histidina, aproximadamente 376 mg de sacarosa y aproximadamente 1 mg de polisorbato 20.

Tras la reconstitución, otra formulación liofilizada ejemplar puede comprender: (a) cualquier anticuerpo aquí descrito, que está presente en una concentración de aproximadamente 40 mg/mL; (b) tampón de histidina presente en una concentración de aproximadamente 20 mM; (c) dihidrato de trehalosa presente en una concentración de aproximadamente 220 mM; (d) polisorbato 20 presente en una concentración de aproximadamente 0.2 g/L; y (e) un pH de

aproximadamente 6.5. Tal formulación liofilizada puede comprender aproximadamente 200 mg de anticuerpo, aproximadamente 15.5 mg de histidina, aproximadamente 416 mg de dihidrato de trehalosa y aproximadamente 1 mg de polisorbato 20.

La invención proporciona además el uso de cualquiera de los anticuerpos mencionados en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio caracterizado por la infiltración de células que expresan MCAM en un sitio de inflamación en el cuerpo. Tal trastorno inflamatorio puede ser un trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC) caracterizado por la infiltración de células que expresan MCAM en el SNC.

La invención proporciona además el uso de cualquiera de los anticuerpos mencionados en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, dermatitis alérgica de contacto, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, sarcoidosis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn o cáncer (por ejemplo, tumores sólidos o hematológicos), tal como melanoma.

La invención proporciona además un método para el tratamiento de un trastorno inflamatorio caracterizado por la infiltración de células que expresan MCAM a un sitio de inflamación, el método comprende administrar a un sujeto mamífero necesidad del mismo una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos mencionados. En algunos métodos, la enfermedad es esclerosis múltiple, enfermedad de

Parkinson, dermatitis alérgica de contacto, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, sarcoidosis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn o cáncer (por ejemplo, tumores sólidos o hematológicos), tal como melanoma. En algunos métodos, las células que expresan MCAM son células TH17. En otras modalidades, el sujeto mamífero es un ser humano. En algunos de los métodos, el anticuerpo inhibe la unión de MCAM a una proteína que comprende una cadena de laminina α -4. En algunos de los métodos, el sujeto mamífero es un ser humano. En algunos de los métodos, las células que expresan MCAM son células TH17.

La invención proporciona además un péptido aislado que comprende un epítipo para unirse a un anticuerpo monoclonal anti-MCAM, en donde el péptido comprende 5-50 residuos de aminoácidos contiguos de MCAM humano (SEQ ID NO: 11) incluyendo el residuo de aminoácido 141. En algunos de estos péptidos, el péptido está ligado a un polipéptido portador. En algunos de estos péptidos, el péptido está combinado con un adyuvante.

La invención proporciona además un método para generar un anticuerpo que inhibe la unión de MCAM humano a una cadena de laminina α -4, que comprende:

(a) inmunizar a un sujeto con un péptido descrito anteriormente;

(b) aislar las células de B del sujeto, en donde las células B secretan anticuerpos;

(c) detectar los anticuerpos para identificar un anticuerpo que inhibe la unión de MCAM humano a una cadena de

laminina α -4. En algunos de los métodos, el método comprende además:

(d) fusionar las células B con células inmortalizadas en cultivo para formar células de hibridoma productoras de anticuerpo monoclonal;

(e) cultivar las células de hibridoma; y,

(f) aislar los anticuerpos monoclonales del cultivo.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra la identificación de clones críticos. El valor de unión medio 2120.4.19 trazado como una función de su valor de expresión superficial medio (diamantes grises). Los umbrales de <30% de reactividad de anticuerpo monoclonal y >50% de unión de suero de ratón se aplicaron para identificar los clones (diamantes negros) que fueron negativos para unión a anticuerpo pero positivos para expresión superficial.

Figuras 2A-C. La Figura 2A es un modelo de homología de MCAM humano, representado por un diagrama de cinta. La Figura 2B ilustra una alineación parcial de secuencias de BCAM humano, MCAM humano y MCAM de ratón que indican los residuos de interés en la posición 141 (I141) y en la posición 145 (P145) de MCAM humano. La Figura 2C ilustra un diagrama de cinta que ilustra la ubicación y exposición de los residuos I141 y P145 de MCAM humana.

Figuras 3A y 3B. La Figura 3A muestra la alineación de las secuencias de variables de cadena pesada para los

siguientes: anticuerpo de rata 2120.4.19 anti-MCAM (2120.4.19.6_VH_topo_pro; SEQ ID NO:114); anticuerpo de 2120 VH1 anti-MCAM humanizado (h2120VH1; SEQ ID NO:115); anticuerpo de 2120 VH2 anti-MCAM humanizado (h2120VH2; SEQ ID NO:116); anticuerpo de 2120 VH3 anti-MCAM humanizado (h2120VH3; SEQ ID NO:117); anticuerpo de 2120 VH4 anti-MCAM humanizado (h2120VH4; SEQ ID NO:118); anticuerpo de 2120 VH5 anti-MCAM humanizado (h2120VH5; SEQ ID NO:119); y la secuencia variable humana de cadena pesada AF062133 IGHV2-26*01 utilizada como el donante de marco (AF062133_VH; SEQ ID NO:108). Se utiliza numeración de Kabat y las regiones hipervariables (HVRs) injertadas de anticuerpo de rata 2120.4.19.6 al marco variable de cadena pesada AF062133 IGHV2-26*01 variable están en el recuadro. Las mutaciones S30T, I37V, L48I y K71R combinadas con (i) mutaciones de los residuos de N/D en el recuadro en CDR-H1, *por ejemplo*, N32S (VH3); N32Q (VH4); o G33A (VH5)), proporciona un mutante de desamidación de N. Los residuos de aminoácido en negritas en las secuencias de anticuerpo humanizado difieren de los residuos correspondientes en la secuencia de anticuerpo de rata. La posición de residuos canónicos y de aminoácidos de interfaz que pueden afectar la estructura de contacto de CDR o de CDR se indican mediante un asterisco. Los residuos en donde se centraron las mutaciones debido a la presencia de sitios de N-desaminación o sitios de N-glicosilación se muestran en el recuadro con corchetes.

La Figura 3B muestra la alineación de las secuencias de las variables de cadena ligera para los

siguientes: anticuerpo de rata 2120.4.19.6 anti-MCAM (2120.4.19.6_VL_topo_pro; SEQ ID NO:120); anticuerpo 2120 VL1 anti-MCAM humanizado (h2120VL1 SEQ ID NO:121); anticuerpo de 2120 VL2 anti-MCAM humanizado (h2120VL2 SEQ ID NO:122);
 5 anticuerpo de 2120 VL3 anti-MCAM humanizado (h2120VL3 SEQ ID NO:123); y secuencia variable humana de cadena ligera X84343 IGKV2-26*01 utilizada como el donante de marco (X84343_VL SEQ ID NO:124). Se utiliza numeración de Kabat y las regiones hipervariables (HVRs) injertadas de anticuerpo de rata
 10 2120.4.19.6 al marco variable de cadena pesada X84343 IGKV2-26*01 variable están en el recuadro. Los residuos de aminoácido en negritas en las secuencias de anticuerpo humanizado difieren de los residuos correspondientes en la secuencia de anticuerpo de rata. La posición de residuos
 15 canónicos y de aminoácidos de interfaz que pueden afectar la estructura de contacto de CDR o de CDR se indican mediante un asterisco.

La Figura 4A muestra la alineación de las secuencias de las regiones variables maduras de cadena pesada
 20 para los siguientes: anticuerpo de rata 2120.4.19 anti-MCAM (2120.4.19.6_VH_topo_pro; SEQ ID NO:114); anticuerpo de 2120 VH1.Q1E anti-MCAM humanizado (h2120VH1.Q1E; SEQ ID NO:157); anticuerpo de 2120 VH2.Q1E anti-MCAM humanizado (h2120VH2.Q1E; SEQ ID NO:158); anticuerpo de 2120 VH3.Q1E
 25 anti-MCAM humanizado (h2120VH3.Q1E; SEQ ID NO:159); anticuerpo de 2120 VH4.Q1E anti-MCAM humanizado (h2120VH4.Q1E; SEQ ID NO:160); anticuerpo de 2120 VH5.Q1E anti-MCAM humanizado (h2120VH5.Q1E; SEQ ID NO:161); y

secuencia de variable humana de cadena pesada AF062133 IGHV2-26*01 utilizada como el donante de marco (AF062133_VH; SEQ ID NO:108). Se utiliza numeración de Kabat y las regiones hipervariables (HVRs) injertadas de anticuerpo de rata 2120.4.19.6 al marco variable de cadena pesada AF062133 IGHV2-26*01 variable están en el recuadro. La posición de sustitución de Q1E está delineada por un recuadro.

La Figura 4B muestra la alineación de las secuencias de las variables de cadena ligera para los siguientes: anticuerpo de rata 2120.4.19.6 anti-MCAM (2120.4.19.6_VL_topo_pro; SEQ ID NO:120); anticuerpo 2120 VL1 anti-MCAM humanizado (h2120VL1 SEQ ID NO:121); anticuerpo de 2120 VL2 anti-MCAM humanizado (h2120VL2 SEQ ID NO:122); anticuerpo de 2120 VL3 anti-MCAM humanizado (h2120VL3 SEQ ID NO:123); y secuencia variable humana de cadena ligera X84343 IGKV2-26*01 utilizada como el donante de marco (X84343_VL SEQ ID NO:124). Se utiliza numeración de Kabat y las regiones hipervariables (HVRs) injertadas de anticuerpo de rata 2120.4.19.6 al marco variable de cadena pesada X84343 IGKV2-26*01 variable están en el recuadro.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región madura variable de cadena ligera del clon de anticuerpo 17.

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena ligera del clon de anticuerpo 17.

La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácido de CDRL1 del clon de anticuerpo 17.

La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácido de CDRL2 del clon de anticuerpo 17.

5 La SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácido de CDRL3 del clon de anticuerpo 17.

La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región madura variable de cadena pesada del clon de anticuerpo 17.

10 La SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada del clon de anticuerpo 17.

La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácido de CDRH1 del clon de anticuerpo 17.

15 La SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácido de CDRH2 del clon de anticuerpo 17.

La SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácido de CDRH3 del clon de anticuerpo 17.

20 La SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácido de MCAM humano No. de Acceso CAA48332.

La SEQ ID NO: 12 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región madura variable de cadena ligera del clon de anticuerpo 15.

25 La SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena ligera del clon de anticuerpo 15.

La SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácido de CDRL1 del clon de anticuerpo 15.

La SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácido de CDRL2 del clon de anticuerpo 15.

La SEQ ID NO: 16 es la secuencia de aminoácido de CDRL3 del clon de anticuerpo 15.

5 La SEQ ID NO: 17 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región madura variable de cadena pesada del clon de anticuerpo 15.

La SEQ ID NO: 18 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada del clon de
10 anticuerpo 15.

La SEQ ID NO: 19 es la secuencia de aminoácido de CDRH1 del clon de anticuerpo 15.

La SEQ ID NO: 20 es la secuencia de aminoácido de CDRH2 del clon de anticuerpo 15.

15 La SEQ ID NO: 21 es la secuencia de aminoácido de CDRH3 del clon de anticuerpo 15.

La SEQ ID NO: 22 es la secuencia de aminoácido de dominio 1 de MCAM humano (residuos 19-129).

La SEQ ID NO: 23 es la secuencia de aminoácido de
20 dominio 2 de MCAM humano (residuos 139-242).

La SEQ ID NO: 24 es la secuencia de aminoácido de dominio 3 de MCAM humano (residuos 244-321).

La SEQ ID NO: 25 es la secuencia de aminoácido de dominio 4 de MCAM humano (residuos 355-424).

25 La SEQ ID NO: 26 es la secuencia de aminoácido de dominio 5 de MCAM humano (residuos 430-510).

La SEQ ID NO: 27 es la secuencia de aminoácido de un isoforme de 4 cadenas de laminina humana 411 (No. de

Acceso NP001098676).

La SEQ ID NO: 28 es la secuencia de aminoácido de un isoforme de 4 cadenas de laminina humana 411 (No. de Acceso CAA48332).

5 La SEQ ID NO: 29 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo 1174.1.3.

La SEQ ID NO: 30 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo
10 1174.1.3.

La SEQ ID NO: 31 es la secuencia de aminoácido de CDRL1 de anticuerpo 1174.1.3.

La SEQ ID NO: 32 es la secuencia de aminoácido de CDRL2 de anticuerpo 1174.1.3.

15 La SEQ ID NO: 33 es la secuencia de aminoácido de CDRL3 de anticuerpo 1174.1.3.

La SEQ ID NO: 34 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 1174.1.3.

20 La SEQ ID NO: 35 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 1174.1.3.

La SEQ ID NO: 36 es la secuencia de aminoácido de CDRH1 de anticuerpo 1174.1.3.

25 La SEQ ID NO: 37 es la secuencia de aminoácido de CDRH2 de anticuerpo 1174.1.3.

La SEQ ID NO: 38 es la secuencia de aminoácido de CDRH3 de anticuerpo 1174.1.3.

La SEQ ID NO: 39 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo 1414.1.2.

5 La SEQ ID NO: 40 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo 1414.1.2.

La SEQ ID NO: 41 es la secuencia de aminoácido de CDRL1 de anticuerpo 1414.1.2.

10 La SEQ ID NO: 42 es la secuencia de aminoácido de CDRL2 de anticuerpo 1414.1.2.

La SEQ ID NO: 43 es la secuencia de aminoácido de CDRL3 de anticuerpo 1414.1.2.

15 La SEQ ID NO: 44 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 1414.1.2.

La SEQ ID NO: 45 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 1414.1.2.

20 La SEQ ID NO: 46 es la secuencia de aminoácido de CDRH1 de anticuerpo 1414.1.2.

La SEQ ID NO: 47 es la secuencia de aminoácido de CDRH2 de anticuerpo 1414.1.2.

La SEQ ID NO: 48 es la secuencia de aminoácido de CDRH3 de anticuerpo 1414.1.2.

25 La SEQ ID NO: 49 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo 1415.1.1.

La SEQ ID NO: 50 es la secuencia de aminoácido de

la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo 1415.1.1.

La SEQ ID NO: 51 es la secuencia de aminoácido de CDRL1 de anticuerpo 1415.1.1.

5 La SEQ ID NO: 52 es la secuencia de aminoácido de CDRL2 de anticuerpo 1415.1.1.

La SEQ ID NO: 53 es la secuencia de aminoácido de CDRL3 de anticuerpo 1415.1.1.

10 La SEQ ID NO: 54 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 1415.1.1.

La SEQ ID NO: 55 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 1415.1.1.

15 La SEQ ID NO: 56 es la secuencia de aminoácido de CDRH1 de anticuerpo 1415.1.1.

La SEQ ID NO: 57 es la secuencia de aminoácido de CDRH2 de anticuerpo 1415.1.1.

20 La SEQ ID NO: 58 es la secuencia de aminoácido de CDRH3 de anticuerpo 1415.1.1.

La SEQ ID NO: 59 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo 1749.1.3.

25 La SEQ ID NO: 60 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo 1749.1.3.

La SEQ ID NO: 61 es la secuencia de aminoácido de CDRL1 de anticuerpo 1749.1.3.

La SEQ ID NO: 62 es la secuencia de aminoácido de CDRL2 de anticuerpo 1749.1.3.

La SEQ ID NO: 63 es la secuencia de aminoácido de CDRL3 de anticuerpo 1749.1.3.

5 La SEQ ID NO: 64 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 1749.1.3.

La SEQ ID NO: 65 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo
10 1749.1.3.

La SEQ ID NO: 66 es la secuencia de aminoácido de CDRH1 de anticuerpo 1749.1.3.

La SEQ ID NO: 67 es la secuencia de aminoácido de CDRH2 de anticuerpo 1749.1.3.

15 La SEQ ID NO: 68 es la secuencia de aminoácido de CDRH3 de anticuerpo 1749.1.3.

La SEQ ID NO: 69 es la secuencia de ácido nucleico que codifica una región madura variable de cadena ligera de anticuerpo 2120.4.19.

20 La SEQ ID NO: 70 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo 2120.4.19 establecida en la SEQ ID NO:69.

La SEQ ID NO: 71 es la secuencia de aminoácido de una región madura variable de cadena ligera de anticuerpo
25 2120.4.19.

La SEQ ID NO: 72 es la secuencia de aminoácido de una región madura variable de cadena ligera de anticuerpo 2120.4.19.

La SEQ ID NO: 73 es la secuencia de aminoácido de CDRL1 de anticuerpo 2120.4.19.

La SEQ ID NO: 74 es la secuencia de aminoácido de CDRL2 de anticuerpo 2120.4.19.

5 La SEQ ID NO: 75 es la secuencia de aminoácido de CDRL3 de anticuerpo 2120.4.19.

La SEQ ID NO: 76 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 2120.4.19.

10 La SEQ ID NO: 77 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 2120.4.19.

La SEQ ID NO: 78 es la secuencia de aminoácido de CDRH1 de anticuerpo 2120.4.19.

15 La SEQ ID NO: 79 es la secuencia de aminoácido de CDRH2 de anticuerpo 2120.4.19.

La SEQ ID NO: 80 es la secuencia de aminoácido de CDRH3 de anticuerpo 2120.4.19.

20 La SEQ ID NO: 81 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una región madura variable de cadena ligera de anticuerpo 2107.4.10.

La SEQ ID NO: 82 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo 2107.4.10 establecida en la SEQ ID NO:81.

25 La SEQ ID NO: 83 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una región madura variable de cadena ligera de anticuerpo 2107.4.10.

La SEQ ID NO: 84 es la secuencia de aminoácido de

la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo 2107.4.10 establecida en la SEQ ID NO:83.

La SEQ ID NO: 85 es la secuencia de aminoácido de CDRL1 de anticuerpo 2107.4.10.

5 La SEQ ID NO: 86 es la secuencia de aminoácido de CDRL2 de anticuerpo 2107.4.10.

La SEQ ID NO: 87 es la secuencia de aminoácido de CDRL3 de anticuerpo 2107.4.10.

10 La SEQ ID NO: 88 es la secuencia de ácido nucleico que codifica la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 2107.4.10.

La SEQ ID NO: 89 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 2107.4.10.

15 La SEQ ID NO: 90 es la secuencia de aminoácido de CDRH1 de anticuerpo 2107.4.10.

La SEQ ID NO: 91 es la secuencia de aminoácido de CDRH2 de anticuerpo 2107.4.10.

20 La SEQ ID NO: 92 es la secuencia de aminoácido de CDRH3 de anticuerpo 2107.4.10.

La SEQ ID NO: 93 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 1749.1.3.

25 La SEQ ID NO: 94 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado 1749 versión 1 (VH1).

La SEQ ID NO: 95 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo

humanizado 1749 versión 2 (VH2).

La SEQ ID NO: 96 es la secuencia de aminoácido de la región variable de cadena pesada del donante de marco U96282_VH.

5 La SEQ ID NO: 97 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo 1749.1.3.

La SEQ ID NO: 98 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado 1749 versión 1 (VL1).

La SEQ ID NO: 99 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado 1749 versión 2 (VL2).

15 La SEQ ID NO: 100 es la secuencia de aminoácido de la región variable de cadena ligera del donante de marco X02990_VL.

La SEQ ID NO: 101 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 2107.4.10.18.

20 La SEQ ID NO: 102 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado 2107 versión 1 (VH1).

La SEQ ID NO: 103 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado 2107 versión 2 (VH2).

25 La SEQ ID NO: 104 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado 2107 versión 3 (VH3).

La SEQ ID NO: 105 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado 2107 versión 4A (VH4A).

5 La SEQ ID NO: 106 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado 2107 versión 5A (VH5A).

La SEQ ID NO: 107 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado 2107 versión 6 (VH6).

10 La SEQ ID NO: 108 es la secuencia de aminoácido de la región variable de cadena pesada del donante de marco AF062133_VH.

La SEQ ID NO: 109 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo 15 2107.4.10.18.

La SEQ ID NO: 110 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado 2107 versión 1 (VL1).

20 La SEQ ID NO: 111 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado 2107 versión 2 (VL2).

La SEQ ID NO: 112 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado 2107 versión 3 (VL3).

25 La SEQ ID NO: 113 es la secuencia de aminoácido de la región variable de cadena ligera del donante de marco U86803.

La SEQ ID NO: 114 es la secuencia de aminoácido de

la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo
2120.4.19.6.

La SEQ ID NO: 115 es la secuencia de aminoácido de
la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo
5 humanizado 2120 versión 1 (VH1).

La SEQ ID NO: 116 es la secuencia de aminoácido de
la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo
humanizado 2120 versión 2 (VH2).

La SEQ ID NO: 117 es la secuencia de aminoácido de
10 la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo
humanizado 2120 versión 3 (VH3).

La SEQ ID NO: 118 es la secuencia de aminoácido de
la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo
humanizado 2120 versión 4 (VH4).

15 La SEQ ID NO: 119 es la secuencia de aminoácido de
la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo
humanizado 2120 versión 5 (VH5).

La SEQ ID NO: 120 es la secuencia de aminoácido de
la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo
20 2120.4.19.6.

La SEQ ID NO: 121 es la secuencia de aminoácido de
la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo
humanizado 2120 versión 1 (VL1).

La SEQ ID NO: 122 es la secuencia de aminoácido de
25 la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo
humanizado 2120 versión 2 (VL2).

La SEQ ID NO: 123 es la secuencia de aminoácido de
la región madura variable de cadena ligera de anticuerpo

humanizado 2120 versión 3 (VL3).

La SEQ ID NO: 124 es la secuencia de aminoácido de la región variable de cadena ligera del donante de marco X84343_VL.

5 La SEQ ID NO: 125 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena pesada de marco.

La SEQ ID NO: 126 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena pesada de marco.

10 La SEQ ID NO: 127 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena pesada de marco.

La SEQ ID NO: 128 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena pesada/cadena ligera de marco.

15 La SEQ ID NO: 129 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena ligera de marco.

La SEQ ID NO: 130 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena ligera de marco.

La SEQ ID NO: 131 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena ligera de marco.

20 La SEQ ID NO: 132 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena ligera de marco.

La SEQ ID NO: 133 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena pesada de marco.

25 La SEQ ID NO: 134 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena pesada de marco.

La SEQ ID NO: 135 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena pesada de marco.

La SEQ ID NO: 136 es la secuencia de aminoácido de

una región humanizada de cadena pesada de marco.

La SEQ ID NO: 137 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena pesada de marco.

La SEQ ID NO: 138 es la secuencia de aminoácido de
5 una región humanizada de cadena pesada de marco.

La SEQ ID NO: 139 es la secuencia de aminoácido de CDRH1 de anticuerpo humanizado 2120 versión 3 (VH3).

La SEQ ID NO: 140 es la secuencia de aminoácido de CDRH1 de anticuerpo humanizado 2120 versión 4 (VH4).

10 La SEQ ID NO: 141 es la secuencia de aminoácido de CDRH1 de anticuerpo humanizado 2120 versión 5 (VH5).

La SEQ ID NO: 142 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena ligera de marco.

La SEQ ID NO: 143 es la secuencia de aminoácido de
15 una región humanizada de cadena ligera de marco.

La SEQ ID NO: 144 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena ligera de marco.

La SEQ ID NO: 145 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena ligera de marco.

20 La SEQ ID NO: 146 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena ligera de marco.

La SEQ ID NO: 147 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena ligera de marco.

La SEQ ID NO: 148 es la secuencia de aminoácido de
25 una región humanizada de cadena ligera de marco.

La SEQ ID NO: 149 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena ligera de marco.

La SEQ ID NO: 150 es la secuencia de aminoácido de

una región humanizada de cadena ligera de marco.

La SEQ ID NO: 151 es la secuencia de aminoácido de CDRH1 de anticuerpo humanizado 2107 versión 1 (VH1).

La SEQ ID NO: 152 es la secuencia de aminoácido de CDRH1 de anticuerpo humanizado 2107 versión 4 (VH4).

La SEQ ID NO: 153 es la secuencia de aminoácido de CDRH1 de anticuerpo humanizado 2120 versión 1-5 (VH1-VH5).

La SEQ ID NO: 154 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena ligera de marco.

La SEQ ID NO: 155 es la secuencia de aminoácido de una región humanizada de cadena pesada de marco.

La SEQ ID NO: 156 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 2120.4.19.Q1E, en donde la posición 1 (numeración de Kabat) está ocupada por E.

La SEQ ID NO: 157 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 2120 versión 1 Q1E (VH1.Q1E), en donde la posición 1 (numeración de Kabat) está ocupada por E.

La SEQ ID NO: 158 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 2120 versión 2 Q1E (VH2.Q1E), en donde la posición 1 (numeración de Kabat) está ocupada por E.

La SEQ ID NO: 159 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 2120 versión 3 Q1E (VH3.Q1E), en donde la posición 1 (numeración de Kabat) está ocupada por E.

La SEQ ID NO: 160 es la secuencia de aminoácido de

la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 2120 versión 4 Q1E (VH4.Q1E), en donde la posición 1 (numeración de Kabat) está ocupada por E.

5 La SEQ ID NO: 161 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo 2120 versión 5 Q1E (VH5.Q1E), en donde la posición 1 (numeración de Kabat) está ocupada por E.

10 La SEQ ID NO: 162 es la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal ejemplar que se puede fusionar a una región variable madura de cadena pesada o a una región variable madura de cadena ligera.

La SEQ ID NO: 163 es la secuencia de aminoácidos del péptido señal ejemplar codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 162.

15 La SEQ ID NO: 164 es la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal ejemplar que se puede fusionar a una región variable madura de cadena pesada o a una región variable madura de cadena ligera.

20 La SEQ ID NO: 165 es la secuencia de aminoácidos del péptido señal ejemplar codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 164.

25 La SEQ ID NO: 166 es la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal ejemplar que se puede fusionar a una región variable madura de cadena pesada o a una región variable madura de cadena ligera.

La SEQ ID NO: 167 es la secuencia de aminoácidos del péptido señal ejemplar codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 166.

La SEQ ID NO: 168 es la secuencia de aminoácido de una región constante de cadena ligera de 2120 humanizado, con Arginina en el terminal N.

5 La SEQ ID NO: 169 es la secuencia de aminoácido de una región constante de cadena ligera de 2120 humanizado, sin Arginina en el terminal N.

La SEQ ID NO: 170 es la secuencia de aminoácido de una región constante de cadena pesada de 2120 humanizado.

10 La SEQ ID NO: 171 es la secuencia de aminoácido de una región constante de cadena pesada de una versión BIP de alotipo de G1m3.

La SEQ ID NO: 172 es la secuencia de aminoácido de una región constante de cadena pesada de una versión BIP de alotipo de G1m3.

15 La SEQ ID NO: 173 es la secuencia de aminoácido de una región madura de cadena ligera de anticuerpo humanizado 2120 versión 3 (VL3 + región constante de cadena ligera).

20 La SEQ ID NO: 174 es la secuencia de aminoácido de una región madura de cadena ligera de anticuerpo humanizado 2120 versión 5 (VH5 + región constante de cadena pesada de versión BIP de alotipo G1m3).

25 La SEQ ID NO: 175 es la secuencia de aminoácido de una región madura de cadena ligera de anticuerpo humanizado 2120 versión 5 (VH5 + región constante de cadena pesada de versión BIP de alotipo G1m3).

La SEQ ID NO: 176 es la secuencia de aminoácido de una región madura de cadena ligera de anticuerpo humanizado 2120 versión 5 Q1E (VH5.Q1R + región constante de cadena

pesada de versión BIP de alotipo G1m3).

La SEQ ID NO: 177 es la secuencia de aminoácido de una región madura de cadena ligera de anticuerpo humanizado 2120 versión 5 Q1E (VH5.Q1R + región constante de cadena pesada de versión BIP de alotipo G1m3).

La SEQ ID NO: 178 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado 2107 versión 4B (VH4B).

La SEQ ID NO: 179 es la secuencia de aminoácido de la región madura variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado 2107 versión 5B (VH5B).

DEFINICIONES

Los anticuerpos monoclonales normalmente se proporcionan en forma aislada. Esto significa que un anticuerpo suele ser de por lo menos 50% p/p puro de proteínas y otras macromoléculas derivadas de su producción o purificación, pero no excluye la posibilidad de que el anticuerpo monoclonal se combine con un exceso de portador(es) farmacéuticamente aceptable(s) u otros vehículos destinados a facilitar su uso. Algunas veces los anticuerpos monoclonales son por lo menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% p/p puros de proteínas y otras macromoléculas de su producción o purificación.

La unión específica de un anticuerpo monoclonal a su antígeno objetivo significa una afinidad de por lo menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , o 10^{10} M⁻¹. La unión específica es perceptible mayor en magnitud y distinguible desde una unión

no específica que ocurre al menos a un objetivo no relacionado. La unión específica puede ser el resultado de la formación de vínculos entre grupos funcionales determinados o un ajuste espacial particular (por ejemplo, tipo de llave y
5 cerradura) mientras que la unión no específica es generalmente el resultado de fuerzas de van der Waals. La unión específica sin embargo no necesariamente implica que un anticuerpo monoclonal se una a uno y sólo un objetivo.

La unidad estructural básica de anticuerpo es un
10 tetrámero de subunidades. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena "ligera" (alrededor de 25 kDa) y una "pesada" (alrededor de 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de alrededor de 100 a 110
15 o más secuencias de aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Esta región variable se expresa inicialmente vinculado a una señalización péptida escindible. La región variable sin la señalización péptida señal se refiere a veces como una región variable madura.
20 Así, por ejemplo, una región variable de cadena ligera madura, significa una región variable de cadena ligera sin la señalización péptida de la cadena ligera. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable para la función efectora.

25 Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon y definen el isotipo de anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las

cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes se unen por una región "J" de alrededor de 12 o más secuencias de aminoácidos, la cadena pesada también incluye una región "D" de alrededor de 10 o más secuencias de aminoácidos. (Ver generalmente, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2da ed. Raven, Press N.Y., 1989), Cap. 7) incorporado por referencia en su totalidad para todos los efectos).

Las regiones variables maduras de cada par de cadenas pesadas/ligeras forman el sitio de unión de anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de enlace. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son los mismos. Todas las cadenas presentan la misma estructura general del marco de las regiones (FR) relativamente conservadas enlazadas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de la complementariedad (en lo sucesivo referido como "CDR"). Las CDR de las dos cadenas de cada par se alinean por marco de las regiones, que permiten el enlace a un epítipo específico. Desde la terminal N a la terminal C, ambas cadenas ligera y pesada comprenden los dominios FR1 CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat *"Sequences of Proteins of Immunological Interest"* National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991; Chothia, et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989). Kabat proporciona también una convención de numeración utilizada ampliamente (numeración de

Kabat) en la que los residuos correspondientes entre diferentes cadenas pesadas o entre diferentes cadenas ligeras se asignan el mismo número (por ejemplo, H83 significa posición 83 de la numeración de Kabat en la región madura variable de cadena pesada; igualmente la posición L36 significa la posición 36 de la numeración de Kabat en la región madura variable de cadena ligera). La numeración de Kabat se utiliza en todo el documento al referirse a las posiciones en la región variable de un anticuerpo a menos que se indique explícitamente lo contrario.

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos intactos y sus fragmentos de unión a antígeno. Por lo general, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del que se derivaron para la unión específica al objetivo incluyendo cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras Fab, Fab, $F(ab)_2$, $F(ab)_c$, diacuerpos, Dabs, nanocuerpos y Fv. Los fragmentos se pueden producir por técnicas de ADN recombinante, o por separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

El término "anticuerpo" también incluye un anticuerpo humanizado, y/o un anticuerpo quimérico, y/o un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo artificial híbrido con dos pares de cadenas pesadas/ligeras y dos sitios de unión diferentes (ver, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148:1547-53 (1992)). En algunos anticuerpos biespecíficos, los dos pares de cadena pesada o ligera pueden incluir un par

de cadena pesada humanizada/cadena ligera, y un par de cadena pesada/cadena ligera específico para un epítipo diferente.

En algunos anticuerpos biespecíficos, un par de cadena pesada/cadena ligera es un anticuerpo humanizado como se describe a mayor detalle más adelante y el par de cadena ligera pesada es de un anticuerpo que se une a un receptor expresado en la barrera hematoencefálica, tal como un receptor de insulina, un receptor de factor de crecimiento insulínico (IGF), un receptor de leptina o un receptor de lipoproteína, o un receptor de transferrina (Friden et al., *PNAS* 88:4771-4775, 1991; Friden et al., *Science* 259:373-377, 1993). Tal anticuerpo biespecífico puede transferirse a través de la barrera hematoencefálica por transcitosis mediada por receptor. La absorción cerebral de anticuerpo biespecífico puede ser mejorada diseñando el anticuerpo biespecífico para reducir su afinidad al receptor de la barrera hematoencefálica. La afinidad reducida para el receptor dio lugar a una distribución más amplia en el cerebro (ver, por ejemplo, Atwal. et al. *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra43, 2011; Yu et al. *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra44, 2011).

Los anticuerpos biespecíficos ejemplares también pueden ser (1) un anticuerpo de dominio dual variable (DVD-Ig), en donde cada cadena ligera y cada cadena pesada contiene dos dominios variables en tándem a través de un enlace peptídico corto (Wu et al., *Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule*, En: *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) un Tandab, que es una fusión de dos

diacuerpos que resultan en un anticuerpo biespecífico tetraivalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos objetivo; (3) un cuerpo flexible, que es una combinación de scFvs con un diacuerpo que resulta en una molécula multivalente; (4) una de las llamadas moléculas de anclaje y bloqueo ("*dock and lock*"), basada en el dominio de "dimerización y anclaje" en la Proteína Cinasa A, que, cuando se aplica a Fabs, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste de dos fragmentos de Fab idénticos ligados a un fragmento de Fab diferente; (5) una de las llamadas moléculas Escorpión, que comprende, por ejemplo, dos scFvs fusionados a ambos terminales de una región de Fc humana. Ejemplos de plataformas útiles para la preparación de anticuerpos biespecíficos incluyen pero no están limitados a BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab y Mab2 (F-star) , IgG1 diseñado con Fc (Xencor) o DuoBody (basado en el intercambio de rama de Fab, Genmab).

El término "epítopo" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une un anticuerpo. Un epítopo puede formarse a partir de los aminoácidos contiguos o no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una o más proteínas. Los epítopos formados a partir de los aminoácidos contiguos se conservan normalmente en exposición a solventes la desnaturalización, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario normalmente se pierden en el tratamiento con disolventes que desnaturalizan. Un epítopo normalmente incluye por lo menos 3 y más generalmente, por lo menos 5 o 8-10 aminoácidos en una conformación espacial

única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítomos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nucleares 2-dimensional. Ver, *por ejemplo., Epitope Mapping Protocols*, en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

Un anticuerpo "antagonista" u otro agente de unión es el que inhibe una actividad biológica del antígeno al que se une. Tales anticuerpos pueden inhibir total o sustancialmente la actividad biológica del antígeno.

Los términos "actividad biológica" y "biológicamente activo" con respecto de MCAM hacen referencia a su capacidad para unir específicamente su ligando (una cadena de laminina $\alpha 4$, *por ejemplo*, la cadena $\alpha 4$ de laminina 411) y/o para facilitar la infiltración de células que expresan MCAM, *por ejemplo*, células TH17, en el SNC.

"Inhibir" significa que un agente disminuye la actividad biológica de al menos un objetivo, *por ejemplo* MCAM. Dicho inhibidor inhibe la actividad de al menos un objetivo en por lo menos aproximadamente 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 95% o por lo menos 100%.

Un "sujeto" incluye un ser humano u otro sujeto mamífero que recibe tratamiento profiláctico o terapéutico.

Para efectos de la clasificación de sustituciones de aminoácidos como conservadoras o no conservadoras, los aminoácidos se agrupan como sigue: Grupo I (cadenas laterales

hidrofóbicas): met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutrales): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, su, lys, arg; Grupo V (residuos
5 que influyen en la orientación de cadena): gly, pro; y el Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservadoras implican sustituciones entre los aminoácidos de la misma clase. Las sustituciones no conservadoras constituyen el intercambio de un miembro de una
10 de estas clases por un miembro de otra.

La identidad porcentual de secuencias se determina con secuencias de anticuerpo alineadas al máximo por la convención de numeración de Kabat. Después de la alineación, si una región de anticuerpo sujeto (por ejemplo, toda la
15 región variable de una cadena pesada o ligera) se está comparando con la misma región de un anticuerpo de referencia, la identidad de secuencia de porcentaje entre las regiones de anticuerpo sujeto y de referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido en las regiones
20 de anticuerpo sujeto y el de referencia divididas por el número total de puestos alineados de las dos regiones, con espacios no contados, multiplicados por 100 para convertir a porcentaje.

Las composiciones o métodos "que comprenden" uno o
25 más elementos citados pueden incluir otros elementos no citados específicamente. Por ejemplo, una composición que comprende anticuerpos puede contener el anticuerpo sólo o en combinación con otros ingredientes.

La designación de un rango de valores incluye todos los enteros dentro de o que definen el rango y todos los subrangos definidos por enteros dentro del rango.

A menos que lo contrario sea evidente del contexto,
5 el término "aproximadamente" abarca valores dentro de un margen de error de medición (SEM) estándar de un valor declarado.

Relevancia estadística significa $p \leq 0.05$.

10 **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

I. GENERAL

Los anticuerpos con la propiedad útil de inhibir la unión de MCAM a la cadena de laminina $\alpha 4$ 411 se divulgan en
15 WO/2012/170071 y PCT/US2013/058773. La presente solicitud, entre otras cosas (a) proporciona nuevas formas humanizadas de anticuerpo 2120.4.19, (b) mapea el epítipo al que este anticuerpo se une, (c) proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítipo, y (d) proporciona una nueva formulación de los
20 anticuerpos divulgados.

Los términos "2120.4.19", "m2120" anticuerpo de "ratón 2120" se refieren a un clon de anticuerpo monoclonal derivado de roedores con una cadena pesada madura variable correspondiente a la SEQ ID NO: 114 y una cadena ligera
25 madura variable correspondiente a la SEQ ID NO: 120. "2120 humanizado" o "hu2120" se refieren a variantes humanizadas del clon 2120.4.19.

II. MOLÉCULAS OBJETIVO

El MCAM silvestre natural humano (melanoma de la molécula de adhesión celular, también conocido como CD146 y MUC18) es una proteína de 646 aminoácidos que tiene la

5 siguiente secuencia de aminoácidos:

MGLPRLVCAFLLAACCCCPRVAGVPGEAEQPAPELVEVEVGSTALLKCGLS
 QSQGNLSHVDWFSVHKEKRTLIFRVRQGQGQSEPGEYEQRLSLQDRGATLALTQVTPQDER
 IFLCQGKRPRSQEYRIQLRVYKAPEEPNIQVNPLGIPVNSKEPEEVATCVGRNGYPIPVQVI
 WYKNGRPLKEEKNRVHIQSSQTVESSGLYTLQSILKAQLVKEDKDAQFYCELNYRLPSGNH
 10 MKESREVTVPVFYPTKQVWLEVEPVGMLKEGDRVEIRCLADGNPPPHFSISKQNPSTREAE
 EETTNDNGVLVLEPARKEHSGRYECQAWNLDTMISLLSEPQELLVNYVSDVRVSPAAPERQ
 EGSSLTLTCEAESSQDLEFQWLREETDQVLERGPVLQLHDLKREAGGGYRCVASVPSIPGL
 NRTQLVKLAIFGPPWMAFKERKVVVKENMVLNLSCEASGHPRTISWNVNGTASEQDQDPQ
 RVLSTLNVLVTPELLETTGVECTASNDLGKNTSILFLELVNLTTLTPDSNTTTGLSTSTASP
 15 HTRANSTSTERKLPEPESRGVVIVAVIVCILVLAVLGAVLYFLYKKGKLPCRRSGKQEITL
 PPSRKTELVEVKSDKLPEEMGLLQGSSGDKRAPGDQGEKYIDLRH (SEQ ID
 NO:11).

(Base de datos GenBank bajo número de acceso AAA20922.1 (CAA48332)). El MCAM es una glicoproteína de

20 superficie celular que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas involucradas en la adhesión celular y en la cohesión de la monocapa endotelial en uniones intercelulares en el tejido vascular. También promueve la progresión del tumor de muchos cánceres, tales como tumores sólidos,

25 incluyendo cáncer de melanoma y próstata. Es conocida por interactuar de una manera homotípica/homofílica y también puede unirse a otros ligandos. El MCAM humano incluye cinco dominios de la inmunoglobulina (1: residuos de aminoácidos

19-129; 2: residuos de aminoácidos 139-242; 3: residuos de aminoácidos 244-321; 4: residuos de aminoácidos 335-424; y 5: residuos de aminoácidos 430-510), mostrados como SEQ ID NOS: 22-26.

5 A menos que lo contrario sea evidente del contexto, la referencia a MCAM o sus fragmentos incluye el las secuencias de aminoácidos silvestres humanos naturales indicadas anteriormente, y sus variantes alélicas humanas.

10 Laminina $\alpha 4$ se refiere a una de las cadenas polipeptídicas encontradas en las moléculas de laminina, que se expresan en la lámina basal (de la membrana basal), una fundación de la red de proteínas para la mayoría de las células y órganos. Se sabe que las lamininas se unen a las membranas celulares a través de moléculas de la membrana
15 plasmática y contribuyen a la fijación celular. La cadena de laminina $\alpha 4$ normalmente forma un complejo con una cadena de laminina β y una cadena de laminina γ . La cadena de laminina $\alpha 4$ se encuentra en numerosas moléculas de laminina incluyendo laminina 411 (laminina 8 o $\alpha 4\beta 1\gamma 1$); laminina 421 (laminina 9
20 o $\alpha 4\beta 2\gamma 1$), y laminina 423 (laminina 14 o $\alpha 4\beta 2\gamma 3$). Existen dos isoformas principales de la cadena de laminina $\alpha 4$ humana: Nos. de acceso a GenBank NP001098676 y NP001098677 (SEQ ID NOS: 27 y 28, respectivamente). "Laminina 411" se refiere a un complejo de polipéptido trímero formado por tres cadenas o
25 subunidades polipeptídicas: una cadena $\alpha 4$, una cadena $\beta 1$ y una cadena $\gamma 1$.

 El antagonista contra MCAM incluye anticuerpos, proteínas de fusión de receptores o ligandos a una región

constante de IgG de otras moléculas de unión biológica y pequeñas moléculas. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Los anticuerpos pueden ser no humanos, tales como ratón o rata, primates no humanos o humanos. Los anticuerpos pueden ser quiméricos, chapeado, humanizados, primatizados y similares.

Un antagonista de MCAM se refiere a un antagonista que inhibe total o parcialmente la capacidad de MCAM (i) para unirse específicamente su ligando: una cadena de laminina $\alpha 4$, *por ejemplo*, la cadena $\alpha 4$ de laminina 411; o (ii) para facilitar que una célula que expresa MCAM, *por ejemplo*, una célula TH17, se infiltre en o migre al tejido del sujeto. Los antagonistas de MCAM incluyen anticuerpos u otros antagonistas que se unen a MCAM o a ligando de laminina alfa 4.

III. ANTICUERPOS

A. Anticuerpo 2120.4.19 y formas quiméricas, revestidas y humanizadas

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo genéticamente modificado en el cual los CDR de un anticuerpo no humano "donante" (es decir, 2120.4.19) se injertan en secuencias de anticuerpo humano "aceptante" (véase, *por ejemplo*, US 5,530,101 y 5,585,089; Winter, US 5,225,539, Carter, US 6,407,213, Adair, US 5,859,205 6,881,557, Foote, US 6,881,557). Las secuencias de anticuerpo aceptador pueden ser, *por ejemplo*, una secuencia de anticuerpo humano maduro, un compuesto de dichas secuencias, una secuencia de consenso

de secuencias de anticuerpos humanos o una secuencia de la
región de línea germinal. Las secuencias de anticuerpo humano
aceptante pueden opcionalmente seleccionarse entre las muchas
secuencias de anticuerpo humano para proporcionar un alto
5 grado en la secuencia de identidad (p. ej., 65-85% de
identidad) entre los marcos de la secuencia de la región
variable de un aceptor humano y los marcos correspondiente a
la región variable de una cadena de anticuerpos del donante.
Por lo tanto, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que
10 tiene algunos o todos de los CDR entera o substancialmente de
un anticuerpo de donantes y las secuencias marco región
variable y regiones constantes, si están presentes, entera o
substancialmente de las secuencias de anticuerpo humano.
Asimismo, una cadena pesada humanizada tiene al menos uno,
15 dos y generalmente los tres CDR entera o substancialmente de
una cadena pesada de anticuerpo donante y una secuencia de
marco de la región variable de la cadena pesada y la región
constante de cadena pesada, si está presente,
substancialmente el marco de la región variable de la cadena
20 pesada humana y la región constante de las secuencias.
Asimismo una cadena ligera humanizada tiene al menos uno, dos
y generalmente todos tres CDRs enteramente o substancialmente
de una cadena ligera de anticuerpo donante y una secuencia de
marco de región variable de cadena ligera y la región
25 constante de cadenas ligeras, si está presente,
substancialmente de marco de región variable de cadena ligera
de la humana y la región constante de las secuencias. Aparte
de nanocuerpos y dAbs, un anticuerpo humanizado comprende una

cadena pesada humanizada y una cadena ligera humanizada. Un CDR en un anticuerpo humanizado es substancialmente de un CDR correspondiente en un anticuerpo no humano cuando al menos el 85%, 90%, 95% o 100% de los residuos correspondientes (según lo definido por Kabat) son idénticos entre los CDR respectivos, excepto que CDRH1 puede tener hasta dos sustituciones y CHDRH2 puede tener sustituciones en las posiciones H60-65. El marco de la región variable de secuencias de una cadena de anticuerpos o la región constante de cadena de un anticuerpo es sustancialmente del marco de la secuencia una región variable humana o una región constante humana respectivamente cuando menos 85%, 90%, 95% o 100% de los residuos correspondientes definidos por Kabat son idénticos.

Aunque los anticuerpos humanizados a menudo incorporan los seis CDR (preferiblemente como lo define Kabat) de un anticuerpo de ratón, también pueden hacerse con menos de los CDR (p. ej, al menos, 3, 4 o 5 CDRs) de un anticuerpo de ratón (*por ejemplo, Pascalis et al, J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos et al., *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., *Journal of Immunology*, 164:1432-1441, 2000).

En algunos anticuerpos sólo parte de los CDr, a saber, el subconjunto de residuos CDR requeridos para la unión, denominados SDR, son necesarios para conservar la unión de un anticuerpo humanizado. Los residuos CDR que no están en contacto con el antígeno en los SDR pueden

identificarse partiendo de estudios anteriores (por ejemplo, los residuos H60-H65 en CDR H2 a menudo no son necesarios), de las regiones de los CDR de Kabat que están fuera de los bucles hipervariables de Chothia(Chothia, J. Mol. Biol. 196:901, 1987), por modelado molecular y/empírico, o como se describe en Gonzales et al., Mol. Immunol. 41: 863, 2004. En dichos anticuerpos humanizados en las posiciones en las que uno o más residuos de CDR de donantes está ausente o donde todo el donante de CDR se omite, el aminoácido que ocupa la posición puede ser un aminoácido ocupando la posición correspondiente (numerando por Kabat) en la secuencia de anticuerpo del aceptador. El número de tales sustituciones del aceptador para aminoácidos donante del en los CDR para incluir refleja un equilibrio de las consideraciones de competencia. Tales sustituciones son potencialmente beneficiosas en la disminución del número de aminoácidos de ratón en un anticuerpo humanizado y en consecuencia la disminución potencial de inmunogenicidad. Sin embargo, las sustituciones también pueden causar cambios de afinidad, y preferiblemente se evitan reducciones significativas en la afinidad. Las posiciones de sustitución dentro de los CDR y aminoácidos para sustituir también pueden seleccionarse empíricamente.

El anticuerpo de rata 2120.4.19 contra MCAM fue divulgado en PCT/US2013/058773 y se define en este documento por las SEQ ID Nos: 69-80. Las formas quiméricas, revestidas y humanizadas de anticuerpo 2120.4.19 también fueron divulgadas en la solicitud '773. Las formas humanizadas

divulgadas se definen aquí como SEQ ID NOs: 115-119, 121-123, 139-141 y 153. Las formas divulgadas que incluyen cualquier permutación de una cadena pesada humanizada y una cadena ligera humanizada representadas por estas SEQ ID NOs. pueden ser utilizadas en algunos aspectos de la presente invención, tales como composiciones farmacéuticas y formulaciones.

La presente solicitud proporciona formas adicionales humanizadas de anticuerpo 2120.4.19 en las que la glutamina es sustituida a ácido glutámico en la posición 1 (numeración de Kabat) de la región variable de cadena pesada (es decir, Q1E). La sustitución de Q1E en la región variable de cadena pesada es una sustitución conservadora que no se anticipa que produzca un efecto sustancial en las características de unión de anticuerpo, pero que puede mejorar la estabilidad de anticuerpo.

A menos que lo contrario sea evidente del contexto, la siguiente descripción incluye los anticuerpos humanizados divulgados en PCT/US2013/058773 y las variantes de Q1E aquí divulgadas.

La invención proporciona anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende Kabat CDR1 de SEQ ID NO: 78: GFSLTSNGVS; Kabat CDR2 de SEQ ID NO:79: AISSGGTTYNSAFKS; y Kabat CDR3 de SEQ ID NO:80: RYGYGWYFDF. Algunos anticuerpos comprenden una región variable de cadena ligera que comprende Kabat CDR1 de SEQ ID NO: 73: KASQNIYNSLA; Kabat CDR2 de SEQ ID NO:74: NANSLQT; y Kabat CDR3 de SEQ ID NO:75: QQFYSGYT. Algunos de los anticuerpos comprenden una sustitución de N32S o una sustitución de N32Q

de Kabat CDR1 de SEQ ID NO: 78, y algunos comprenden una sustitución de G33A en Kabat CDR1 de SEQ ID NO: 78. Estas sustituciones se ha encontrado que ofrecen características mejoradas, incluyendo un aumento en potencia y afinidad de anticuerpo.

La invención también proporciona anticuerpos anti-MCAM en los que la región variable madura de cadena pesada tiene por lo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad a la SEQ ID NO: 161 y la región variable madura de cadena ligera tiene por lo menos 90%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad de secuencia a la SEQ ID NO: 123. Algunos de dichos anticuerpos incluyen tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras de CDRs enteramente o sustancialmente idénticas a las regiones de CDR de anticuerpo de donante 2120.4.19. Si no son idénticos, los CDRs preferentemente tienen sustituciones en un tipo y posición definidos en este documento, tal como en el párrafo anterior. Las regiones de CDR pueden ser definidas por cualquier definición convencional (por ejemplo, Chothia) pero son preferiblemente definidas por Kabat.

Cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente pueden ser anticuerpos humanizados. Algunos anticuerpos humanizados comprenden una región variable madura de cadena pesada que comprende los tres CDRs de Kabat de la SEQ ID NO: 161 (que son los mismos que los CDRs de la SEQ ID NO: 156) salvo que la posición 32 (numeración de Kabat) puede ser N, S o Q, y la posición 33 (numeración de Kabat) puede ser G o una y una región variable madura de cadena ligera que comprende los tres CDRs de Kabat de la SEQ ID NO: 123 (que

son los mismos que los CDRs de la SEQ ID NO: 120), preferentemente en la región variable madura de cadena pesada son al menos un 90% idénticos a la SEQ ID NO: 161, y preferentemente la región variable madura de cadena ligera es por lo menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 123. Cualquiera de tales anticuerpos pueden tener Q o E (es decir, sustitución Q1E) en la posición H1 de la numeración de Kabat.

Los anticuerpos proporcionados en el presente que tienen una sustitución Q1E en la región variable madura de cadena pesada incluyen anticuerpos que comprenden una región variable madura de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 156 (es decir, 2120.4.19.Q1E), SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160 o SEQ ID NO: 161. Algunos de dichos anticuerpos comprenden una región variable madura de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122 o SEQ ID NO: 123. Las regiones variables maduras de cadena pesada y de cadena ligera se pueden combinar en cualquier permutación posible. Una combinación ejemplar es un anticuerpo que comprende la región variable madura de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 161 y la región variable madura de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 123. Las formas de estos anticuerpos sin la sustitución de Q1E, tal como se han descrito en PCT/US2013/058773, pueden utilizarse también en algunos aspectos de la invención, tales como composiciones farmacéuticas y formulaciones.

Además, la invención proporciona anticuerpos en los

la región variable madura de cadena pesada tiene al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 156 (es decir, 2120.4.19.Q1E), SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, o SEQ ID NO: 161 y la cadena ligera tiene por lo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122 o SEQ ID NO: 123. Estos anticuerpos son preferiblemente humanizados. Cualquiera de tales anticuerpos pueden tener Q o E (es decir, sustitución Q1E) en la posición H1 de la numeración de Kabat.

Las variantes de las SEQ ID NOs divulgadas normalmente difieren de las secuencias de región variable madura de cadena pesada y cadena ligera por un pequeño número (por ejemplo, normalmente no más de 1, 2, 3, 5 o 10 en el marco de la región variable madura de cadena ligera o cadena pesada, o ambos) de sustituciones, eliminaciones o inserciones. Los cambios son sustituciones preferiblemente conservadoras.

B. Selección de la Región Constante

Las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos quiméricos, revestidos o humanizados pueden unirse a por lo menos una parte de una región constante humana. La opción de región constante depende, en parte, de si se desea citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos y/o citotoxicidad dependiente de complemento. Por ejemplo,

los isótopos humanos IgG1 e IgG3 tienen citotoxicidad dependiente de complemento y los isotipos humanos IgG2 e IgG4 no la tienen. El IgG1 e IgG3 humano también inducen funciones efectoras mediadas por células más fuertes que IgG2 e IgG4 humanos. Las regiones constantes de cadena ligera pueden ser lambda o kappa.

Uno o varios aminoácidos en el terminal amino o carboxilo de la cadena ligera o pesada, como la lisina terminal C de la cadena pesada, le pueden faltar o derivarse en parte o la totalidad todas las moléculas. Se pueden realizar sustituciones en las regiones constantes para reducir o aumentar la función efectora como la citotoxicidad mediada por complemento o ADCC (véase, por ejemplo, Winter et al., Patente US No. 5,624,821; Tso al., Patente US No- 5,834,597; y Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), o para prolongar la vida media en humanos (ver, por ejemplo, Hinton et al., *J. Biol. Chem.* 279:6213, 2004). La sustitución ejemplar incluye un Gln en la posición 250 y/o una Leu en la posición 428 (la numeración de EU se utiliza en este párrafo para la región constante) para aumentar la vida media de un anticuerpo. Sustitución en cualquiera o todas de las posiciones, 234, 235, 236 y 237 reducir afinidad para los receptores de Fcγ, particularmente FcγRI receptor (véase, por ejemplo, U.S. 6.624.821). Una sustitución de alanina en las posiciones 234, 235 y 237 de IgG1 humano se puede utilizar para reducir las funciones efectoras. Algunos anticuerpos tienen una sustitución de alanina en las posiciones 234, 235 y 237 de la IgG1 humana

para reducir funciones efectoras. Opcionalmente, las posiciones 234, 236 y 237 de IgG2 humano son sustituidas con alanina y la posición 235 con glutamina (ver, por ejemplo US 5,624,821). En algunos anticuerpos, se utiliza una mutación en una o más de las posiciones 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 y 331 por numeración EU de IgG1 humano. En algunos anticuerpos, se utiliza una mutación en una o más de las posiciones 318, 320 y 322 por numeración EU de IgG1 humano. En algunos anticuerpos, las posiciones 234 y/o 235 son sustituidas con alanina y/o la posición 329 se sustituye con glicina. En algunos anticuerpos, las posiciones 234 y 235 son sustituidas con alanina, tal como en la SEQ ID NO: 172. En algunos anticuerpos, el isotipo es IgG2 o IgG4 humano. Una región constante ejemplar humana de cadena ligera kappa tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 168. La N-terminal de arginina de la SEQ ID NO: 168 puede omitirse, en cuyo caso la región constante de cadena ligera kappa tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 169. Una región constante ejemplar humana de cadena pesada de IgG1 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 170 (con o sin la C-terminal de lisina). Los anticuerpos pueden ser expresados como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos pesadas, como cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, o como una cadena única de anticuerpos en la cual los dominios variables maduros de cadena pesada y ligera están vinculados por un espaciador.

Las regiones constantes humanas muestran variación de alotípicos y variación de isoalotípicos entre individuos

diferentes, es decir, que las regiones constantes pueden variar en diferentes individuos en una o más posiciones polimórficas. Los isoalotipos se diferencian de los alotipos en que un isoalotipo será reconocible debido a que se une a una región no polimórfica de uno o más isotipos. Así, por ejemplo, otra región constante de cadena pesada es de alotipo de IgG1 G1m3 y tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 171. Otra región constante de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 171 excepto que carece de la C-terminal de lisina. Otra región constante de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 172. Aún otra región constante de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 172 excepto que carece de la C-terminal de lisina.

La invención proporciona además ácidos nucleico que codifican cualquiera de las regiones constantes anteriores. Opcionalmente, estos ácidos nucleicos además codifican un péptido señal y pueden expresarse con el péptido señal vinculado a la región constante.

C. Expresión de Anticuerpos Recombinantes

Los anticuerpos pueden ser producidos por expresión recombinante. Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos pueden ser optimizados para expresión optimizada por codón en el tipo de célula deseada (p. ej., CHO o Sp2/0). Los construcciones de ácido nucleico recombinante normalmente incluyen una secuencia de control de la expresión operativamente vinculada a las secuencias de codificación de

cadenas de anticuerpos, incluyendo las regiones del promotor asociadas naturalmente o heterólogas. Las secuencias de control de la expresión pueden ser sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar las células huésped eucariotas. Una vez que el vector ha sido incorporado en el huésped adecuado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de nivel alto de las secuencias de nucleótidos y la recolección y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada. El vector o vectores de codificación de las cadenas de anticuerpos también pueden contener un gen seleccionable, tal como dihidrofolato reductasa, para permitir la ampliación del número de copias de los ácidos nucleicos que codifican las cadenas de anticuerpo.

El *E. coli* es un anfitrión procariota particularmente útil para la expresión de anticuerpos, especialmente fragmentos de anticuerpos. Los microbios, tales como la levadura también son útiles para la expresión. Las *saccharomyces* son un ejemplo de huésped de levadura, con vectores convenientes que tienen las secuencias de control de expresión, un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según se desee. Los promotores típicos incluyen el 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Los promotores inducibles de la levadura incluyen, entre otros, promotores de la alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y las enzimas responsables de las utilizaciones maltosa y galactosa.

Las células de mamíferos pueden utilizarse para

expresar segmentos de nucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de éstas. Ver Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Un número de líneas de células huésped adecuado capaces de secretar proteínas heterólogas intactas se han desarrollado en la técnica e incluyen las líneas celulares CHO, varias líneas de células COS, las células HeLa, células HEK293, células L y mielomas que no producen anticuerpos incluyendo Sp2/0 y NS0. Puede ser ventajoso utilizar células no humanas. Los vectores de expresión de estas células pueden incluir secuencias de control de expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)) y sitios de información necesarios, tales como sitios de unión del ribosoma, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminador de la transcripción. Las secuencias de control de expresión recomendadas son promotores derivados de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino y similares. Ver Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

Al introducir vector(es) de codificación de cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos en el cultivo celular, los grupos celulares pueden ser seleccionados para productividad de crecimiento y calidad del producto en medios libres de suero. Los grupos celulares productores principales pueden entonces ser objeto de clonación unicelular basada en FACS para generar líneas monoclonales. Las productividades específicas superiores a 50 pg o 100 pg por célula por día, lo cual corresponden a títulos de producto mayores a 7.5 g/L

de cultivo, son preferibles. Los anticuerpos producidos por clones unicelulares también pueden probarse para turbidez, propiedades de filtración, PAGE, IEF, barrido de UV, HP-SEC, mapeo de carbohidrato-oligosacáridos, espectrometría de masa y ensayo de unión, tal como ELISA o Biacore. Un clon seleccionado puede virar en múltiples ampolletas y almacenarse congelado para su posterior uso.

Una vez expresados, los anticuerpos pueden ser purificados según procedimientos estándar de la técnica, incluyendo la captura de proteína A, cromatografía en columna (por ejemplo, la interacción hidrofóbica o el intercambio iónico), pH bajo para inactivación viral y similares (ver generalmente, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

Puede emplearse la metodología para la producción comercial de anticuerpos, incluyendo optimización de codón, selección de elementos promotores, elementos de transcripción y terminadores, clonación unicelular libre de suero, bancos celulares, uso de marcadores de selección para la amplificación del número de copias, terminador de CHO, clonación unicelular libre de suero, mejora de títulos proteínicos (ver, por ejemplo, US 5,786,464, US 5,888,809, US 6,063,598, US 6,114,148, US 7,569,339, WO2004/050884, WO2005/019442, WO2008/012142, WO2008/012142, WO2008/107388, y WO2009/027471).

D. Ácidos Nucleicos

La invención proporciona además ácidos nucleicos

que codifican cualquiera de las cadenas pesadas y ligeras descritas anteriormente. Por lo general, los ácidos nucleicos también codifican un péptido señal fusionado a las cadenas maduras pesadas y ligeras (por ejemplo, péptidos señal que
5 tienen secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 163, 165 y 167 que pueden ser codificados por las SEQ ID NOS: 162, 164 y 166). Las secuencias de codificación de los ácidos nucleicos pueden estar en vinculación operable con secuencias reguladoras para asegurar la expresión de las secuencias de
10 codificación, tal como un promotor, potenciador, sitio de unión a ribosoma, señal de terminación de transcripción y similares. Los ácidos nucleicos que codifican las cadenas ligeras y pesadas pueden ocurrir en forma aislada o pueden ser clonados en uno o más vectores. Los ácidos nucleicos
15 pueden ser sintetizados por ejemplo, mediante síntesis de estado sólido o PCR de oligonucleótidos superpuestos. Los ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras se pueden unir como un ácido nucleico contiguo, por ejemplo, dentro de un vector de expresión, o pueden ser separados, por
20 ejemplo, cada uno clonado en su propio vector de expresión.

E. Caracterización de Epítomos de MCAM para Unión a Anticuerpos y Producción de Anticuerpos que se unen a los mismos

25

1. Epítomos de MCAM para Unión a Anticuerpos

La invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen a epítomos específicos dentro de la proteína

humana de MCAM, algunos de los cuales se unen a la misma o al epítopo superpuesto como el anticuerpo designado 2120.4.19 (m2120).

Las mutaciones en los residuos 39, 62, 133, 141, 159, 212, 220, 221, 223, 227, 238, 241, y/o 392 de MCAM (SEQ ID NO:11) interrumpen la unión específica de m2120 (por ejemplo, <30% de unión a MCAM mutante en comparación con un control positivo de MCAM silvestre como se describe como los ejemplos). Se identificaron mutaciones en los residuos 145, 167, 175, 206, 207, 216 y 225 que tienen el mayor efecto (reducción) de unión específica de m2120. Debido a que relativamente pocos residuos afectan la unión y los residuos se espacian más ampliamente que un epítopo lineal típico (p. ej., 3-20 aminoácidos contiguos), estos resultados proporcionan una indicación de que m2120 puede unirse a un epítopo conformacional o, alternativamente, uno o más de los residuos que afectan la unión pueden hacerlo de manera alostérica sin contacto directo con el anticuerpo.

Los anticuerpos que se unen a un epítopo incluyendo uno o más de los residuos 39, 62, 133, 141, 145, 159, 167, 175, 206, 207, 212, 216, 220, 221, 223, 225, 227, 238, 241, y 392 de MCAM, y particularmente a un epítopo incluyendo uno o más de los residuos 141 y 145, es probable que compartan propiedades inhibitorias útiles con m2120. Así, los anticuerpos cuya unión específica es inhibida por mutagénesis de uno o más de los residuos 141 y 145 y particularmente el residuo 141 del MCAM suelen compartir características similares a m2120. Algunos de dichos anticuerpos se unen a un

epítopo que incluye o consiste del residuo 141 y 145 de MCAM. El epítopo puede ser lineal, tal como un epítopo (por ejemplo, 2-5, 3-5, 3-10, 3-15, 3-20, 5-10, 5-15, 5-20, 5-30, 5-40, 5-50, 5-60 o 5-70 aminoácidos contiguos) incluyendo uno o ambos de los aminoácidos especificados (141 y 145) o puede ser conformacional incluyendo o consistiendo de 1 o ambos de los aminoácidos especificados.

2. La Generación de Anticuerpos que se Unen a Epítopos

Específicos de MCAM

Algunos anticuerpos se unen al mismo epítopo o al epítopo superpuesto que el anticuerpo m2120. La producción de otros anticuerpos monoclonales no humanos, por ejemplo, murino, conejillo de Indias, primate, conejo o rata, contra MCAM humano puede lograrse, por ejemplo, al inmunizar al animal con MCAM humano o un fragmento de péptido o una línea celular que muestre MCAM humano o ADNc de MCAM humano (codificado por retrovirus o inmunizado con una pistola genética) del mismo, incluyendo el epítopo deseado ("inmunogen") y detectando los anticuerpos resultantes para unión a MCAM, opcionalmente en competencia con m2120 (ver Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) incorporado por referencia para todos los efectos). Opcionalmente, el inmunogen es conjugado con la molécula portadora. Opcionalmente, el inmunogen se administra con un adyuvante. Varios tipos de adyuvantes pueden utilizarse como se describe a continuación. Adyuvante completo de Freund seguido por adyuvante incompleto se prefiere para la

inmunización de animales de laboratorio. Los conejos o conejillos de Indias se utilizan normalmente para la fabricación de anticuerpos policlonales. Los ratones se suelen utilizarse para la fabricación de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos son seleccionados para la unión específica a un epítipo deseado dentro de MCAM.

La invención proporciona fragmentos de péptidos de MCAM que se utilizan para crear anticuerpos dirigidos a los epítopos descritos arriba. Ejemplos de dichos péptidos incluyen un péptido que está entre 2-5, 3-5, 3-10, 3-15, 3-20, 5-10, 5-15, 5-20, 5-30, 5-40, 5-50, 5-60, o 5-70 aminoácidos contiguos de longitud e incluye al menos uno de los residuos de aminoácidos 141 y 145 de MCAM. En algunos de estos péptidos, los péptidos incluyen ambos residuos de aminoácido 141 y 145.

Los inmunógenos pueden ser conjugados a moléculas portadoras, normalmente un polipéptido portador, y así ayudar a provocar una respuesta inmune contra el fragmento conjugado al portador. Un solo agente puede vincularse a un solo portador, copias múltiples de un agente pueden vincularse a múltiples copias de un portador, que a su vez están vinculadas entre sí, múltiples copias de un agente pueden vincularse a una sola copia de un portador o una sola copia de un agente puede vincularse a múltiples copias de un portador, o diversos portadores. Los portadores adecuados incluyen albúminas de suero, hemocianina de Lapa, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico o un toxoide de otras bacterias patógenas, tal como

la difteria (p. ej., CRM₁₉₇), *E. coli*, cólera, o *H. pylori*, o un derivado de la toxina atenuada.

Los inmunogenes se administran a menudo con adyuvantes farmacéuticamente aceptables. El adyuvante aumenta
5 los títulos de los anticuerpos inducidos y/o la afinidad de unión de los anticuerpos inducidos en relación con la situación si el péptido se usara solo. Una variedad de adyuvantes puede utilizarse en combinación con un fragmento inmunogénico de MCAM para provocar una respuesta inmune. Los
10 adyuvantes preferibles aumentan la respuesta intrínseca a un inmunogen sin provocar cambios conformacionales en el inmunogen que afecten la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes ejemplares incluyen hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, lípido A de 3 De-O-acilados monofosforil
15 (MPL™) (Ver GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora parte de Corixa). Stimulon™ QS-21 es un triterpeno glucósido o saponina aislada de la corteza del árbol *Quillaja Saponaria Molina* que se encuentra en América del Sur (Ver Kensil et al., en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press,
20 NY, 1995); US 5,057,540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA; ahora Antigenics, Inc., Nueva York, NY). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (como el escualeno o aceite de cacahuete), opcionalmente en
25 combinación con estimulantes inmunes, tales como lípido A de monofosforil (Ver Stoute et al., *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)), polímeros plurónicos y micobacterias muertas. Otro ayudante es CpG (WO 98/40100). Los adyuvantes pueden ser

administrados como un componente de una composición terapéutica con un agente activo o pueden administrarse por separado, antes, concurrentemente con o después de la administración del agente terapéutico.

5

3. Tipos de anticuerpos

Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Los anticuerpos pueden ser no humanos, tales como ratón o rata, primates no humanos o humanos. Los anticuerpos pueden ser quiméricos, chapeado, humanizados, primatizados y similares.

Los anticuerpos monoclonales son humanizados utilizando los métodos descritos anteriormente y los métodos descritos en Queen, US 5,530,101 y 5,585,089; Winter, US 5,225,539, Carter, US 6,407,213, Adair, US 5,859,205 6,881,557, Foote, US 6,881,557. Las secuencias de anticuerpo del aceptante pueden ser, por ejemplo, una secuencia madura de región variable de anticuerpo humano, un compuesto de tales secuencias, una secuencia de consenso de las secuencias de región variable de anticuerpo humano (por ejemplo, secuencias de consenso de región variable de cadena ligera y pesada de Kabat, 1991, supra), o una secuencia de región variable de la línea germinal. Por lo tanto, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que tiene algunos o todos de los CDR entera o sustancialmente de un anticuerpo de donante y las secuencias de marco región variable y regiones constantes, si están presentes, entera o sustancialmente de las secuencias de anticuerpo humano. Asimismo, una cadena

pesada humanizada tiene al menos uno, dos y generalmente los tres CDRs entera o sustancialmente de una cadena pesada de anticuerpo donante y una secuencia de marco de región variable de cadena pesada y región constante de cadena pesada, si está presente, sustancialmente del marco de región variable de cadena pesada humana y región constante de las secuencias. Asimismo una cadena ligera humanizada tiene al menos uno, dos y generalmente los tres CDRs enteramente o sustancialmente de una cadena ligera de anticuerpo donante y una secuencia de marco de región variable de cadena ligera y región constante de cadenas ligeras, si está presente, sustancialmente de marco de región variable de cadena ligera humana y secuencias de región constante. Aparte de nanocuerpos y dAbs, un anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada humanizada y una cadena ligera humanizada. Un CDR en un anticuerpo humanizado es sustancialmente de un CDR correspondiente en un anticuerpo no humano cuando al menos el 85%, 90%, 95% o 100% de los residuos correspondientes (según lo definido por Kabat) son idénticos entre los CDRs respectivos. Las secuencias de marco de región variable de una cadena de anticuerpos o la región constante de una cadena de anticuerpo son sustancialmente de la secuencia de marco de región variable humana o región constante humana respectivamente cuando al menos 85, 90, 95 o 100% de los residuos correspondientes definidos por Kabat son idénticos.

Aunque los anticuerpos humanizados a menudo incorporan los seis CDR (preferiblemente como lo define Kabat) de un anticuerpo de ratón, también pueden hacerse con

menos de todos los CDR (p. ej, al menos, 3, 4 o 5 CDRs) de un anticuerpo de ratón (por ejemplo, Pascalis et al, *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos et al., *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., *Journal of Immunology*, 164:1432-1441, 2000).

En algunos anticuerpos sólo parte de los CDRs, a saber, el subconjunto de residuos de CDR requeridos para la unión, denominados SDRs, son necesarios para conservar la unión de un anticuerpo humanizado. Los residuos CDR que no están en contacto con el antígeno en los SDRs pueden identificarse partiendo de estudios anteriores (por ejemplo, los residuos de H60-H65 en CDR H2 que a menudo no son necesarios), de las regiones de CDRs de Kabat que están fuera de los bucles hipervariables de Chothia (Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987), por modelado molecular y/o empírico, o como se describe en Gonzales et al., *Mol. Immunol.* 41: 863, 2004. En dichos anticuerpos humanizados en las posiciones en las que uno o más residuos de CDR de donantes está ausente o en donde todo el donante de CR se omite, el aminoácido que ocupa la posición puede ser un aminoácido que ocupa la posición correspondiente (por numeración de Kabat) en la secuencia de anticuerpo del aceptante. El número de tales sustituciones del aceptante para aminoácidos donantes en los CDR a incluir refleja un equilibrio de las consideraciones de competencia. Dichas sustituciones son potencialmente beneficiosas en la disminución del número de aminoácidos de ratón en un anticuerpo humanizado y en consecuencia la

disminución potencial de la inmunogenicidad. Sin embargo, las sustituciones también pueden causar cambios de afinidad, y preferiblemente se evitan reducciones significativas en la afinidad. Las posiciones de sustitución dentro de los CDRs y los aminoácidos a sustituir también pueden seleccionarse empíricamente.

Las secuencias de anticuerpo humano aceptante pueden opcionalmente seleccionarse entre las muchas secuencias de anticuerpo humano para proporcionar un alto grado en la secuencia de identidad (p. ej., 65-85% de identidad) entre los marcos de la secuencia de la región variable de un aceptor humano y los marcos correspondiente a la región variable de una cadena de anticuerpos del donante.

Ciertos aminoácidos de los residuos de marco de región variable humana pueden seleccionarse para la sustitución con base en su posible influencia en la conformación de los CDR y/o su unión al antígeno. La investigación de esas posibles influencias es por modelado, examen de las características de los aminoácidos en ciertas ubicaciones u observación empírica de los efectos de sustitución o de mutagénesis de los aminoácidos particulares.

Por ejemplo, cuando un aminoácido se diferencia entre un residuo de marco de región variable murina y un residuo de marco de región variable humana seleccionada, los aminoácidos de marco humano pueden ser sustituido por el marco equivalente de aminoácido de los anticuerpos de ratón cuando razonablemente se espera que el aminoácido:

(1) se una de manera no covalente al antígeno

directamente,

(2) es adyacente a una región de CDR,

(3) de otra manera interactúa con una región de CDR
(por ejemplo, está a aproximadamente 6 Å de una región de
5 CDR).

Otros candidatos para la sustitución son los aminoácidos de marco humano del aceptante que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden ser sustituidos con los aminoácidos de la
10 posición equivalente de anticuerpo del ratón donante o de las posiciones equivalentes de las inmunoglobulinas humanas más típicas. Otros candidatos para la sustitución son los aminoácidos de marco humano del aceptante que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición.

15 La invención proporciona además formas quiméricas y revestidas de anticuerpos no humanos que se unen específicamente a los epítopos de MCAM descritos anteriormente.

Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el cual
20 las regiones variables maduras de cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo no humano (*por ejemplo*, un ratón) se combinan con regiones constantes humanas de cadena ligera y pesada. Dichos anticuerpos conservan sustancial o completamente la especificidad de unión de anticuerpo de
25 ratón y son de aproximadamente dos tercios de la secuencia humana.

Un anticuerpo revestido es un tipo de anticuerpo humanizado que conserva algunos y generalmente todos los CDR

y algunos de los residuos de marco no humanos de región variable de un anticuerpo no humano, pero reemplaza otros residuos de marco de región variable que pueden contribuir a epítopos de células T o B, por ejemplo los residuos expuestos con residuos de las posiciones correspondientes de una secuencia de anticuerpo humano (Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489, 1991). El resultado es un anticuerpo en el que los CDR son completa o sustancialmente de un anticuerpo no humano y los marcos de la región variable de anticuerpo no humano se hacen más tipo humanos por las sustituciones.

Los anticuerpos humanos contra MCAM son proporcionados por una variedad de técnicas que se describen a continuación. Algunos anticuerpos humanos son seleccionados por experimentos de unión competitiva, por el método de despliegue de fagos de Winter, citado anteriormente, o de otra manera, porque tienen la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo de ratón particular, como uno de los monoclonales de ratón que se describen en los ejemplos. Los anticuerpos humanos también pueden ser seleccionados para una especificidad de epítipo particular utilizando sólo un fragmento de MCAM como el antígeno objetivo, y/o seleccionando anticuerpos contra una colección de mutantes de eliminación de MCAM.

Los métodos para la producción de anticuerpos humanos incluyen el método trioma de Oestberg et al., *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, Patente estadounidense No. 4,634,664; y Engleman et al., Patente estadounidense 4,634,666, uso de ratones transgénicos que incluyen genes de

inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, Lonberg et al., WO93/12227 (1993); US 5,877,397, US 5,874,299, US 5,814,318, US 5,789,650, US 5,770,429, US 5,661,016, US 5,633,425, US 5,625,126, US 5,569,825, US 5,545,806, *Nature* 148, 1547-1553 (1994), *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991) y métodos de despliegue de fagos (ver, por ejemplo, Dower et al., WO 91/17271 y McCafferty et al., WO 92/01047, US 5,877,218, US 5,871,907, US 5,858,657, US 5,837,242, US 5,733,743 y US 5,565,332.

Los anticuerpos quiméricos, humanizados (incluyendo revestidos) y humanos son normalmente producidos por expresión recombinante tal como se describió anteriormente.

La invención proporciona además moléculas de unión a no-anticuerpo. Las moléculas de unión a no anticuerpos incluyen, por ejemplo, anticalinas, que están basadas en el andamio de lipocalina, una estructura proteica caracterizado por un cilindro beta rígido que soporta cuatro bucles hipervariables que forman el sitio de unión al ligando. Nuevas especificidades de unión han sido diseñadas por mutagénesis aleatoria dirigida en las regiones de bucle, en combinación con despliegue funcional y selección guiada (Skerra (2008) *FEBS J.* 275: 2677-2683). Otros andamios apropiados pueden incluir, por ejemplo, adnectinas o monocuerpos, con base en el décimo dominio extracelular e de fibronectina humana III (Koide y Koide (2007) *Methods Mol. Biol.* 352: 95-109); anticuerpos, con base en el dominio Z de la proteína A estafilocócica (Nygren et al. (2008) *FEBS J.* 275: 2668-2676)); DARPinas, con base en las proteínas de

repetición de anquirina (Stumpp et al. (2008) *Drug. Discov. Hoy* 13: 695-701); finómeros, con base en el dominio SH3 de la cinasa proteína humana Fyn (Grabulovski et al. (2007) *J. Biol. Chem.* 282: 3196-3204); affitinas, con base en Sac7d de *Sulfolobus acidolarius* (Krehenbrink et al. (2008) *J. Mol. Biol.* 383: 1058-1068); affilinas, con base en γ -B-cristalina humana (Ebersbach et al. (2007) *J. Mol. Biol.* 372: 172-185); avímeros, con base en los dominios A del receptor de proteínas de membrana (Silverman et al. (2005) *Biotechnol.* 23: 1556-1561); péptidos de knotina ricos en cisteína (J. Kolmar (2008) *FEBS J.* 275: 2684-2690); e inhibidores tipo Kunitz diseñados (Nixon y Wood (2006) *Curr. Opin. Drug. Discov. Dev.* 9: 261-268). Para revisión, véase Gebauer y Skerra (2009) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13: 245-255.

En algunos de estos anticuerpos, los anticuerpos no son ninguno de los anticuerpos o anticuerpos que incluyen CDRs (como lo define Kabat, Chothia o un compuesto de los mismos) entera o sustancialmente de los anticuerpos descritos en WO/2012/170071 and PCT/US2013/058773, particularmente los anticuerpos designados clon 15 (definidos por SEQ ID NOs: 12-21) y el clon 17 (definido por SEQ ID NOs: 1-10) en WO/2012/170071 y los clones monoclonales de MCAM de ratón anti-humano designados 1174.1.3, 1414.1.2, 1415.1.1, y 1749.1.3, y los clones de MCAM de anticuerpo monoclonal de rata anti-humano designados 2120.4.19 y 2107.4.10 descritos en PCT/US2013/058773.

4. Métodos de Detección de Anticuerpos para Actividad

La actividad inhibitoria de los anticuerpos de MCAM descritos en este documento puede ensayarse por varios métodos incluyendo ensayos de competencia vinculante con anticuerpos que se unen al mismo epítipo o a uno sustancialmente similar (por ejemplo, m2120) y bloqueo de unión de MCAM con su ligando, la cadena de laminina $\alpha 4$ de laminina 411.

Por ejemplo, la actividad de los anticuerpos de MCAM para inhibir la interacción entre MCAM y la cadena de laminina $\alpha 4$ de laminina 411 MCAM puede ser detectada como sigue. Las células que expresan MCAM son (a) incubación con un polipéptido recombinante que comprende una cadena de laminina $\alpha 4$, *por ejemplo*, una cadena $\alpha 4$ de laminina 411, en presencia o ausencia de un anticuerpo candidato; (b) supervisión del nivel de unión de laminina $\alpha 4$ a las células, *por ejemplo*, por citometría de flujo o microscopia de fluorescencia; y (c) identificación de dicho anticuerpo de candidato como un inhibidor de la interacción de MCAM/laminina $\alpha 4$ si el nivel de unión de laminina $\alpha 4$ es menor en la presencia que en la ausencia de anticuerpo candidato. Un protocolo de detección alternativo implica el uso de una población celular que expresa una cadena de laminina $\alpha 4$, que puede incubarse con MCAM, en presencia y en ausencia de un anticuerpo candidato, y la unión de MCAM a la población celular monitoreada. Si la unión de MCAM a la población celular en presencia de anticuerpo candidato es menor que en su ausencia, el anticuerpo candidato es un antagonista de MCAM.

Otros métodos de monitoreo incluyen clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y análisis inmunosorbente vinculado a enzimas (ELISA).

Los antagonistas de MCAM identificados con base en su capacidad de inhibir la unión de MCAM a su ligando, por ejemplo, una cadena de laminina $\alpha 4$, son candidatos para el tratamiento de condiciones inflamatorias caracterizadas por infiltración de células que expresan MCAM.

La actividad inhibitoria de un anticuerpo de MCAM también puede ser evaluada *in vivo*. Un ejemplo de una metodología para evaluar la actividad inhibitoria de un anticuerpo de MCAM es con un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). La EAE es una enfermedad que se genera en animales de laboratorio para producir síntomas similares a los de la esclerosis múltiple (EM) en los seres humanos. Ver, por ejemplo, Bauer et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. EUA* 106: 1920-1925 (2009). La EAE se produce generalmente inyectando animales con diversas proteínas del sistema nervioso central de otros animales, por ejemplo, extractos de proteína básica de mielina y toda la médula espinal o tejido cerebral, o con células T que reaccionan específicamente a la mielina. La EAE es utilizada para seguir el curso de formas de EM recidivantes o progresivas. La EAE ha servido como un modelo animal adecuado para desarrollar agentes terapéuticos para la EM y para estudiar los procesos de enfermedad específica de la EM. Ver, por ejemplo, Gold et al., *Brain* 129: 1953-1971 (2006); ver también Steinman et al., *Ann. Neurol.* 60: 12-21 (2006).

Los efectos del bloqueo de MCAM en la progresión de la enfermedad pueden ser examinados en un modelo terapéutico de EAE en el que la polarización de TH17 ocurre *in vivo*. Los ratones son inmunizados con el péptido PLP 139-151 para inducir EAE. Después del inicio de la enfermedad, los ratones son tratados por vía intraperitoneal con un candidato de anticuerpo anti-MCAM o isotipo de control y todos los días después de eso. Los ratones son monitoreados diariamente y clasificados de una manera ciega, y los pesos corporales fueron obtenidos cada 2-3 días. Un retraso en la recaída y reducción significativa en la gravedad de los síntomas en los ratones tratados con un anticuerpo de MCAM candidato es indicativo de un anticuerpo candidato exitoso.

F. Anticuerpos Conjugados

Los anticuerpos conjugados que se unen específicamente a MCAM pueden ser útiles contra el cáncer o las células tumorales para su destrucción o dirigidos a células implicadas en enfermedades autoinmunes o enfermedades neuroinflamatorias. Estos anticuerpos también pueden ser útiles para dirigirse a cualquier enfermedad mediada al menos en parte por la expresión de MCAM. Por ejemplo, dichos anticuerpos pueden ser conjugados con otros agentes terapéuticos, otras proteínas, otros anticuerpos y/o etiquetas detectables. Ver WO 03/057838; U.S. 8,455,622. Estos agentes terapéuticos pueden ser cualquier agente que pueda usarse para tratar, combatir, mitigar, prevenir o mejorar un estado no deseado o enfermedad en un paciente, tal

como una enfermedad autoinmune, una enfermedad neuroinflamatoria o un cáncer. Los agentes terapéuticos pueden incluir agentes citotóxicos, citostáticos, agentes radioterapéuticos, inmunomoduladores o cualquier agente biológicamente activo que facilite o mejore la actividad de anticuerpo. Un agente citotóxico puede ser cualquier agente que sea tóxico para una célula. Un agente citostático puede ser cualquier agente que inhiba la proliferación celular. Un inmunomodulador puede ser cualquier agente que estimule o inhiba el desarrollo o mantenimiento de una respuesta inmunológica. Un agente radioterapéutico puede ser cualquier molécula o compuesto que emita radiación. Si dichos agentes terapéuticos son acoplados a un anticuerpo específico de MCAM, tales como los anticuerpos descritos, los agentes terapéuticos acoplados tendrán una afinidad específica para células que expresan MCAM (por ejemplo, células inmunes, tales como las células que expresan TH17, o células cancerosas, tales como los melanocitos malignos) sobre otras células. En consecuencia, la administración de los anticuerpos conjugados se dirige directamente a células que expresan MCAM con efectos mínimos en otras células y tejidos circundantes. Esto puede ser particularmente útil para los agentes terapéuticos que son demasiado tóxicos para ser administrados por su propia cuenta. Además, pueden utilizarse cantidades más pequeñas de agentes terapéuticos.

Los anticuerpos pueden ser modificados para actuar como inmunotoxinas. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5,194,594. Por ejemplo, la ricina, una

toxina celular derivada de plantas, se puede acoplar a anticuerpos usando el anhídrido de reactivo bifuncional S-acetilmercaptosuccínico para el anticuerpo y propionato de succinimidil 3-(2-piridilditio) para la ricina. Ver Pietersz
 5 et al., *Cancer Res.* 48(16):4469-4476 (1998). El acoplamiento produce pérdida de la actividad de la B-cadena de la ricina, mientras no afecta ni el potencial tóxico de la cadena de ricina ni la actividad de anticuerpo. Del mismo modo, la saporina, un inhibidor del ensamblaje ribosomal, puede
 10 acoplarse a los anticuerpos a través de un enlace disulfuro entre grupos sulfihidrilos químicamente insertados. Ver Polito et al., *Leukemia* 18:1215-1222 (2004).

Los radioisótopos pueden vincularse también a los anticuerpos, tales como, por ejemplo, itrio⁹⁰ (90Y), indio¹¹¹
 15 (111In), ¹³¹I, ^{99m}Tc, radioplatina-111, radioplatina-199, y Bismuto²¹³. La vinculación de radioisótopos a anticuerpos se puede realizar con quelatos de bifunción convencional. Para la vinculación de radioplatina-11 y radioplatina-199, pueden utilizarse vinculadores de base de azufre. Ver Hazra et al.,
 20 *Cell Biophys.* 24-25:1-7 (1994). La vinculación de radioisótopos de plata puede implicar la reducción de la inmunoglobulina con ácido ascórbico. Para radioisótopos tales como el 111In y 90Y, tiuxetano de ibirtumomab puede utilizarse y reaccionará con dichos isótopos para formar
 25 tiuxetano de 111In-ibritumomab y tiuxetano de 90Y-ibribumomab, respectivamente. Ver Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Supl 1:S91-S95 (2001).

Otros agentes terapéuticos también pueden estar

vinculados a anticuerpos. Los agentes terapéuticos generalmente son citotóxicos o citostáticos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser conjugados con fármacos quimioterapéuticos tóxicos tales como maitansina, geldanamicina, inhibidores de la tubulina, tales como auristatinas o agentes de unión de surco menor, como la caliqueamicina. Otros agentes terapéuticos representativos incluyen agentes conocidos por ser útiles para el tratamiento, manejo o mejoramiento de una enfermedad autoinmune, una enfermedad neuroinflamatoria o un cáncer, o síntomas de una enfermedad autoinmune, una enfermedad neuroinflamatoria o un cáncer. Ejemplos de estos agentes terapéuticos se divulgan en otra parte en el presente documento.

Los anticuerpos también se pueden acoplar con otras proteínas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser acoplados con finómeros (*Fynomers*). Los finómeros son proteínas pequeñas (por ejemplo, 7 kDa) derivadas del dominio SH3 de Fyn humano. Pueden ser estables y solubles, y pueden carecer de residuos cisteína y enlaces disulfuro. Los finómeros pueden diseñarse para unirse a las moléculas objetivo con la misma afinidad y especificidad que los anticuerpos. Son adecuados para la creación de proteínas de fusión multi-específicas basadas en anticuerpos. Por ejemplo, los finómeros pueden ser fusionados a extremos de terminal-N y/o terminal-C de anticuerpos para crear FynomAbs bi- y tri-específicas con diferentes arquitecturas. Los finómeros pueden seleccionarse utilizando bibliotecas de finómeros a

través de tecnologíasde selección utilizando FACS, Biacore y ensayos celulares que permiten la eficiente selección de finómeros con propiedades óptimas. Ejemplos de finómeros se divulgan en Grabulovski *et al.*, *J. Biol. Chem.* 282:3196-3204 (2007); Bertschinger *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* 20:57-68 (2007); Schlatter *et al.*, *MAbs.* 4:497-508 (2011); Banner *et al.*, *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 69(Pt6):1124-1137 (2013); y Brack *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* 13:2030-2039 (2014).

Los anticuerpos aquí divulgados también pueden ser acoplados o conjugados con uno o más anticuerpos diferentes (*por ejemplo*, para formar heteroconjugados de anticuerpo). Cichos otros anticuerpos pueden unirse a diferentes epítomos dentro de MCAM o pueden unirse a un antígeno objetivo diferente.

Los anticuerpos también se pueden acoplar con una etiqueta detectable. Dichos anticuerpos se pueden utilizar, *por ejemplo*, para el diagnóstico de una enfermedad autoinmune, una enfermedad neuroinflamatoria, o un cáncer, para supervisar la progresión de una enfermedad autoinmune, una enfermedad neuroinflamatoria o un cáncer, y/o para evaluar la eficacia del tratamiento. Dichos anticuerpos pueden ser útiles para realizar estas determinaciones en sujetos que tienen o son susceptibles a una enfermedad autoinmune, una enfermedad neuroinflamatoria o un cáncer, o en muestras biológicas adecuadas obtenidas de estos sujetos. Las etiquetas detectables representativas que pueden ser acopladas o vinculadas a un anticuerpo incluyen varias

enzimas, tales como la peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como luminol; materiales bioluminiscentes, tales como luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radioactivos, tales como radioplata-199, radioplata-111, Bismuto²¹³, yodo (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I,)), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In,)), tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Tl), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), paladio (¹⁰³Pd), molibdeno (⁹⁹Mo), xenón (¹³³Xe), flúor (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn, y ¹¹⁷Tm; metales que emiten positrones utilizando varias tomografías de emisión de positrones; iones de metal paramagnético no radioactivo; y moléculas que están radioetiquetadas o conjugadas para radioisótopos específicos.

Los agentes terapéuticos, otras proteínas, otros anticuerpos y/o etiquetas detectables pueden ser acopladas o conjugadas, directa o indirectamente a través de un intermediario (por ej., un vinculador), a un anticuerpo murino, quimérico, revestido, o humanizado mediante técnicas conocidas en la materia. Ver, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*,

Reisfeld et al. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery* (2a Ed.), Robinson et al. (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody
 5 *Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review*," en *Monoclonal Antibodies* 84: *Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," en
 10 *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985); y Thorpe et al., *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982). Los vinculadores adecuados incluyen, por ejemplo, vinculadores escindibles y no escindibles. Pueden emplearse diferentes
 15 vinculadores que liberan los fármacos bajo condiciones ácidas o reductoras o en exposición a las proteasas específicas. Asimismo, pueden emplearse diferentes vinculadores que liberan los agentes terapéuticos acoplados, proteínas, anticuerpos y/o etiquetas detectables bajo condiciones ácidas
 20 o reductoras, en exposición a las proteasas específicas, o bajo otras condiciones definidas.

IV. MÉTODOS DE TRATAMIENTO

Los anticuerpos u otros antagonistas aquí
 25 divulgados pueden utilizarse para tratar o para efectuar profilaxis a sujetos que tienen (por ejemplo, que cumplen con los criterios reconocidos en la materia, tales como los de DSM-IV-TR o DSM-V) o en riesgo elevado comparados con la

población en general de una enfermedad autoinmune, enfermedad neuroinflamatoria y cáncer, entre otras. El riesgo elevado puede ser elevado a partir de la presencia de uno o más marcadores genéticos o bioquímicos asociados con la enfermedad, o uno o más síntomas consistentes con la enfermedad pero no suficientes para permitir un diagnóstico definitivo. Las categorías o enfermedades mencionadas no son necesariamente mutuamente exclusivas entre sí; por ejemplo, la esclerosis múltiple puede clasificarse como neuroinflamatoria o autoinmune. Algunas enfermedades ejemplares específicas que se pueden tratar por los presentes métodos incluyen esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, dermatitis alérgica de contacto, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, sarcoidosis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn y cáncer, particularmente tumores sólidos, tal como melanoma. Aunque la práctica de los métodos no depende de la comprensión del mecanismo, se cree que en algunos métodos los anticuerpos u otros antagonistas funcionan al menos en parte mediante la inhibición de la interacción del MCAM expresado en las células T (por ejemplo, las células TH17) y la cadena $\alpha 4$ de laminina, por ejemplo, una cadena de $\alpha 4$ de laminina expresada en la superficie de una célula endotelial. Los conjugados de fármacos-anticuerpos pueden tener mecanismos de acción adicionales incluyendo el efecto citotóxico o citostático del agente vinculado, por lo general después de la absorción dentro de la célula objetivo. Los conjugados de fármacos- anticuerpos pueden también inducir toxicidad de

macrófagos asociada a tumor.

Las condiciones neuroinflamatorias se caracterizan por la inflamación del SNC y/o daño celular/tisular. Los indicios pueden incluir mayor activación glial, niveles
5 elevados de citoquinas/quimioquinas proinflamatorias (por ejemplo, $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$), mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica y/o mayor captación/invasión de la célula inmune (por ejemplo, leucocitos) del SNC. La neuroinflamación es a menudo crónica asociada a activación
10 crónica de las células del sistema inmune (*es decir*, neuroinflamación autoinmune asociada) pero como alternativa o adicionalmente puede tener episodios agudos.

La esclerosis múltiple es una enfermedad susceptible de tratamiento en cualquiera de sus por lo menos
15 cuatro subtipos. La EM recidivante-remitente (EM-RR) es la forma más común de EM y se caracteriza por exacerbaciones/recaídas claramente definidas (ataques agudos) seguidos por recuperación parcial o completa. No hay ninguna progresión de la enfermedad entre los períodos de recaída.
20 Inicialmente (al momento del diagnóstico) la EM-RR representa aproximadamente el 85% de todos los sujetos recién diagnosticados. La definición de recaída requiere que el síntoma o signo nuevo esté presente durante al menos 24 horas, sin estar asociado con fiebre o enfermedad
25 intercorriente (tal como la "gripe" o una infección del tracto urinario), porque una temperatura corporal elevada puede desenmascarar lesiones silenciosas o anteriores.

La EM primaria progresiva (EM-PP) es continua desde

el principio sin recaídas claras. Puede haber estancamientos (períodos de estabilización). Del 10-15% de todos los sujetos con EM están en este grupo y tiende a ocurrir en personas de la tercera edad. La relación femenino a masculino es igual en este grupo, a diferencia de otras formas donde el femenino predomina en aproximadamente 2:1. También la EM-PP tiende a presentar menos cambios de IRM cerebral y más cambios relacionados con mielopatía/médula espinal.

Una forma secundaria progresiva (EM-SP) comienza como una EM-RR y posteriormente ocurre una progresión constante con o sin recaídas. Aproximadamente el 50% de los sujetos recidivantes-recurrentes progresan a la forma progresiva secundaria.

Una forma recidivante progresiva (EM-RP), que ocurre en alrededor del 5% de los individuos, es progresiva desde el inicio con recaídas superpuestas (con o sin recuperación).

El diagnóstico de la EM generalmente se basa en un historial clínico, un examen neurológico y varias pruebas, incluyendo imágenes por resonancia magnética (IRM), potenciales evocados (PE) y análisis del líquido espinal. Un diagnóstico definitivo de EM requiere evidencia de daños en al menos dos áreas separadas del sistema de nervioso central (SNC), que incluye el cerebro, médula espinal y nervios ópticos y evidencia de que el daño se produjo con por lo menos un mes de separación y exclusión de todos los otros diagnósticos posibles. Así como los sujetos sometidos a tratamiento terapéutico que obtienen un diagnóstico de EM por

criterios reconocidos en la materia, los presentes métodos también pueden usarse profilácticamente para tratar individualmente con por lo menos un signo o síntoma de EM colocándolos en un mayor riesgo de progresión a EM en comparación con la población general de personas sanas. Por ejemplo, los métodos pueden utilizarse para el tratamiento de personas que han tenido un ataque (también llamado una recaída o una exacerbación) de síntomas tipo EM - referidos como un síndrome clínicamente aislado (SCA), que puede o no continuar al desarrollo de EM. Las personas en riesgo de desarrollar EM también pueden identificarse por la presencia de un anticuerpo a la proteína KIR4.1 en su suero, entre otros métodos.

La enfermedad neuroinflamatoria también incluye la enfermedad de Parkinson. Los síntomas de la enfermedad de Parkinson incluyen temblor (por ejemplo, temblor en manos, brazos, piernas, mandíbula y cara); rigidez o agarrotamiento de las extremidades y el tronco; bradicinesia o lentitud de movimiento; inestabilidad postural o deterioro del equilibrio y la coordinación; depresión y otros cambios emocionales; dificultad en la deglución, masticación y habla; problemas urinarios o estreñimiento; problemas de la piel; trastornos del sueño. La enfermedad de Parkinson puede ser diagnosticada a partir de tales síntomas, y/o exploraciones cerebrales y/u otros exámenes para descartar otras enfermedades.

Los presentes métodos pueden utilizarse para inhibir el crecimiento o la metástasis del cáncer. Los

cánceres pueden ser neoplasias hematopoyéticas o tumores sólidos, es decir, masas de células que resultan del crecimiento celular o proliferación celular excesivos, ya sea benigna o maligna, incluyendo legiones precancerosas. El

5 cáncer puede ser benigno, maligno o metastásico. El cáncer metastático se refiere a un cáncer que se ha diseminado desde el lugar en donde empezó primero a otro lugar en el cuerpo. Los tumores formados por células de cáncer metastásico se llaman tumor metastásico o metástasis, que es un término

10 también usado para referirse al proceso por el cual las células cancerosas se diseminan a otras partes del cuerpo. En general, el cáncer metastásico tiene el mismo nombre y mismo tipo de células cancerosas que el cáncer original, o primario. Ejemplos de cáncer incluyen tumores sólidos, tal

15 como el melanoma, carcinoma, blastoma y sarcoma. Los cánceres también incluyen neoplasias hematológicas, tales como leucemia o neoplasias linfoides, tales como linfoma. Ejemplos más concretos de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer

20 hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioma, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma , cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorectal, carcinoma

25 endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

Las enfermedades autoinmunes incluyen enfermedades autoinmune sistémicas, enfermedades autoinmunes de órgano o tejido específico, y enfermedades que muestran expresiones de tipo autoinmune. En estas enfermedades, el cuerpo desarrolla una respuesta celular y/o inmune humoral contra uno de sus propios antígenos, llevando a la destrucción de ese antígeno y a consecuencias potencialmente invalidantes y/o mortales. La respuesta celular, encaso de estar presente, puede ser de células B o células T o ambas. Se ha reportado que las células TH17, un linaje de células ayudantes T caracterizado por la producción de interleucina (IL)-17 e IL-22, se han ingresan en los tejidos para facilitar las respuestas autoinmunes patógenas, incluyendo esclerosis múltiple en seres humanos y encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) en ratones. Ver, por ejemplo, Cua et al., *Nature* 421: 744-748 (2003); Ivonov et al., *Cell* 126: 1121-1133 (2006). Las células TH17 pueden iniciar o propagar una respuesta inflamatoria por su captación específica a, y la infiltración en el tejido.

Ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, síndrome poliglandular autoinmune, diabetes mellitus dependiente de insulina (diabetes tipo 1), diabetes mellitus resistente a la insulina (diabetes tipo 2), infertilidad inmuno-mediada, enfermedad autoinmune de Addison, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, dermatitis herpetiforme, alopecia autoinmune, vitiligo, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, púrpura trombocitopénica

autoinmune, anemia perniciosa, miastenia gravis, síndrome de Guillain-Barré, síndrome del hombre rígido, fiebre reumática aguda, oftalmia simpática , síndrome de Goodpasture, uveitis autoinmune, artritis temporal, enfermedad de Bechet, enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune, oforitis autoinmune, fibromialgia, polimiositis, dermatomitosi, espondilitis anquilosante, artritis de Takayasu, paniculitis, penfigoide, vasculitis de origen desconocido, vasculitis negativa a anca, vasculitis positiva a anca, lupus eritematoso sistémico, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, vasculitis de necrotización sistémica, granulomatosis de Wegener, síndrome de CREST, síndrome antifosfolípido, síndrome de Sjögren, gastroenteritis eosinófila, dermatitis tópica anormal, cardiomiopatía, síndromes post-infecciosos, endomiocarditis post-infecciosa, enfermedad celíaca, esclerosis múltiple, sarcoidosis, enfermedad de Crohn y psoriasis.

Los anticuerpos u otros antagonistas son administrados en un régimen eficaz, lo que significa una dosis, vía de administración y frecuencia de administración que retrasa el inicio, reduce la gravedad, inhibe el deterioro y/o mejora al menos un signo o síntoma de una enfermedad a tratar (por ejemplo, cáncer). Si un paciente ya padece un trastorno, el régimen puede ser referido como un régimen terapéuticamente eficaz. Si el paciente está en alto riesgo del trastorno en relación con la población general pero aún no está experimentando los síntomas, el régimen

puede ser referido como un régimen profilácticamente eficaz. En algunos casos, la eficacia terapéutica o profiláctica puede observarse en un paciente individual en comparación con controles históricos o con la experiencia pasada en el mismo paciente. En otros casos, la eficacia terapéutica o profiláctica puede demostrarse en un ensayo preclínico o clínico en una población de pacientes tratados en relación con una población de control de pacientes no tratados.

Las dosificaciones ejemplares para un anticuerpo son 0.1-20, o 0.5-5 mg/kg peso corporal (por ejemplo, 0.5, 1, 2, 3, 4 o 5 mg/kg) o 10-1500 mg como una dosis fija. La dosificación depende de la condición del paciente y su respuesta al tratamiento previo, si lo hubiere, si el tratamiento es profiláctico o terapéutico y si el trastorno es agudo o crónico, entre otros factores.

La administración puede ser parenteral, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, tópica, intranasal o intramuscular. Para algunos anticuerpos y bajo algunas circunstancias, la administración en la circulación sistémica por administración intravenosa o subcutánea es preferida. La administración intravenosa puede ser, por ejemplo, por infusión durante un período tal como de 30-90 min.

La frecuencia de administración depende de la vida media de anticuerpo en la circulación, la condición del paciente y la vía de administración entre otros factores. La frecuencia puede ser diaria, semanal, mensual, trimestral o a intervalos irregulares en respuesta a los cambios en la

condición o el progreso en el paciente de la enfermedad a tratar. Una frecuencia ejemplar para la administración intravenosa es entre semanal y trimestral sobre una causa continua de tratamiento, aunque también es posible la dosificación más o menos frecuente. Para administración subcutánea, una frecuencia de dosificación ejemplar es de diaria a mensual, aunque también es posible la dosificación más o menos frecuente.

El número de dosificaciones administradas depende de si el trastorno es agudo o crónico y la respuesta del trastorno al tratamiento. Para trastornos agudos o exacerbaciones agudas de un trastorno crónico, entre 1 y 10 dosis son a menudo suficientes. Algunas veces una dosis en bolo único, opcionalmente en forma dividida, es suficiente para un trastorno agudo o una exacerbación aguda de un trastorno crónico. El tratamiento puede repetirse para la recurrencia de un trastorno agudo o una exacerbación aguda. Para los trastornos crónicos, un anticuerpo puede ser administrado a intervalos regulares, por ejemplo, semanal, quincenal, mensual, trimestral, cada seis meses por al menos 1, 5 o 10 años, o por toda la vida del paciente.

El tratamiento con anticuerpos o con otros antagonistas aquí divulgados se puede combinar con otros tratamientos eficaces contra el trastorno a tratar. Los tratamientos combinados pueden formularse para ser administrados por separado. Los agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de la esclerosis múltiple incluyen uno o más de los siguientes: teriflunomida,

interferón beta-1a, interferón beta-1b, acetato de glatiramero, fingolimod y mitoxantrona o un corticosteroide tal como prednisona, metilprednisolona o dexametasona.

Los agentes terapéuticos adicionales para el cáncer incluyen agentes alquilantes tales como carmustina, 5 clorambucilo, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, procarbazona y ciclofosfamida; antimetabolitos tales como fluorouracilo, floxiridina, fludarabina, gemcitabina, metotrexato e hidroxiurea; productos naturales incluyendo 10 alcaloides y antibióticos vegetales tales como bleomicina, doxorubicina, daunorubicina, idarrubicina, etopósido, mitomicina, mitoxantrona, vinblastina, vincristina, Taxol (paclitaxel) o compuestos relacionados tales como Taxotere®; el irinotecan inhibidor de topoisomerasa 1; temozolomida y 15 Gliadel®, carmustina; e inhibidores de tirosina quinasas tales como Gleevec®, Sutent® (malato de sunitinib), Nexavar® (sorafenib) y Tarceva® (erlotinib) o Iressa® (gefitinib); inhibidores de la angiogénesis; y anticuerpos monoclonales, incluyendo Herceptin® contra el antígeno HER2; Avastin® 20 contra VEGF; o anticuerpos contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) tales como Erbitux® (cetuximab) y Vectibix® (panitumumab).

Los agentes adicionales para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson incluyen levodopa, benzaserida, 25 carbidopa, agonistas dopaminérgicos, agonistas dopaminérgicos no cariadados, inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa ("COMT") tal como, por ejemplo, entacopona o tolcopona, inhibidores de la monoamino oxidasa ("MAO"), tales como, por

ejemplo, rasagalina, amantadina o agentes anticolinérgicos

V. FORMULACIONES

Las composiciones farmacéuticas para administración
5 parenteral son preferiblemente estériles y sustancialmente
isotónicas y fabricadas bajo condiciones de GMP. Las
composiciones farmacéuticas pueden suministrarse en forma de
dosis unitaria (es decir, dosis de una sola administración).
Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas
10 utilizando uno o más portadores fisiológicamente aceptables,
diluyentes, excipientes o auxiliares. La formulación depende
de la vía de administración elegida. Para inyección, los
anticuerpos pueden ser formulados en soluciones acuosas,
preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles como
15 solución de Hank, solución de Ringer o solución salina
fisiológica o tampón de acetato (para reducir las molestias
en el sitio de inyección). La solución puede contener agentes
de formulación, tales como agentes de suspensión,
estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente los
20 anticuerpos pueden estar en forma liofilizada para
constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua
estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

La invención proporciona formulaciones que
comprenden un anticuerpo u otro antagonista aquí descrito, un
25 tampón, uno o más azúcares y/o polioles y un surfactante, y
tienen un pH dentro del rango de aproximadamente 5.5 a
aproximadamente 7. Las fórmulas pueden prepararse para su
almacenamiento en forma líquida o en forma liofilizada.

Cuando se almacenan en forma liofilizada, las formulaciones pueden ser reconstituidas con un líquido (por ejemplo, agua estéril) a las concentraciones y propiedades descritas en este documento. Cuando se dice que una composición liofilizada es reconstituible mediante la adición de agua para generar una formulación de concentraciones de componente y pH especificados, quiere decir que la formulación liofilizada puede ser reconstituida simplemente por la adición de agua (es decir, sin el suministro de cantidades adicionales de componentes o sin la adición de ácido o base para cambiar el pH). Las concentraciones y las propiedades de una formulación líquida pre-liofilizada también pueden ser según las descritas a continuación si la formulación liofilizada es reconstituida al mismo volumen que la formulación pre-liofilizada. Si el volumen es diferente, entonces las concentraciones de las formulaciones deben ajustarse proporcionalmente. Por ejemplo, si el volumen reconstituido es la mitad del volumen de pre-liofilización, las concentraciones de componentes en la formulación pre-liofilizada deben ser la mitad de las concentraciones en la formulación reconstituida.

Opcionalmente, el anticuerpo es resuspendido en una formulación como se describe a continuación, temporalmente congelado para su pre-liofilización en almacenamiento, liofilizado y reconstituido con agua para las mismas concentraciones que las de la pre-liofilización. Tal formulación preferiblemente debe estabilizar el anticuerpo a través de congelación, liofilización, almacenamiento y

reconstitución así como ser conveniente para administración parenteral. En un flujo de trabajo ejemplar, un anticuerpo purificado se resuspende en aproximadamente 40 mg/mL en una formulación y se almacena congelado a -40°C en bolsas. Las
5 bolsas son descongeladas a temperatura ambiente durante 3 horas y los contenidos son agrupados. La formulación es filtrada de manera estéril a través de un filtro estéril de 0.2 micrones. Las ampollitas son llenadas con 5.4 mL de la formulación y liofilizadas. Las ampollitas liofilizadas son
10 almacenadas a 2-8°C. Las ampollitas liofilizadas se reconstituyen al agregar agua estéril (por ejemplo, aproximadamente 5.0 a 5.4 mL de agua estéril, dependiendo de la formulación). Luego se agregan 5 mL del producto reconstituido en el puerto de una bolsa IV que contiene 20-
15 100 mL de solución salina normal, solución entibada de Ringers, o solución de dextrosa al 5% o similar para infusión intravenosa en un paciente.

Algunas formulaciones incluyen un agente de carga, que puede o no ser igual al componente de azúcar/poliol. Por
20 lo general, las formulaciones son estériles, por ejemplo, como se realiza por filtración estéril utilizando un filtro de 0.2 μm o de 0.22 μm . Las formulaciones también son generalmente estables por niveles bajos a indetectables de fragmentación y/o agregación como se describe a continuación
25 en congelación y descongelación. Todavía otras formulaciones son estables después de la reconstitución de una torta liofilizada durante al menos tres meses a aproximadamente 40°C. En algunas formulaciones, menos del 5% de anticuerpo

está presente como un agregado en la formulación.

En algunas formulaciones, el anticuerpo está presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 100 mg/mL. En

5 algunas formulaciones, el anticuerpo está presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL. En algunas formulaciones, el anticuerpo está presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 25 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL.

10 Por ejemplo, el anticuerpo puede estar presentes en una concentración de aproximadamente 35-45 mg/mL o aproximadamente 40 mg/mL. El anticuerpo puede estar presente en una forma de dosificación líquida estéril de aproximadamente 50 mg/ampolleta a aproximadamente 500
15 mg/ampolleta o más. El anticuerpo puede estar presente en una forma de dosificación liofilizada de aproximadamente 40 mg/ampolleta a aproximadamente 500 mg/ampolleta. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar presente en una forma de dosificación liofilizada o líquida estéril de aproximadamente
20 250-350 mg/ampolleta o aproximadamente 200 mg/ampolleta.

La formulación puede comprender cualquiera de los anticuerpos descritos. En algunas formulaciones, el anticuerpo formulado es un anticuerpo que comprende: (i) una
25 tres CDRs de Kabat de la SEQ ID NO:161 excepto que la posición 32 (numeración de Kabat) puede ser N, S o Q, y la posición 33 (numeración de Kabat) puede ser G o A, en donde la región variable madura de cadena pesada es por lo menos

90% idéntica a la SEQ ID NO:161, y (ii) una región variable
madura de cadena ligera que comprende tres CDRs de Kabat de
la SEQ ID NO:123, y siendo por lo menos 90% idéntica a la SEQ
ID NO:123. En dichas formulaciones, la posición 1 (numeración
5 de Kabat) de la región madura variable de cadena pesada puede
estar ocupada por E. En algunas formulaciones, la región
madura variable de cadena pesada tiene la secuencia de
aminoácidos de las SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:158, SEQ ID
NO:159, SEQ ID NO:160, o SEQ ID NO:161, y la región madura
10 variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos
de las SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122, o SEQ ID NO:123. Por
ejemplo, en algunas formulaciones, la región variable madura
de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ
ID NO: 161 y la región madura variable de cadena ligera tiene
15 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:123.

En otras formulaciones, el anticuerpo formulado es
un anticuerpo anti-MCAM aislado descrito en este documento.
En dicha formulación, el anticuerpo anti-MCAM aislado se une
a MCAM humano (SEQ ID NO: 11) en un epítipo que incluye el
20 residuo de aminoácido 141.

Los tampones se utilizan en las formulaciones
divulgadas para lograr un pH adecuado para el anticuerpo, tal
como, por ejemplo, tampones de histidina, succinato y
citrato. Algunas formulaciones tienen un pH dentro del rango
25 de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7, por ejemplo, un
pH de 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5,
6.6, 6.7, 6.8, 6.9, o 7.0. Algunas formulaciones tienen un pH
de entre aproximadamente 5.5 a aproximadamente 6.5. Algunas

formulaciones tienen un pH de aproximadamente 6.0 y otras formulaciones tienen un pH de aproximadamente 6.5. En algunas formulaciones, el tampón histidina está presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 10 mM a
5 aproximadamente 30 mM, por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 15-25 mM o de aproximadamente 20 mM.

Los azúcares y/o polialcoholes adecuados para las formulaciones incluyen trehalosa y sacarosa, o una combinación de las mismas. Los azúcares/polioles sirven como
10 agentes de carga, agente lipoprotector, y/o agentes de ajuste de tonicidad. Por ejemplo, algunas formulaciones incluyen trehalosa presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 260 mM o sacarosa presente en una concentración dentro del rango de
15 aproximadamente 200 mM a aproximadamente 260 mM. Algunas formulaciones incluyen trehalosa presente en una concentración de aproximadamente 220 mM. Otras formulaciones incluyen sacarosa presente en una concentración de aproximadamente 220 mM. Algunas de dichas formulaciones se
20 caracterizan por una osmolalidad en el rango de aproximadamente 250-400, 300-400, o 300-350 mOsm/kg, tal como, por ejemplo, 287 o 295 mOsm/kg.

Las formulaciones pueden contener un surfactante para reducir la agregación de anticuerpos y la absorción a
25 las superficies. Los surfactantes adecuados incluyen polisorbato 20 presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 0.005% a aproximadamente 0.05% por peso. El polisorbato 20 protege contra los aumentos marcados en la

agregación o turbidez que de lo contrario ocurriría en las formulaciones de anticuerpos. El polisorbato 20 puede estar presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 0.05%. Por ejemplo, la concentración puede ser 0.005%, 0.01%, 0.015%, 0.02%, 0.025%, 0.03%, 0.035%, 0.04%, 0.045%, o 0.05%. Por otra parte, en algunas formulaciones, el polisorbato 20 está presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente desde 0.05 g/L, 0.1 g/L, 0.15 g/L, 0.2 g/L, 0.25 g/L, 0.3 g/L, 0.35 g/L, 0.4 g/L, 0.45 g/L, o 0.5 g/L. Algunas formulaciones incluyen polisorbato 20 a una concentración de 0.2 g/L.

Una formulación ejemplar (líquida, pre-liofilizada o reconstituida después de la liofilización) se caracteriza por un pH dentro del rango de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7 e incluye: (a) un anticuerpo que se describe en este documento, a una concentración dentro del rango de desde aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL; (b) un tampón de histidina presente en una concentración dentro del rango de desde aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM; (c) uno o más azúcares y polioles ("azúcar/poliol") seleccionados de trehalosa presente en una concentración dentro del rango de desde aproximadamente 200 mM a aproximadamente 260 mM, y sacarosa presente en una concentración dentro del rango de desde aproximadamente 200 mM a aproximadamente 260 mM; y (d) polisorbato 20 presente en una concentración dentro del rango de desde aproximadamente 0.005% a aproximadamente 0.05% por peso. En un ejemplo, la

formulación puede incluir: (a) cualquier anticuerpo aquí descrito; (b) un tampón de histidina presente en una concentración de aproximadamente 20 mM; (c) sacarosa en una concentración de aproximadamente 220 mM; (d) polisorbato 20 en una concentración de aproximadamente 0.02%; y un pH de aproximadamente 6.0. En otro ejemplo, la formulación puede incluir: (a) cualquier anticuerpo aquí descrito; (b) un tampón de histidina presente en una concentración de aproximadamente 20 mM; (c) trehalosa en una concentración de aproximadamente 220 mM; (d) polisorbato 20 en una concentración de aproximadamente 0.02%; y un pH de aproximadamente 6.5.

Algunas formulaciones liofilizadas incluyen: (a) un anticuerpo aquí descrito; (b) tampón de histidina; (c) trehalosa o sacarosa; y (d) polisorbato 20. La formulación liofilizada puede incluir aproximadamente 200 mg de anticuerpo. Algunas formulaciones liofilizadas son capaces de ser reconstituida con agua estéril. Algunas formulaciones liofilizadas incluyen 100-300 o 150-250 mg de anticuerpo, 10 a 20 o 14 a 16 mg de histidina, 300 a 450 o 350 a 400 mg de sacarosa, y 0.5 a 1.5 mg o 0.75 a 1.25 mg de polisorbato 20. Otras formulaciones liofilizadas incluyen 100 a 300 o 150 a 250 mg de anticuerpo, 10 a 20 o 14 a 16 mg de histidina, 360 a 500 o 400 a 450 mg de dihidrato de trehalosa, y 0.5 a 1.5 mg o 0.75 a 1.25 mg de polisorbato 20.

Una formulación liofilizada ejemplar incluye 200 mg de un anticuerpo, 15.5 mg de histidina, 376 mg de sacarosa y 1 mg de polisorbato 20. Otra formulación liofilizada ejemplar

incluye 200 mg de un anticuerpo, 15.5 mg de histidina, 416 mg de dihidrato de trehalosa y 1 mg de polisorbato 20. Algunas de estas formulaciones pueden ser reconstituidas a un volumen de aproximadamente 5 mL. Otras formulaciones liofilizadas incluyen los mismos componentes en las mismas proporciones que cualquiera de las divulgadas en este párrafo, pero en diferentes cantidades (por ejemplo, 400 mg de anticuerpo, 31 mg de histidina, 752 mg de sacarosa y 2 mg de polisorbato 20).

Las formulaciones liofilizadas pueden ser reconstituídas a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 30-50 a 35-45 mg/mL, por ejemplo a aproximadamente 40 mg/mL; (b) un tampón de histidina presente a una concentración de aproximadamente 10-30 o 15-25 mM, por ejemplo aproximadamente 20 mM; (c) sacarosa o trehalosa presente a una concentración de aproximadamente 160-330 o 200-260 mM, por ejemplo aproximadamente 220 mM; (d) polisorbato 20 presente a una concentración de aproximadamente 0.1-0.3 o 0.15 a 0.25 g/L, por ejemplo aproximadamente 0.2 g/L; y (e) un pH de aproximadamente 5.5-6.5, por ejemplo aproximadamente 6.0 (si hay sacarosa presente) o 6.5 (si hay trehalosa presente).

Las formulaciones liofilizadas líquidas o reconstituidas son preferiblemente sustancialmente isotónicas, lo que implica una osmolalidad de aproximadamente 250-350 mOsm/kg de agua. Algunas formulaciones tienen una osmolalidad de 270-300 mOsm/kg. Algunas formulaciones tienen una osmolalidad de aproximadamente 287 o aproximadamente 295

mOsm/kg. Las formulaciones liofilizadas reconstituidas o líquidas también pueden ser hipertónicas >350 mOsm/kg de agua o hipotónicas (<250 mOsm/kg de agua).

Ninguna de las formulaciones descritas pueden
5 hacerse sin excipientes farmacéuticos, portadores o similares, distintos a los descritos como componentes en este documento. Tal formulación puede describirse como que consiste de los componentes citados, o que consiste esencialmente de los componentes citados si están presentes
10 cantidades insignificantes de otros componentes que no afectan las propiedades de la formulación. Las formulaciones se hacen preferiblemente bajo buenas prácticas de manufactura (GMP) aprobadas o que puedan ser aprobadas por la FDA para la preparación de fármacos para administración a los seres
15 humanos.

La presente invención abarca formulaciones de anticuerpos que tienen estabilidad a 38°C-42°C (por ejemplo, según lo determinado por cromatografía de exclusión de tamaño de alto rendimiento (HPSEC)) durante al menos aproximadamente
20 30 días, durante al menos aproximadamente 3 meses, o más. Dichas formulaciones también pueden tener estabilidad a 20°C-24°C durante al menos aproximadamente 1 año, y/o estabilidad a 2°C-4°C durante al menos aproximadamente 3 años. La estabilidad de las formulaciones liofilizadas se evalúa para
25 el almacenamiento en el estado liofilizado. Una formulación se considera estable si, después de incubación a una o más de estas combinaciones específicas de tiempo y temperatura, cumple con la siguiente definición para fragmentación baja a

indetectable y/o agregación baja a indetectable. Más particularmente, las formulaciones divulgadas muestran niveles bajos a indetectables de agregación y/o fragmentación de anticuerpos o un aumento bajo o indetectable de fragmentación y/o agregación superior a un nivel inicial (por ejemplo, menos de aproximadamente 5% de agregación). Una formulación que tiene niveles bajos a indetectables de fragmentación contiene por lo menos aproximadamente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de proteína total, por ejemplo, en un solo pico tal como se determine por cromatografía de interacción hidrofóbica, o en dos picos (uno correspondiente a cada una de las cadenas pesadas de anticuerpo y las cadenas ligeras de anticuerpo) mediante Electróforesis Capilar en Gel (rCGE), que representa el anticuerpo no degradado, y que no contiene otros picos solos que tengan más del 5%, más del 4%, más del 3%, más del 2%, más del 1%, o más del 0.5% de proteína total cada uno. Una formulación que tiene niveles bajos a indetectables de agregación contiene no más de aproximadamente 15%, no más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 4%, no más de aproximadamente 3%, no más de aproximadamente 2%, no más de aproximadamente 1%, o no más de aproximadamente 0.5% de agregación por peso de proteína, tal como se mida por cromatografía de exclusión de tamaño de alto rendimiento (HPSEC). Por ejemplo, en algunas formulaciones, menos de aproximadamente 5% de los anticuerpos está presente como un agregado. Las formulaciones estables también muestran poca o nada de pérdida de actividad(es) biológica(s) con, por

ejemplo, afinidad de unión medible por ELISAs y/o ensayo de funcionalidad adicional, que es de por lo menos aproximadamente 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de un valor medible inicial.

5

VI. KITS

La invención proporciona además kits (por ejemplo, contenedores) que comprenden los anticuerpos de MCAM u otros antagonistas aquí divulgados y materiales relacionados, tales como instrucciones de uso (por ejemplo, inserción en el paquete). Las instrucciones de uso pueden contener, por ejemplo, instrucciones para la administración de los antagonistas de MCAM y opcionalmente uno o más agentes adicionales. Los contenedores del (los) antagonista(s) de MCAM pueden ser dosis unitarias, paquetes a granel (por ejemplo, paquetes de dosis múltiples) o dosis sub-unitarias.

Inserción en el paquete se refiere a instrucciones que se incluyen habitualmente en paquetes comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos

Los kits también pueden incluir un segundo contenedor que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina con tampón de fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También pueden incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del

usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Todas las presentaciones de patentes, sitios Web, otras publicaciones, números de acceso y similares citados
5 anteriormente o enseguida se incorporan por referencia en su totalidad para todos los fines en la misma medida como si cada uno de ellos de manera individual se indicara específica e individualmente como incorporados por referencia. Si diferentes versiones de una secuencia están asociados con un
10 número de acceso en diferentes momentos, la versión asociada con el número de acceso en la fecha de presentación efectiva de esta solicitud es el correcto. La fecha de presentación efectiva significa la mayor anticipación de la fecha de presentación real o la fecha de presentación de una solicitud
15 de prioridad que se refiera al número de acceso, en su caso. Asimismo si se publican diferentes versiones de una publicación, sitio Web o similares en diferentes momentos, la versión más recientemente publicada a la fecha de presentación efectiva de la solicitud es la correcta a menos
20 que se indique lo contrario. Cualquier característica, paso, elemento, modalidad o aspecto de la invención puede utilizarse en combinación con cualesquier otros a menos que se indique específicamente lo contrario. Si bien la presente invención se ha descrito con cierto grado de detalle a modo
25 de ilustración y ejemplo para fines de claridad y de comprensión, será evidente que se pueden practicar ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS:**Materiales y Métodos***Generación/caracterización de Anticuerpos*

5 Para la generación de anticuerpos capaces de unirse
a MCAM murino, se generó MCAM-Fc por fusión del dominio
extracelular de MCAM murino a IgG humano y producido en
células CHO usando las técnicas estándar. Ratas Lou/M fueron
inmunizadas con 100 µg de proteína de MCAM-Fc en CFA (volumen
10 1:1). Las ratas fueron aumentadas dos veces en intervalos de
dos semanas con proteína de MCAM-Fc en adyuvante de Freund
incompleto (IFA) (volumen 1:1). Se generaron hibridomas de
ratas inmunizadas con protocolos estándar y los clones fueron
seleccionados por Clonepix. Las células CHO fueron
15 transfectadas con el gen murino de MCAM de longitud completas
y seleccionadas para expresión estable utilizando neomicina y
técnicas estándar. Las células CHO parentales (MCAM negativo)
fueron marcadas con fluorescencia con éster de succinimidil
carboxifluoresceína (CFSE) utilizando técnicas estándar y se
20 mezclaron en una proporción de 1:1 con células CHO
transfectadas con MCAM sin etiqueta. Los sobrenadantes de
hibridoma se incubaron con esta mezcla de células durante 30
minutos y se detectó la unión de anticuerpos específicos de
MCAM potenciales con un anticuerpo secundario anti-rata
25 marcado con fluorescencia (Jackson Immuno) mediante
citometría de flujo.

Los sobrenadantes de hibridomas que dieron positivo
para los anticuerpos específicos de MCAM fueron previamente

incubados con proteína de ratón fluorescente etiquetada MCAM-Fc (5 µg/mL) durante 30 minutos antes de que se añadieran a la laminina $\alpha 4$ que expresa la línea celular WM2664 y se determinó la neutralización de la unión de la proteína MCAM-Fc a la línea celular mediante citometría de flujo.

Para la generación de anticuerpos de rata capaces de unirse a MCAM humano, se generó hMCAM-Fc por fusión del dominio extracelular de MCAM humano a IgG humano y producido en células CHO usando las técnicas estándar. Ratas Lou/M fueron inmunizadas con 250 µg de proteína de hMCAM-Fc en CFA (volumen 1:1). Las ratas fueron aumentadas dos veces en intervalos de dos semanas con proteína de hMCAM-Fc en adyuvante de Freund incompleto (IFA) (volumen 1:1). Se generaron hibridomas de ratas inmunizadas con protocolos estándar y los clones fueron seleccionados por Clonепix. Las células CHO fueron transfectadas con el gen humano de MCAM de longitud completas y seleccionadas para expresión estable utilizando neomicina y técnicas estándar. Las células CHO parentales (MCAM negativo) fueron marcadas con fluorescencia con éster de succinimidil carboxifluoresceína (CFSE) utilizando técnicas estándar y se mezclaron en una proporción de 1:1 con células CHO transfectadas con MCAM humano sin etiqueta. Los sobrenadantes de hibridoma se incubaron con esta mezcla de células durante 30 minutos y se detectó la unión de anticuerpos específicos de MCAM humano potenciales con un anticuerpo secundario anti-rata marcado con fluorescencia (Jackson Immuno) mediante citometría de flujo.

Para la generación de anticuerpos de ratón capaces

de unirse a MCAM humano, se generó hMCAM-Fc por fusión del dominio extracelular de MCAM humano a IgG humano y producido en células CHO usando las técnicas estándar. Ratones Balb/c fueron inmunizados con 50 µg de proteína de hMCAM-Fc en CFA (volumen 1:1). Los ratones fueron aumentados dos veces en intervalos de dos semanas con proteína de hMCAM-Fc en adyuvante de Freund incompleto (IFA) (volumen 1:1). Se generaron hibridomas de ratones inmunizados con protocolos estándar y los clones fueron seleccionados por Clonepix. Las células CHO fueron transfectadas con el gen humano de MCAM de longitud completas y seleccionadas para expresión estable utilizando neomicina y técnicas estándar. Las células CHO parentales (MCAM negativo) fueron marcadas con fluorescencia con éster de succinimidil carboxifluoresceína (CFSE) utilizando técnicas estándar y se mezclaron en una proporción de 1:1 con células CHO transfectadas con MCAM humano sin etiqueta. Los sobrenadantes de hibridoma se incubaron con esta mezcla de células durante 30 minutos y se detectó la unión de anticuerpos específicos de MCAM humano potenciales con un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con fluorescencia (Jackson Immuno) mediante citometría de flujo.

Los sobrenadantes de hibridomas que dieron positivo para los anticuerpos específicos de MCAM humano fueron previamente incubados con proteína fluorescente etiquetada hMCAM-Fc (5 µg/mL) durante 30 minutos antes de que se añadieran a la laminina $\alpha 4$ que expresa la línea celular WM2664 y se determinó la neutralización de la unión de la proteína hMCAM-Fc a la línea celular mediante citometría de

flujo.

Manipulación de proteínas y Ácido Nucleico

Para la determinación de los CDRs, el ARN total se
 5 aisló de las células de hibridoma utilizando el kit RNAqueous-
 4PCR (Ambion), y se utilizó para la síntesis de ADNc. El ADNc
 de primera y segunda hebra fue sintetizado utilizando métodos
 modificados de amplificación de ADNc *Marathon* (Clontech) con
 el adaptador de ADNc ligado al extremo 5' del ADNdsc
 10 obtenido. El cebador inverso específico fue diseñado en base
 a la secuencia de región constante de isotipo de anticuerpo
 específico para las cadenas ligeras y pesadas y fue utilizado
 junto con el cebador de adaptador en la amplificación de PCR
 de los fragmentos de VL y VH, utilizando la polimerasa de ADN
 15 Pfu Ultra (Stratagene). El producto de PCR amplificado fue
 clonado en pCR-Blunt-TOPO (Invitrogen) y se determinó la
 secuencia de nucleótidos. Se compararon las secuencias de los
 clones identificados para identidad porcentual dentro de las
 secuencias de VL y VH.

20 Para la determinación de las concentraciones de IL-
 17 en el sobrenadante, se realizó ELISA mediante un kit
 comercial (R&D Systems).

Ejemplo 1. Generación de anticuerpos monoclonales anti-MCAM

25 Anticuerpos monoclonales de ratón y rata dirigidos
 contra proteína de MCAM humano fueron generados como se
 describe en la sección anterior de Materiales y Métodos. La
 unión específica entre el anticuerpo monoclonal y el MCAM

humano fue confirmada mediante la evaluación de la capacidad de anticuerpo monoclonal para unirse a las células transfectadas con MCAM humano. Para este fin, las células no transfectadas fueron etiquetadas con éster de succinimidil carboxifluoresceína (CFSE) y mezcladas con células transfectadas de MCAM humano sin etiquetar. Por lo tanto, podrían diferenciarse las células no transfectadas.

Utilizando estas técnicas, 823 fusiones independientes de clones de ratón fueron aislados y mostraron expresión de un anticuerpo capaz de unirse a MCAM humano. Adicionalmente, 152 fusiones independientes de clones de rata fueron aislados y mostraron expresión de un anticuerpo capaz de unirse a MCAM humano.

Después, los anticuerpos anti-humanos monoclonales de MCAM anti-humano se utilizaron para probar su capacidad de bloquear la unión de MCAM humano a su ligando. La proteína humana de MCAM-Fc (5 µg/mL) fue previamente incubada con el anticuerpo de control de isotipo, o 10 µg/mL de anticuerpo monoclonal probado durante 30 minutos en PBS. La mezcla se añadió a las secciones de tejido sano de la médula espinal y posteriormente caracterizada por microscopía de fluorescencia, tal como se describe en la sección anterior de Materiales y Métodos. Además, las células CHO parentales (CHOK1) o las células CHO transfectadas con un gen MCAM humano se preincubaron con medio de cultivo de CHO (DMEM), laminina 411 recombinante (10 µg/ml), o laminina 511 recombinante (es decir laminina 10 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$)) (10 µg/ml) a 37°C durante 45 minutos. Las células fueron lavadas, y la

unión específica de laminina 411, pero no de laminina 511, a MCAM se detectó con un anticuerpo de pan-laminina por citometría de flujo. La preincubación de células CHO transfectadas con MCAM humano con el anticuerpo anti-MCAM (a 20 µg/ml), antes de la incubación de laminina, suprimió la unión de MCAM humano a laminina 411.

Utilizando esta técnica, se demostró que 87 de los 823 clones de fusión de ratón independientes y 26 y de los 152 clones de fusión de ratón independientes descritos anteriormente expresaron un anticuerpo que era capaz de bloquear la interacción entre la proteína de MCAM humano y su ligando, cadena α -4 de laminina.

Ejemplo 2. Caracterización adicional de anticuerpos monoclonales anti-MCAM

Los 87 clones de fusión de ratón independientes y los 26 clones de fusión de rata independientes descritos en el Ejemplo 1 anterior como capaces de (i) unirse a MCAM humano y (ii) bloquear la interacción entre MCAM humano y la cadena α -4 de laminina se caracterizan de la siguiente manera. En primer lugar, la cuantificación de IC50 para la capacidad de anticuerpo monoclonal para bloquear la unión de MCAM humano a la cadena α -4 de la laminina se determinó como sigue. Las células CHO que expresan MCAM humano fueron incubadas con un anticuerpo MCAM anti-humano (a diferentes concentraciones) durante 30 minutos a 4 grados centígrados. El anticuerpo no unido fue después lavado, y las células se incubaron con laminina 411 humana recombinante a 20 ug/ml

durante 45 minutos a 37 grados centígrados. La laminina no unida se lavó, y la laminina unida a la superficie celular se detectó con anticuerpos anti-laminina marcados con fluorescencia. Después del lavado, la cantidad de laminina unida a la superficie fue detectada por citometría de flujo, y las IC50s se calcularon en base a la intensidad fluorescente media.

Utilizando el ensayo descrito anteriormente, seis clones de anticuerpo monoclonal de MCAM anti-humano independientes fueron identificados como unidos a MCAM humano y como que tienen la mayor capacidad para bloquear la interacción entre MCAM humano expresado en la superficie celular y su ligando de unión, laminina 411 humana. Estos seis clones de anticuerpos monoclonales anti-MCAM se refieren en este documento como (i) los clones de anti-cuerpo monoclonal de MCAM de ratón 1174.1.3, 1414.1.2, 1415.1.1, y 1749.1.3, y (ii) los clones de anticuerpo monoclonal de MCAM anti-humano de rata 2120.4.19 y 2107.4.10. Los aminoácidos y las secuencias de ácidos nucleicos de las cadenas pesadas y ligeras de estos anticuerpos y sus regiones hipervariables, se proporcionan en las SEQ ID NOs: 29-92. Más específicamente, en el ensayo anterior, las IC50s para los clones de anticuerpo monoclonal 1174.1.3, 1414.1.2, 1415.1.1, 1749.1.3, 2120.4.19, y 2107.4.10 se determinaron de 0.469 ug/ml, 0.431 ug/ml, 0.307 ug/ml, 0.545 ug/ml, 0.888 ug/ml, y 0.290 ug/ml, respectivamente. Por otra parte, los experimentos realizados para determinar la afinidad de unión específica de cada anticuerpo monoclonal demostraron que cada

uno era capaz de unirse a la proteína de MCAM humano con alta afinidad (datos no mostrados). Como tal, cada uno de estos anticuerpos monoclonales específicos fue muy capaz de unirse a MCAM humano e inhibir la interacción de MCAM humano expresado en células con su ligando de unión laminina α -4. En contraste, dos anticuerpos de control, un anticuerpo de IgG1 humano no específico y un anticuerpo anti-MCAM totalmente humano previamente descrito, denominado ABX-MA1 (por ejemplo, ver Mills et al., *Cancer Res.* 62:5106 (2002), y las patentes estadounidenses Nos. 6,924,360, 7,067,131, y 7,090,844) fueron incapaces de bloquear la interacción de unión entre el MCAM humano y su contraparte de laminina 411. Como tal, los seis anticuerpos monoclonales específicos mencionados anteriormente poseen la novedosa capacidad de (i) unirse con alta afinidad a MCAM humano en la superficie de las células vivas, y (ii) bloquear la interacción de MCAM humano expresado en las células con una proteína de laminina que comprende una cadena α -4 de polipéptido de laminina.

Ejemplo 3. Análisis de unión a dominio para anticuerpos monoclonales anti-MCAM

Se utilizó análisis ForteBio para determinar la ubicación del epítipo del antígeno de la proteína de MCAM humano que es reconocido y unido por los clones de anticuerpo monoclonal 1174.1.3, 1414.1.2, 1415.1.1, 1749.1.3, 2120.4.19, y 2107.4.10. Se utilizó el siguiente protocolo: Los biosensores de Fc de IgG anti-humanos ForteBio fueron utilizados para inmovilizar varios dominios de MCAMhFc

incluyendo proteína de MCAMhFc de longitud total en la superficie del biosensor. Estos sensores se sumergieron en el anticuerpo específico de MCAM 1174.1.3, 1414.1.2, 1415.1.1, 1749.1.3, 2120.4.19, o 2107.4.10 para la detección de unión a estos dominios o proteínas de longitud total. Después de cargar estas muestras en una placa negra de 96 pocillos, el Rojo Octeto fue programado como sigue: 60 segundos para la línea de referencia #1; 180 segundos para la carga de diversos dominios; 60 segundos para la línea de referencia #2; 180 segundos para la asociación de anticuerpo al dominio; y 240 segundos para la disociación de anticuerpos del dominio.

Reactivos e insumos utilizados:

1. Concentración final de MCAMhFc a 5 ug/ml
2. clones de anticuerpos 1174.1.3, 1414.1.2, 1415.1.1, 1749.1.3, 2120.4.19, y clones 2107.4.10 a 5 ug/ml
3. Captación de Biosensores de IgG de Fc anti-humanos (AHC) ForteBio para experimentos de cinética, No. de catálogo 18-5060
4. Placa negra de 96 pocillos de Greiner Bio-one, No. de catálogo 655209
5. Máquina ForteBio Rojo Octeto
6. Medio de cultivo de tejido fresco, DMEM con 20% de FCS, se utilizó como tampón para dilución

Los resultados de estos análisis son los siguientes.

Los clones de anticuerpo monoclonal 1174.1.3,

1414.1.2, 1415.1.1, y 1749.1.3 demostraron unirse a un epítipo antigénico encontrado en el dominio 3 de la proteína de MCAM humano, definida específicamente por los aminoácidos 244-321 (SEQ ID NO:24) de la proteína de MCAM humano. Estos anticuerpos monoclonales no fueron capaces de unirse a un dominio de MCAM humano 1 (es decir, aminoácidos 19-129, SEQ ID NO: 22), dominio 2 (es decir, aminoácidos 139-242, SEQ ID NO: 23), o la combinación de los dominios 1 y 2 (es decir, aminoácidos 19-242). Por lo tanto, los clones de anticuerpo monoclonal 1174.1.3, 1414.1.2, 1415.1.1 y 1749.1.3 definen un novedoso epítipo antigénico situado dentro del dominio 3 de la proteína de MCAM humano.

Los clones de anticuerpo monoclonal 2120.4.19 y 2107.4.10 mostraron cada uno unión a un epítipo antigénico definido por la combinación del dominio de MCAM humano 1 (es decir, aminoácidos 19-129, SEQ ID NO: 22) y dominio 2 (es decir, aminoácidos 139-242, SEQ ID NO: 23). Ninguno de estos dos anticuerpos monoclonales se unió al dominio de MCAM humano 1 por sí mismo. Por lo tanto, los clones de anticuerpo monoclonal 2120.4.19 y 2107.4.10 definen un novedoso epítipo antigénico determinado por la presencia de ambos dominios de proteína de MCAM humano 1 y 2.

En contraste con lo anterior, el anticuerpo anti-MCAM totalmente humano descrito, ABX-MA1, se une a un epítipo antigénico diferente de los descritos anteriormente, es decir, un epítipo antigénico que está completamente definido y englobado dentro del dominio de MCAM humano 1 solamente.

Dados estos resultados, debido a que cada uno de

los clones de anticuerpo monoclonal 1174.1.3, 1414.1.2, 1415.1.1, 1749.1.3, 2120.4.19, y 2107.4.10 son capaces de (i) unirse al MCAM humano, y (ii) bloquear la interacción entre MCAM humano y la proteína que contiene laminina α -4, mientras que el anticuerpo ABX-MA1 es capaz de unirse sólo al MCAM humano, pero no de bloquear la interacción entre el MCAM humano y una proteína que contiene laminina α -4, estos resultados demuestran que el dominio de MCAM humano 2, el dominio de MCAM humano 3, y la combinación de los mismos, juega un papel en la interacción de unión con la cadena de laminina α -4. Ante esto, es claro que los anticuerpos que se unen al dominio de MCAM humano 2, dominio de MCAM humano 3, y/o la combinación de los mismos encontrarían uso como agentes capaces de bloquear la interacción entre MCAM humano y laminina α -4 y, por lo tanto, encuentran uso para inhibir las diversas consecuencias descritas en este documento resultantes de esa interacción. En cambio, los anticuerpos que se unen a un epítipo antigénico definido únicamente por el dominio de MCAM humano 1 (como el anticuerpo de ABX-MA1 descrito) no son útiles para bloquear la interacción de MCAM/ α -4 laminina y sus varias consecuencias biológicas descendentes.

Ejemplo 4. Mapeo de Epítipo de Mutagénesis de Disparo

Se identificaron varios residuos de aminoácidos de interés para la unión a anticuerpos anti-MCAM utilizando tecnología de mutagénesis de disparo y expresión celular de alto rendimiento que permite la expresión y análisis de

grandes bibliotecas de proteínas objetivo mutadas dentro de las células eucariotas. Cada residuo en la proteína de MCAM humano se mutó individualmente a una alanina, o algún otro residuo especificado, para ensayar los cambios en función.

5 Las proteínas se expresaron en líneas de células de mamíferos estándar.

La Tabla 1 muestra un resumen de los reactivos y métodos utilizados para generar la biblioteca de disparo de mutagénesis.

10

Tabla 1

Plásmido parental	hsMCAM-V5/HIS6 (Acceso # NP 006491)
Tamaño final de biblioteca	528 clones mutantes más 17 mutantes dirigidos al sitio adicionales
Estrategia de Mutación	Mutagénesis de Barrido de Alanina
Tipo de célula	BHK-S
Etiqueta de epítipo	V5/HIS6 de C-terminal

15

MCAM humano de longitud total fue optimizado con éxito en el codón, sintetizado y subclonado en un vector mamífero de alta expresión. Esta construcción parental fue entonces sometida a verificación de secuencia y validada para la expresión de células de mamífero por métodos de inmunodetección.

20

La detección de anticuerpo 2120.4.19 y suero de ratón que se une a MCAM por inmunofluorescencia fue optimizada con éxito para el formato de disparo de de de alto rendimiento. Las diluciones seriadas de cada anticuerpo primario fueron probadas con una sola dilución de anticuerpo secundario en formato de 384 pocillos. Los anticuerpos se probaron para detección de células 293T y BHK que expresan

25

MCAM humano. Se seleccionaron las condiciones de ensayo óptimas para la detección de la biblioteca de mutación completa.

Se creó la biblioteca de mutación de MCAM y se
5 verificó la secuencia, que consiste de 545 clones (528/536
mutantes de alanina y 17/17 mutantes dirigidos al sitio),
cada cojinete una sustitución simple residuo de alanina
(alanine se sustituyen los residuos de serina) o un
determinado residuo. Los residuos 35, 66, 161, 261, 342, 380,
10 414 y 435 no están representados en la biblioteca. La
biblioteca de mutación fue seleccionada por triplicado por
inmunodetección para unión al suero de ratón. Esto valida la
expresión de superficie celular para cada clon mutante.

Se realizaron múltiples rondas de optimización para
15 determinar las condiciones que son adecuadas para el mapeo.
Se evaluaron las siguientes variables: concentraciones
múltiples de laminina y concentraciones de anticuerpo
secundario anti-laminina, varios tampones de bloqueo para
reducir la unión no específica, múltiples tipos de células y
20 múltiples pasos de lavado.

La biblioteca de mutación fue seleccionada por
triplicado por inmunodetección para unión al anticuerpo
2120.4.19. La reactividad se cuantificó para cada mutante
para identificar mutantes de punto que presentan pérdida de
25 unión.

El anticuerpo monoclonal y la reactividad sérica
fue cuantificada para cada clon mutante para identificar
mutantes de punto que muestran pérdida de unión sin afectar

la expresión superficial. Los residuos críticos para cada anticuerpo fueron identificados por comparación del perfil de unión de anticuerpo monoclonal al perfil de unión sérico de cada clon mutante.

5 Las células de BHK fueron transfectadas con MCAM silvestre (WT) o vector solo en un formato de 384 pocillos, seguido de inmunodetección. Las diluciones seriadas de cada anticuerpo (comenzando con 4 µg/ml) fueron probadas para inmunoreactividad contra WT o vector solo (Tabla 2). Cada
10 punto representa el promedio de cuatro replicados.

Tabla 2

Conc.	MAb 2120.4.19		Suero Ms		Conc.	De
	Primaria	de	SB	Z	Suero	Ms
4.00			11.48	0.54	6.49	0.19
2.00			22.92	0.56	7.69	0.53
1.00			32.46	0.63	8.32	0.74
0.50			36.87	0.43	7.91	0.55
0.25			36.99	0.41	11.65	0.50
0.13			25.72	0.66	16.29	0.50
0.06			15.79	0.67	10.87	0.54
0.03			8.47	0.62	10.22	0.39
0.02			4.95	0.65	7.29	-0.19
0.00			0.96	-4.87	1.77	-5.95

20 Se determinaron las condiciones de selección óptimas para la inmunodetección y el mapeo de epítipo de 2120.4.19 y suero Ms. Con estas condiciones, cada anticuerpo demostró una señal robusta, altos valores de señal alta a
25 fondo y baja variabilidad entre los replicados. Estos datos indican que estas condiciones son adecuadas para un mapeo de epítipo de alto rendimiento exitoso. Se utilizaron concentraciones de detección final de 0.25 µg/mL para

2120.4.19 y una dilución de 1: 800 para el suero Ms. Se utilizaron anticuerpos secundarios de *Jackson ImmunoResearch* a 1:400 para la detección de 2120.4.19 y de suero. La Tabla 3 muestra los parámetros experimentales optimizados para inmunodetección de alto rendimiento.

Tabla 3

Parámetro Experimental	MAB 2120.4.19	Suero Ms
Tampón de Bloqueo de Fijación Celular	BHK-S 4% PFA 10% Suero de Cabra	BHK-S 4% PFA 10% Suero de Cabra
Ab Primario Nombre Ab Objetivo Conc. Óptima Incubación (TA)	2120.4 MCAM 0.25 ug/ml 60 min	Suero MCAM Dilución 1:800 60 min
Ab Secundario Objetivo Incubación Óptima Incubación Fabricante No. de Cat ID de Anticuerpo	Rat IgG 1:400 (3.75 ug/ m L) 30 min Jackson/ImmunoResearch 112-545-003 Alexa Fluor® 488-AffiniPure IgG de Cabra Anti-Rata (H+L)	IgG de Ratón 1:400 (3.75 ug/ ml) 30 min Jackson/ImmunoResearch 115-545-003 Alexa Fluor® 488-AffiniPure IgG de Cabra Anti-Ratón (H+L)
Lavados Señal:Fondo	PBS (CA ²⁺ ,Mg ²⁺ libre) 36:1	PBS (CA ²⁺ ,Mg ²⁺ libre) 8:1

La biblioteca de mutación fue ensayada para expresión superficial (unión a suero de ratón) y unión a anticuerpo monoclonal, por triplicado. Cada punto de datos en bruto fue restado del fondo y normalizado a los valores de reactividad de MCAM silvestre. Los resultados se muestran en la Figura 1. El valor medio de unión a anticuerpo monoclonal de 2120.4.19 se traza en función de su valor de expresión superficial medio (Figura 1, diamantes grises). Los umbrales de <30% de reactividad de anticuerpo monoclonal y >50% de unión de suero de ratón se aplicaron para identificar los

clones (Figura 1, diamantes negros) que fueron negativos para unión a anticuerpo monoclonal pero positivos para expresión superficial.

Los residuos críticos para 2120.4.19 fueron identificados mediante la evaluación de la reactividad media de anticuerpo monoclonal de cada clon en comparación con su expresión superficial total (reactividad sérica promedio) (Tabla 4). Los residuos implicados en la unión a anticuerpos fueron identificados como los que fueron negativos para la unión a anticuerpo monoclonal (<30% WT) pero positivos para expresión superficial (>50% WT). La reactividad media (y desviación estándar) se muestran para cada residuo crítico.

Tabla 4

ID de Residuo	Mutaciones	MAB 2120.4	Suero Ms
39	E39A	22.6 (16.2)	86.8 (9.2)
62	W62A	7.1 (4.7)	86.8 (12.6)
133	Y133A	26.4 (3.2)	94.6 (17.2)
141	I141A	16.8 (4)	117.4 (20.9)
159	A159S	23.9 (7.4)	97 (1.5)
212	L212A	23.7 (3.4)	89.9 (33.1)
220	Q220A	22.5 (10.9)	81.9 (36.1)
221	F221A	3.7 (0.6)	75.1 (65.2)
223	C223A	7.2 (2.5)	80.7 (25.6)
227	Y227A	12.3 (6.5)	107.3 (36.4)
238	S238A	28.9 (18.3)	84.4 (28.5)
241	V241A	24.4 (20.1)	55.1 (22.7)
392	L392A	18.3 (2.1)	64.3 (10.8)
Residuos Potencialmente Críticos			
145	P145A	26.3 (6.7)	28.3 (4)
167	Y167A	14.3 (6.1)	27.5 (18.6)
175	Y175A	7.7 (8.1)	49.1 (5.9)
206	S206A	17.9 (2.7)	33.5 (13)
207	I207A	23.6 (6.2)	42.8 (26.8)
216	D216A	8.2 (2.7)	38.4 (19.5)
225	L225A	23.8 (17)	34.8 (1.9)

Los aminoácidos críticos identificados por mapeo de
 5 mutagénesis de disparo sugieren sitios de unión para el
 anticuerpo 2120.4.19. Los datos indican que 2120.4.19 se une
 a un epítipo de comple conformacional, mientras que se unin
 principalmente al segundo dominio de Ig.

Los residuos críticos aparecen en gran parte
 10 dependientes de la estabilización estructural aportada por
 enlaces disulfuro del segundo y/o tercer dominio de Ig. La
 unión para 2120.4.19 está soportada por un grupo de residuos
 críticos que incluyen una o ambas de las cisteínas unidas a
 disulfuro 161 y 223 del segundo dominio de Ig.

15

Ejemplo 5. Mapeo Confirmatorio de Epítipo de MCAM para Unión a Anticuerpo y a Laminina

Con el fin de identificar los sitios de unión de
 2120.4.19 en MCAM humano, un modelo de homología de Ig1 y Ig2
 20 de MCAM humano se construyó en modelo de Ig1 y Ig2 de BCAM
 utilizando Schrodinger Maestro (Figura 2A). Veinte mutantes
 de punto basados en la información de estructura y
 mutagénesis de disparo fueron diseñados y generados. Estos
 mutantes se desplegaron en células de mamífero y se utilizó
 25 FACS para probar la unión de 2120.4.19 y de laminina α -4 a
 los mutantes de MCAM. Tres mutantes únicos de MCAM, I141A,
 D216A y Y318A, demostraron una pérdida completa de unión a
 laminina α -4. I141A demostró pérdida completa de unión a

2120.4.19 y P145V demostró pérdida significativa de unión a 2120.4.19.

Para confirmar aún más los datos, se obtuvieron líneas celulares estables que expresan I141A, P145V, D216A y Y318A respectivamente. Se realizaron análisis de ForteBio con las proteínas purificadas como se describió anteriormente. El anticuerpo de control ABX-MA1 se unió a los mutantes MCAM salvaje y MCAM. 2120.4.19 no demostró unión significativa al mutante MCAM I141A. Además, 2120.4.19 demostró unión grandemente reducida al mutante de MCAM P145V y D216A, respectivamente. También, la unión de 2120.4.19 al mutante de MCAM P145V demostró una rápida caída.

Ejemplo 6. Generación de Anticuerpos anti-MCAM 2120 Humanizados

Se generaron varios anticuerpos anti-MCAM humanizados según el siguiente protocolo. En primer lugar, un modelo molecular tridimensional de las regiones variables se construyó utilizando algoritmo propiedad de *JN Biosciences*. En segundo lugar, los residuos del aminoácido de marco importantes para la formación de la estructura de CDR o necesarios para la unión al antígeno se identificaron mediante el modelo molecular. Paralelamente, las secuencias de aminoácidos VH y VL humano derivado de ADNc con alta homología a las secuencias de aminoácidos VH y VL, respectivamente, se seleccionaron. Por último, las secuencias de CDR junto con residuos de aminoácidos de marco importantes para la estructura de CDR o unión a antígeno se injertaron de

VH y VL en las correspondientes secuencias de marco humano seleccionadas.

La Figura 3 ilustra la alineación de varias secuencias de cadena pesada y ligera de 2120. La numeración de residuos es de acuerdo a la numeración de Kabat. Diferentes mutaciones a los residuos de aminoácidos de marco (FR) implicados en la formación de CDR y la unión a antígeno se identificaron dependiendo del aversión de anticuerpo.

Mutaciones ejemplares de los anticuerpos de 2120 están representadas en la Figura 3A (residuos en recuadro en CDR-H1 (S30T), entre CDR-H1 y CDR-H2 (I37V y L48I), y entre CDR-H2 y CDR-H3 (K71R) afectan el contacto con CDR; y las mutaciones de S30T, I37V, L48I y K71R combinadas con una mutación adicional después de CDR-H2 (T68S) afectan el contacto con CDR); y la Figura 3B (residuos en recuadro entre CDR-L1 y CDR-L2 (L46V e Y49F) y entre CDR-L2 y CDR-L3 (V58I) afectan el contacto con CDR; los residuos en recuadro entre CDR-L1 y CDR-L2 (L46V e Y49F) afectan el contacto con CDR; y las mutaciones L46V, Y49F y V58I combinadas con mutación adicional antes de CDR-L1 (T22N) afectan la interacción anticuerpo/antígeno).

Varias versiones de cada cadena fueron diseñadas (estándar frente a agresiva o conservadora). Para los anticuerpos que contienen motivos de N-desamidación (NG), las mutaciones a la asparagina o glicina fueron introducidas en la versión estándar. Las diversas regiones V humanizadas fueron sintetizadas con una secuencia señal heteróloga y clonadas en vectores de expresión que contienen CK humano

(VL) o IgG1 humano (VH).

Los plásmidos de cadena pesada y ligera se co-transfectaron en las células 293F con el reactivo de transfección de FreeStyle™ MAX (Invitrogen) según protocolo del fabricante. El anticuerpo expresado fue purificado con columnas de proteína A PhyTip (Phynexus) y cuantificados a través de OD280.

Las afinidades aparentes de los anticuerpos humanizados se comparó con el anticuerpo de roedor parental o quimérico en un ELISA competitivo según el siguiente protocolo.

Las placas de ELISA fueron recubiertas con hMCAM-His recombinante y bloqueadas con tampón de caseína para evitar la unión no específica. El anticuerpo biotinilado de roedor o quimérico fue añadido a una concentración de subsaturación, en presencia o ausencia de concentraciones aumentadas 3x del competidor no etiquetado (anticuerpo humanizado, de roedor o quimérico). Después de lavar para retirar el anticuerpo no unido, estreptavidina HRP fue agregada para permitir la detección de anticuerpo biotinilado. La prueba de ELISA fue desarrollada con sustrato de TMB y se midió el OD450. La IC50 del competidor no etiquetado se determinó utilizando el software GraphPad Prism5.

La Tabla 5 resume el diseño de secuencias humanizadas.

Tabla 5

2120	Marco de Donante	Mutaciones
VH1	AF062133 IGHV2-26*01	S30T*, I37V, L48I y K71R
VH2	AF062133 IGHV2-26*01	Mutaciones de VH1 +T68S
VH3	AF062133 IGHV2-26*01	Mutaciones de VH1 +N32S
VH4	AF062133 IGHV2-26*01	Mutaciones de VH1 +N32Q
VH5	AF062133 IGHV2-26*01	Mutaciones de VH1 +G33A
VL1	X84343 IGKV1-39*01	L46V, Y49F y V58I
VL2	X84343 IGKV1-39*01	L46V, Y49F
VL3	X84343 IGKV1-39*01	VL1 + T22N

Los plásmidos de cadena pesada y ligera se co-transfectaron en las células 293F con el reactivo de transfección de FreeStyle™ MAX (Invitrogen) según protocolo del fabricante. El anticuerpo expresado fue purificado con columnas de proteína A PhyTip (Phynexus) y cuantificados a través de OD280.

Las afinidades aparentes de los anticuerpos humanizados se comparó con el anticuerpo de roedor parental o quimérico en un ELISA competitivo según el siguiente protocolo:

Las placas de ELISA fueron recubiertas con hMCAM-His recombinante y bloqueadas con tampón de caseína para evitar la unión no específica. El anticuerpo biotinilado de roedor o quimérico fue añadido a una concentración de subsaturación, en presencia o ausencia de concentraciones aumentadas 3x del competidor no etiquetado (anticuerpo humanizado, de roedor o quimérico). Después de lavar para

retirar el anticuerpo no unido, estreptavidina HRP fue agregada para permitir la detección de anticuerpo biotinilado. La prueba de ELISA fue desarrollada con sustrato de TMB y se midió el OD450. La IC50 del competidor no etiquetado se determinó utilizando el software GraphPad Prism5.

Las afinidades se midieron utilizando el ForteBio Rojo Octeto. Los sensores de Fc anti-humanos se utilizaron para capturar los anticuerpos humanizados, y varias concentraciones de analito de hMCAMHis fueron utilizadas para determinar la afinidad usando un modelo de ajuste de 1:1.

Las potencias de los anticuerpos fueron medidas en el ensayo de laminina/FACS según el siguiente protocolo: laminina recombinante 411 (Biolaminate) se agregó a células CHO que expresan hMCAM en la presencia o ausencia de concentraciones variables de los anticuerpos humanizados, de roedores o quiméricos. Tras la incubación durante 30-45 minutos, las células se lavaron y la anti-laminina conjugada a AF650 (NovusBio) fue agregada para detectar la unión a laminina. Las células fueron ejecutadas en un citómetro de flujo para medir la señal de unión a laminina.

La Tabla 6 proporciona los constructos utilizados para transfección.

Tabla 6

Constructo	Descripción
h2120_VH1	Estándar
h2120_VH2	Conservador
h2120_VH3	Estándar+N-S
h2120_VH4	Estándar+N-Q
h2120_VH5	Estándar+G-A
h2120_VL1	Estándar
h2120_VL2	Agresivo
h2120_VL3	Conservador

La Tabla 7 describe los experimentos de transfección específicos.

Tabla 7

Transfección-Ronda 1	
h2120_VH1+h2120_VL3	VH Estándar + VL conservador
h2120_VH2+h2120_VL3	VH Conservador + VL conservador
h2120_VH3+h2120_VL3	VH N-S desamidado + VL conservador

Transfección-Ronda 2	
h2120_VH4+h2120_VL3	VH N-Q desamidado + VL conservador
h2120_VH5+h2120_VL3	VH G-A desamidado + VL conservador
h2120_VH1+h2120_VL1	VH Estándar + VL Estándar
h2120_VH1+h2120_VL2	VH Estándar + VL agresivo

La Tabla 8 muestra las afinidades relativas de los anticuerpos humanizados en comparación con el de roedor principal medidas por ForteBio y ELISA competitivo, así como los niveles de expresión de la primera ronda de transfecciones.

Tabla 8

	Forte		ELISA		
	Exp. #1	Exp. #2	Exp. #1	Exp. #2	
Transfección—ronda 1	Veces sobre roedor	Veces sobre roedor	Veces sobre roedor	Veces sobre roedor	Nivel de Expresión
2120 de roedor	1.00	1.00	1.00	1.00	
h2120_VH1+h2120_VL3	5.64	6.21	2.23	2.42	22mg/L
h2120_VH2+h2120_VL3	6.57	6.43	1.93	2.62	16mg/L
h2120_VH3+h2120_VL3	16.14		3.47		22mg/L
2120 químérico			0.97	1.72	

La Tabla 9 muestra la afinidad medida por ForteBio, ELISA competitivo, y datos de bloqueo funcional (ensayo de laminina/FACS) en comparación con el de roedor principal, así como los niveles de expresión, de la segunda ronda de transfecciones.

Tabla 9

	Forte	Forte		Bloqueo		
			ELISA	Exp#1	Exp#2	
Transfección—ronda 2	Veces sobre roedor	Veces sobre roedor	Veces sobre roedor	Veces sobre roedor	Veces sobre roedor	Nivel de Expresión
h2120_VH4+h2120_VL3	17.4		5.0	3.8	5.6	15mgL
h2120_VH5+h2120_VL3	1.1	1.2	2.4	1.2	1.5	22mg/L
h2120_VH1+h2120_VL1	8.8		3.1	2.0	3.5	17mg/L
h2120_VH1+h2120_VL2	10.8		3.1	4.6	12.6	2mg/L
h2120_VH1+h2120_VL3	5.9	5.8	1.8	1.7	2.8	22mg/L
2120 de roedor	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	

En general, los datos demuestran que los varios anticuerpos humanizados 2120 tienen una reducción de >5x en la afinidad medida por ForteBio y la mayoría tienen una

reducción de >2-3x en afinidad aparente y potencia medida por ELISA competitivo y ensayo de bloqueo de laminina, con la excepción de VH5VL3 (mutante de desamidación de G-A-N VH/VL conservador), que tuvo una reducción de <2x en afinidad y potencia.

Ciertos anticuerpos candidatos fueron re-expresados y probados para su afinidad por ForteBio y su IC₅₀. Los resultados se proporcionan en la Tabla 10 a continuación.

10 **Tabla 10**

	kD Forte	Bloqueo IC50	Expresión
h2120VH5VL3	1.3	0.7	12.7mg/L

15 **Ejemplo 7. Modificación de anticuerpos 2120 humanizados**

Utilizando los métodos de manipulación de ADN descritos anteriormente y según Liu et al. *JBC*. 286:11211-7, 2011, se construyeron las variantes de las versiones de rata y humanizada de las regiones variables maduras de cadena pesada de anticuerpo 2120.4.19. Las variantes de 2120.4.19, h2120VH1, h2120VH2, h2120VH3, h2120VH4, y h2120VH5 fueron construidas con una glutamina a la sustitución de ácido glutámico en la posición H1 (numeración de Kabat) (Figura 4A). Estas variantes se denominan 2120.4.19.Q1E, h2120VH1.Q1E, h2120VH2.Q1E, h2120VH3.Q1E, h2120VH4.Q1E, y h2120VH5.Q1E y se muestran en las SEQ ID NOS:156-161. Las versiones humanizadas por las SEQ ID NOs: 157-161 están representadas en la alineación en la Figura 4A. Varios

anticuerpos de rata y humanizados se pueden construir
utilizando las cadenas pesadas variables modificadas,
incluyendo: h2120VH1.Q1E+h2120VL1; h2120VH1.Q1E +h2120VL2;
h2120VH1.Q1E +h2120VL3; h2120VH2.Q1E +h2120VL1; h2120VH2.Q1E
5 +h2120VL2; h2120VH2.Q1E +h2120VL3; h2120VH3.Q1E +h2120VL1;
h2120VH3.Q1E +h2120VL2; h2120VH3.Q1E +h2120VL3; h2120VH4.Q1E
+h2120VL1; h2120VH4.Q1E +h2120VL2; h2120VH4.Q1E +h2120VL3;
h2120VH5.Q1E +h2120VL1; h2120VH5.Q1E +h2120VL2; y
h2120VH5.Q1E +h2120VL3.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que comprende:

5 (a) una región madura variable de cadena pesada que comprende los tres CDRs de Kabat de la SEQ ID NO: 161, excepto que la posición 32 (numeración de Kabat) puede ser N, S o Q, y la posición 33 (numeración de Kabat) puede ser G o A, y en donde la posición 1 (numeración de Kabat) está ocupada por E; y

10 (b) una región madura variable de cadena ligera que comprende los tres CDRs de Kabat de la SEQ ID NO: 123.

2. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde la región madura variable de cadena pesada es por lo menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 161, y la región madura variable de cadena ligera es por lo menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 123.

3. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde la región madura variable de cadena pesada es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 161, y la región madura variable de cadena ligera es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 123.

4. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde la región madura variable de cadena pesada es por lo menos 98% idéntica a la SEQ ID NO: 161, y la región madura variable de cadena ligera es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 123.

5. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde la región madura variable de

cadena pesada es por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID NO: 161, y la región madura variable de cadena ligera es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 123.

5 6. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde la región madura variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:160, o SEQ ID NO:161, y en donde la región madura variable de cadena ligera es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID NO:123.

10 7. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde la región madura variable de cadena pesada es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 161, y la región madura variable de cadena ligera es por lo menos 98% idéntica a la SEQ ID NO: 123.

15 8. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde la región madura variable de cadena pesada es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 161, y la región madura variable de cadena ligera es por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID NO: 123.

20 9. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde la región madura variable de cadena pesada es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 161 y la región madura variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122,
25 o SEQ ID NO:123.

 10. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde la región madura variable de cadena pesada es por lo menos 98% idéntica a la SEQ ID NO:

161, y la región madura variable de cadena ligera es por lo menos 98% idéntica a la SEQ ID NO: 123.

11. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde la región madura variable de cadena pesada es por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID NO: 161, y la región madura variable de cadena ligera es por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID NO: 123.

12. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde la región madura variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:160, o SEQ ID NO:161, y en donde la región madura variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122, o SEQ ID NO:123.

13. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde la región variable madura de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:161, y en donde la región variable madura de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:123.

14. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que es un anticuerpo humanizado.

15. Un anticuerpo anti-MCAM aislado que se une al MCAM humano (SEQ ID NO: 11) en un epítipo que incluye el residuo del aminoácido 141.

16. El anticuerpo anti-MCAM aislado de conformidad con la reivindicación 15, en donde el epítipo comprende el residuo del aminoácido 145.

17. El anticuerpo anti-MCAM aislado de conformidad

con la reivindicación 15 o 16, en donde el epítipo comprende por lo menos cinco residuos de aminoácidos contiguos de MCAM humano incluyendo el residuo del aminoácido 141.

18. El anticuerpo anti-MCAM aislado de conformidad
5 con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde el anticuerpo no es el anticuerpo monoclonal 2120.4.19 o un anticuerpo que comprende CDRs sustancialmente de anticuerpo monoclonal 2120.4.19.

19. El anticuerpo anti-MCAM aislado de conformidad
10 con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en donde el anticuerpo es monoclonal.

20. El anticuerpo anti-MCAM aislado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en donde el anticuerpo es quimérico, humanizado, revestido o humano.

15 21. El anticuerpo o anticuerpo anti-MCAM aislado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, 74 o 75, que es un fragmento de unión a antígeno.

22. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el anticuerpo anti-MCAM aislado de conformidad
20 con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, 74 o 75.

23. Una formulación farmacéutica que comprende:

(a) un anticuerpo que comprende:

(i) una región madura variable de cadena pesada que comprende los tres CDRs de Kabat de la SEQ ID NO:
25 161, excepto que la posición 32 (numeración de Kabat) puede ser N, S o Q, y la posición 33 (numeración de Kabat) puede ser G o A; y

(ii) una región madura variable de cadena

ligera que comprende los tres CDRs de Kabat de la SEQ ID NO: 123.

(b) tampón de histidina presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 10 mM a
5 aproximadamente 30 mM;

(c) uno o más azúcares y polioles ("azúcar/poliol") seleccionados de:

(i) sacarosa presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 200 mM a aproximadamente
10 260 mM; y

(ii) trehalosa presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 260 mM; y

(d) polisorbato 20 presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 0.005% a aproximadamente
15 0.05% por peso;

en donde la formulación farmacéutica se caracteriza por un pH dentro del rango de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7.

20 24. La formulación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 23, en donde la región madura variable de cadena pesada es por lo menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 161, y la región madura variable de cadena ligera es por lo menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 123.

25 25. La formulación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 23 o 24, en donde la posición 1 (numeración de Kabat) de la región variable madura de cadena pesada está ocupada por E.

26. La formulación farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en donde la región madura variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:160, o SEQ ID NO:161, y en donde la región madura variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122, o SEQ ID NO:123.

27. La formulación farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, en donde la región variable madura de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 161 y la región variable madura de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 123.

28. Una formulación farmacéutica que comprende:

(a) el anticuerpo anti-MCAM aislado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21;

(b) tampón de histidina presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM;

(c) uno o más azúcares y polioles ("azúcar/poliol") seleccionados de:

(i) sacarosa presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 260 mM; y

(ii) trehalosa presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 260 mM; y

(d) polisorbato 20 presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 0.005% a aproximadamente 0.05% por peso;

5 en donde la formulación farmacéutica se caracteriza por un pH dentro del rango de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7.

29. La formulación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 28, en donde el anticuerpo anti-MCAM aislado se une a MCAM humano (SEQ ID NO: 11) en un epítopo
10 que incluye el residuo del aminoácido 141.

30. La formulación farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 29, 76 o 77, en donde el anticuerpo o el anticuerpo anti-MCAM aislado está presente en una concentración de aproximadamente 40 mg/mL.

15 31. La formulación farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 30, 76 o 77, en donde el tampón de histidina está presente en una concentración de aproximadamente 20 mM.

20 32. La formulación farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 31, 76 o 77, en donde el azúcar/poliol es sacarosa presente en una concentración de aproximadamente 220 mM.

25 33. La formulación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 32, en donde el pH es de aproximadamente 6.0.

34. La formulación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 33, que se caracteriza por una osmolalidad de aproximadamente 295 mOsm/kg.

35. La formulación farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 31, 76 o 77, en donde el azúcar/poliool es trehalosa presente en una concentración de aproximadamente 220 mM.

5 36. La formulación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 35, en donde el pH es de aproximadamente 6.5.

 37. La formulación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 36, que se caracteriza por una osmolalidad
10 de aproximadamente 287 mOsm/kg.

 38. La formulación farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 37, 76 o 77, en donde menos de aproximadamente el 5% de anticuerpo o el anticuerpo anti-MCAM aislado está presente como un agregado en la
15 formulación.

 39. La formulación farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 38, 76 o 77, que además comprende un agente de carga.

 40. La formulación farmacéutica de conformidad con
20 cualquiera de las reivindicaciones 23 a 39, 76 o 77, que es estéril.

 41. La formulación farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 40, 76 o 77, que es estable en el congelamiento y el descongelamiento.

25 42. La formulación farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 41, 76 o 77, en el que al menos el 65% de la proteína aparece como un solo pico en cromatografía de interacción hidrófoba después del

almacenamiento por al menos 30 días a 38-42°C y/o después del almacenamiento por al menos 3 meses a 38-42°C.

43. La formulación farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 41, 76 o 77, que
5 tiene no más del 5% de proteína agregada por peso en cromatografía por exclusión de tamaño de alto rendimiento después del almacenamiento por al menos 30 días a 38-42°C o después del almacenamiento por al menos 3 meses a 38-42°C.

44. Una formulación liofilizada que comprende:

10 (a) el anticuerpo o el anticuerpo anti-MCAM aislado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, 23 a 27, 74 o 75;

(b) tampón de histidina;

(c) sacarosa o trehalosa; y

15 (d) polisorbato 20

45. La formulación liofilizada de conformidad con la reivindicación 44, que, al añadir agua, se reconstituye a una formulación que tiene un pH de entre aproximadamente 5.5 a aproximadamente 6.5.

20 46. La formulación liofilizada de conformidad con la reivindicación 44 o la reivindicación 45, que comprende aproximadamente 10 mg a aproximadamente 40 mg de anticuerpo o anticuerpo anti-MCAM aislado.

47. La formulación liofilizada de conformidad con
25 cualquiera de las reivindicaciones 44 a 46, en donde la formulación comprende tampón de histidina presente en una cantidad de aproximadamente 20 mM cuando se reconstituye.

48. La formulación liofilizada de conformidad con

cualquiera de las reivindicaciones 44 a 47, en donde la formulación comprende sacarosa presente en una cantidad de aproximadamente 220 mM cuando se reconstituye.

49. La formulación liofilizada de conformidad con la reivindicación 48, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 6.0 cuando se reconstituye.

50. La formulación liofilizada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 44 a 47, en donde la formulación comprende trehalosa presente en una cantidad de aproximadamente 220 mM cuando se reconstituye.

51. La formulación liofilizada de conformidad con la reivindicación 50, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 6.5 cuando se reconstituye.

52. La formulación liofilizada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 44 a 51, en donde el polisorbato 20 está presente en una cantidad dentro del rango de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 0.05% en peso.

53. La formulación liofilizada de conformidad con la reivindicación 44, que es reconstituible al añadir agua a una solución acuosa que comprende:

(a) el anticuerpo o el anticuerpo anti-MCAM aislado que está presente en una concentración de aproximadamente 40 mg/mL;

(b) tampón de histidina presente en una concentración de aproximadamente 20 mM;

(c) sacarosa presente en una concentración de aproximadamente 220 mM;

(d) polisorbato 20 presente en una concentración de

aproximadamente 0.02%; y

(e) un pH de aproximadamente 6.0.

54. La formulación liofilizada de conformidad con la reivindicación 53, que comprende:

5 (a) 200 mg de anticuerpo o el anticuerpo anti-MCAM aislado;

(b) 15.5 mg de histidina

(c) 376 mg de sacarosa.

(d) 1 mg de polisorbato 20; y

10 (e) un pH de aproximadamente 6.0.

55. La formulación liofilizada de conformidad con la reivindicación 44, que es reconstituible al añadir agua a una solución acuosa que comprende:

(a) el anticuerpo o el anticuerpo anti-MCAM aislado
15 que está presente en una concentración de aproximadamente 40 mg/mL;

(b) tampón de histidina presente en una concentración de aproximadamente 20 mM;

(c) trehalosa presente en una concentración de
20 aproximadamente 220 mM;

(d) polisorbato 20 presente en una concentración de aproximadamente 0.02%; y

(e) un pH de aproximadamente 6.5.

56. La formulación liofilizada de conformidad con
25 la reivindicación 55, que comprende:

(a) 200 mg de anticuerpo o el anticuerpo anti-MCAM aislado;

(b) 15.5 mg de histidina

(c) 416 mg de dihidrato de trehalosa;

(d) 1 mg de polisorbato 20; y

(e) un pH de aproximadamente 6.5.

57. El uso de anticuerpo o el anticuerpo anti-MCAM
5 aislado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones
1 a 21, 74 o 75 en la fabricación de un medicamento para el
tratamiento de un trastorno inflamatorio en un sujeto
mamífero, caracterizado por la infiltración de células que
expresan MCAM en un sitio de inflamación en el cuerpo.

10 58. El uso de anticuerpo o el anticuerpo anti-MCAM
aislado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones
1 a 21, 74 o 75 en la fabricación de un medicamento para el
tratamiento de un trastorno inflamatorio del sistema nervioso
central (SNC) en un sujeto mamífero, caracterizado por la
15 infiltración de células que expresan MCAM en el SNC.

59. El uso de anticuerpo o el anticuerpo anti-MCAM
aislado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones
1 a 21, 74 o 75 en la fabricación de un medicamento para el
tratamiento de esclerosis múltiple en un sujeto mamífero.

20 60. El uso de anticuerpo o el anticuerpo anti-MCAM
aislado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones
1 a 21, 74 o 75 en la fabricación de un medicamento para el
tratamiento de psoriasis en un sujeto mamífero.

61. El uso de anticuerpo o el anticuerpo anti-MCAM
25 aislado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones
1 a 21, 74 o 75 en la fabricación de un medicamento para el
tratamiento de un tumor sólido, tal como melanoma, en un
sujeto mamífero.

62. El uso de anticuerpo o el anticuerpo anti-MCAM aislado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, 74 o 75 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de sarcoidosis en un sujeto mamífero.

5 63. El uso de anticuerpo o el anticuerpo anti-MCAM aislado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, 74 o 75 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de artritis psoriásica en un sujeto mamífero.

10 64. El uso de anticuerpo o el anticuerpo anti-MCAM aislado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, 74 o 75 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson en un sujeto mamífero.

15 65. El uso de anticuerpo o el anticuerpo anti-MCAM aislado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, 74 o 75 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de dermatitis alérgica de contacto en un sujeto mamífero.

20 66. Un método para el tratamiento de un trastorno inflamatorio caracterizado por la infiltración de células que expresan MCAM a un sitio de inflamación, el método comprende administrar a un sujeto mamífero en necesidad del mismo una cantidad eficaz de anticuerpo o el anticuerpo anti-MCAM aislado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones
25 1 a 21, 74 o 75.

67. El método de conformidad con la reivindicación 66, en donde las células que expresan MCAM son células TH17.

68. El método o el uso de conformidad con

cualquiera de las reivindicaciones 57 a 67, en donde el sujeto mamífero es un ser humano.

69. Un péptido aislado que comprende un epítopo para unirse a un anticuerpo monoclonal anti-MCAM, en donde el
5 péptido comprende 5-50 residuos de aminoácidos contiguos de MCAM humano (SEQ ID NO: 11) incluyendo el residuo de aminoácido 141.

70. El péptido aislado de conformidad con la reivindicación 69, en donde el péptido está vinculado a un
10 polipéptido portador.

71. El péptido aislado de conformidad con la reivindicación 69 o la reivindicación 70, en donde el péptido está combinado con un adyuvante.

72. Un método para generar un anticuerpo que
15 inhibe la unión de MCAM humano a una cadena de laminina α -4, que comprende:

(a) inmunizar a un sujeto con un péptido tal como se define por cualquiera de las reivindicaciones 66 a 68;

(b) aislar las células de B del sujeto, en donde
20 las células B secretan anticuerpos; y

(c) detectar los anticuerpos para identificar un anticuerpo que inhibe la unión de MCAM humano a una cadena de laminina α -4.

73. El método de conformidad con la reivindicación
25 72, que además comprende:

(d) fusionar las células B con células inmortalizadas en cultivo para formar células de hibridoma productoras de anticuerpo monoclonal;

(e) cultivar las células de hibridoma; y,

(f) aislar los anticuerpos monoclonales del cultivo.

74. El anticuerpo de conformidad con la
5 reivindicación 1, en donde la región variable madura de
cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID
NO:161 y la región variable madura de cadena ligera tiene la
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:123, y en donde el
anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada
10 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:171 y
una región constante de cadena ligera que tiene la secuencia
de aminoácidos de la SEQ ID NO:168.

75. El anticuerpo de conformidad con la
reivindicación 1, en donde la región variable madura de
15 cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID
NO:161 y la región variable madura de cadena ligera tiene la
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:123, y en donde el
anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada
que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:172 y
20 una región constante de cadena ligera que tiene la secuencia
de aminoácidos de la SEQ ID NO:168.

76. La formulación farmacéutica de conformidad con
cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27, en donde la
región variable madura de cadena pesada tiene la secuencia de
25 aminoácidos de la SEQ ID NO:161 y la región variable madura
de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ
ID NO:123, y en donde el anticuerpo comprende una región
constante de cadena pesada que tiene la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO:171 y una región constante de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:168.

77. La formulación farmacéutica de conformidad con
5 cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27, en donde la
región variable madura de cadena pesada tiene la secuencia de
aminoácidos de la SEQ ID NO:161 y la región variable madura
de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ
ID NO:123, y en donde el anticuerpo comprende una región
10 constante de cadena pesada que tiene la secuencia de
aminoácidos de la SEQ ID NO:172 y una región constante de
cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ
ID NO:168.

RESUMEN

La invención proporciona anticuerpos anti-MCAM que
5 inhiben la capacidad del MCAM humano para unirse a una cadena
de laminina alfa-4. La invención también proporciona
composiciones farmacéuticas y formulaciones farmacéuticas,
métodos para la generación de dichos anticuerpos y su uso en
la fabricación de medicamentos para el tratamiento de
10 enfermedad neuroinflamatoria, enfermedad autoinmune o cáncer.