CONJUGADOS DE FÁRMACOS CON ANTICUERPOS ANTI-CDH6

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se dirige a anticuerpos anti-CDH6, fragmentos de anticuerpos, conjugados de fármacos con anticuerpos, y sus usos para el tratamiento del cáncer.

FUNDAMENTO DE LA INVENCIÓN

[0002] Las cadherinas son una familia de moléculas de adhesión celular que participan en contacto célula-célula. Hay más de 30 moléculas de cadherina en la familia que consta de subclases con especificidades de unión individuales. Hay cadherinas clásicas bien estudiadas tales como cadherina epitelial (E), cadherina neural (N) y cadherina placental (P), que desempeñan un papel clave en el desarrollo y mantenimiento de tejidos tales como el epitelio. La familia cadherinas también ha sido clasificado por sus similitudes de aminoácidos, que separan las cadherinas en dos grupos, tipo I y tipo II. Luego hay cadherinas específicas a tejido como cadherina-6 (CDH6).

[0003] CDH6 se clonó y caracterizó primero en 1995 (Shimoyama, Cancer Res 1995: 55 (10)2206-2211). El ADNc de CDH6 aislado por Shimoyama tuvo 4.315 nucleótidos y se codificó para una proteína de cadherina de 790 aminoácidos y exhibió 97% de homología con cadherina K de rata (Shimoyama, arriba). CDH6 es una cadherina tipo II con cinco repeticiones de cadherina extracelular, un dominio de transmembrana y un dominio citoplasmático. En ensayos para la expresión tisular normal, CDH6 se detectó en el cerebro, cerebelo y riñón, con expresión más débil en el pulmón, páncreas y la mucosa gástrica. En el sistema nervioso, se encontró que CDH6 demarca los sistemas auditivos y somatosensoriales (Inoue, Mol. Cell Neuro. 2008: (39) 95-104). Se demostró que CDH6 se expresa por un subconjunto de células ganglionares de la retina (CGR) en el ojo responsables de tales cualidades de visión como el brillo, la dirección del movimiento o bordes (Osterhout, Neuron 2011: 71(4):632-639. En los ratones con CDH6

silenciado, la ausencia de CDH6 causa la pérdida en el marcaje del axón. Los axones CDH6 mutantes fueron adecuadamente elongados y guiados a sus blancos, pero luego crecieron mucho y pasaron a sus conexiones (Osterhout, Superior). En otro estudio, los ratones con CDH6 silenciado demostraron defectos en la vocalización (Nakagawa, PLOS 2012: 7(11) e49233).

[0004] En cuanto a su expresión en el cáncer, el ADNc de CDH6 se clonó a partir de una línea celular de carcinoma hepatocelular, que fue una indicación temprana que éste puede estar implicado en este tipo de cáncer (Shimoyama, arriba). Los primeros trabajos encontraron expresión de CDH6 en varias líneas de hepatoma, pero ninguna expresión en el hígado normal. En un trabajo posterior, un grupo analizó 216 pacientes con carcinoma de células renales y encontró que la expresión de CDH6 se correlacionó con este tipo de cáncer (Paul, J Urology 2004 (171): 97-101). Shimazui encontró que los pacientes con carcinoma de células renales que expresaron CDH6 y carecían de expresión de E-cadherina tenían un mal pronóstico (Shimazui, Clin. Cancer Res. 1998 (4): 2419-2424). También se descubrió que CDH6 era un blanco de TGF-B y desempeña un papel en el cáncer de tiroides (Sancisi, PLoS One 2013; 8 (9): E75489). Por último, CDH6 fue mostrado como un biomarcador para cáncer de ovario (Kobel, PLoS One 2008 5 (12): e232).

[0005] Conjugados de fármacos con anticuerpos ("ADCs") se han utilizado para la administración local de agentes citotóxicos en el tratamiento del cáncer (véase ej., Lambert, Curr. Opinion In Pharmacology 5:543-549, 2005). ADCs permiten la entrega específica de la fracción de fármaco, donde se puede conseguir la máxima eficacia con la mínima toxicidad. A medida que más ADCs muestran resultados clínicos prometedores, existe una mayor necesidad de desarrollar nuevos agentes terapéuticos para la terapia del cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

[0006] Un conjugado de fármaco con anticuerpo de la fórmula:

$$Ab\text{-}(L\text{-}(D)_m)_n$$

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un epitopo de CDH6 humano;

L es un enlazador;

D es una fracción farmacológica;

m es un entero de 1 a 8; y

n es un entero de 1 a 10.

[0007] El conjugado de fármaco con anticuerpo según cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho n es 3 o 4.

[0008] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente al dominio extracelular de CDH6 (SEC ID NO:4).

[0009] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une específicamente a un epítopo de CDH6 humana en la SEC ID NO:534.

[0010] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

(i) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 224, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 225, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 226; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO: 227, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 228, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:229;

(ii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 210, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 211, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 212; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:213, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 214, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:215;

(iii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 266, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 267, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 268; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO: 269, (e) una HCDR2 de SEQ ID NO: 270, y (f) una HCDR3 de SEC ID NO: 271;

(iv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 308, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 309, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 310; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:311, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:312, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:313;

(v) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 14, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 15, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 16; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:17, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:18, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:19;

(vi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 28, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 29, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 30; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:31, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:32, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:33;

(vii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 42, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 43, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 44; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:45, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:46, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:47;

(viii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 56, (b) una LCDR2 de la

SEQ ID NO: 57, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 58; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:59, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:60, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:61;

(ix) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 70, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 71, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 72; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:73, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:74, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:75;

(x) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 84, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 85, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 86; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:87, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 88, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO: 89;

(xi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 98, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 99, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 100; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:101, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:102, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:103;

(xii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 112, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 113, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 114; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:115, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:116, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:117;

(xiii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 126, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 127, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 128; y una región variable de cadena

pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:129, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:130, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:131;

(xiv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 140, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 141, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 142; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:143, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:144, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:145;

(xv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 154, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 155, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 156; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:157, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:158, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:159;

(xvi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 168, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 169, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 170; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:171, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:172, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:173;

(xvii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 182, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 183, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 184; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:185, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:186, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:187;

(xviii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 196, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 197, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 198; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:199, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:200, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:201;

(xix) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 238, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 239, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO:240; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:241, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:242, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:243;

(xx) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 252, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 253, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 254; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:255, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:256, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:257;

(xxi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 280, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 281, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 282; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:283, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:284, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:285;

(xxii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 294, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 295, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 296; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:297, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:298, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:299; o

(xxiii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 322, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 323, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 324; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:325, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:326, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:327.

[0011] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores en donde al menos un aminoácido dentro de una CDR se sustituye por un residuo correspondiente de una CDR correspondiente de otro anticuerpo anti-CDH6 en la Tabla 5 o 6.

[0012] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores en donde uno o dos aminoácidos dentro de una CDR han sido modificados, eliminados o sustituidos.

[0013] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

(i) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEC ID NO: 230; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 231;

(ii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 216; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 217;

(iii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 272; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 273;

(iv) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 314, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 315;

(v) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 20, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 21;

(vi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 34; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 35;

(vii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 48, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 49;

(viii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 62, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 63;

(ix) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 76, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 77;

(x) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 90, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 91;

(xi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 104, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 105;

(xii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 118; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 119;

(xiii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 132; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 133;

(xiv) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 146; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 147;

(xv) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 160, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 161;

(xvi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 174; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 175;

(xvii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 188; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 189;

(xviii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 202; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 203;

(xix) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 244; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 245;

(xx) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 258, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 259;

(xxi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 286, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 287;

(xxii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 300, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 301; o

(xxiii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 328, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 329.

[0014] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

(i) una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 234; y una región variable que comprende la SEC ID NO:235;

(i) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO: 220; y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:221;

(iii) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO: 276; y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:277;

(iv) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:318, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:319.

(v) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:24, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:25.

(vi) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO: 38; y una región variable que comprende la SEC ID NO:39;

(vii) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:52, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:53.

(viii) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:66, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:67;

(ix) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:80, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:81;

(x) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:94, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:95;

(xi) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:108, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:109;

(xii) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO: 122; y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:123;

(xiii) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:136, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:137.

(xiv) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:150, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:151.

(xv) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:164, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:165.

(xvi) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:178, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:179.

(xvii) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:192, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:193.

(xviii) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:206, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:207.

(xix) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:248, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:249.

(xx) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:262, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:263.

(xxi) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:290, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:291.

(xxii) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:304, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:305; o

(xxiii) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:332, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:333.

[0015] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades precedentes que retiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad en ya sea la región ligera variable o la región pesada variable.

[0016] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano modificado, un anticuerpo humano, un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) o un fragmento de anticuerpo.

[0017] El conjugado de fármaco con anticuerpo según cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho enlazador (L) se selecciona del grupo que consta en un enlazador escindible, un enlazador no escindible, un enlazador hidrofílico, un enlazador procargado y un enlazador basado en ácido dicarboxílico .

[0018] El conjugado de fármaco con anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el enlazador se deriva de un reactivo entrecruzamiento seleccionado del grupo que consta de: N-succinimidil-4-(2-piridilditio)2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB),

yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), N-succinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato (SIAB), maleimida PEG NHS, 4-(maleimidometil) ciclohexanocarboxilato de N-succinimidilo (SMCC), 4-(maleimidometil) ciclohexanocarboxilato de N- sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) o 2,5-dioxopirrolidin-1-il 17-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5,8,11,14-tetraoxo-4,7,10,13-tetraazaheptadecan-1-oato (CX1-1).

[0019] El conjugado de fármaco con anticuerpo según cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho enlazador se deriva de N-succinimidil-4-(2-piridilditio)2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB).

[0020] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicha fracción de fármaco (D) se selecciona a partir de un grupo que consta de: una maitansinoide, un inhibidor de la V-ATPasa, un agente pro-apoptótico, un inhibidor de Bcl2, un inhibidor MCL1, un inhibidor de la HSP90, un inhibidor de IAP, un inhibidor de mTOR, un estabilizador de microtúbulos, un desestabilizador de microtúbulos, una auristatina, una dolastatina, una MetAP (aminopeptidasa metionina), un inhibidor de la exportación nuclear de proteínas CRM1, un inhibidor de DPPIV, inhibidores del proteasoma, inhibidores de las reacciones de transferencia de fosforilo en la mitocondria, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inhibidor de cinasa, un inhibidor de CDK2, un inhibidor de CDK9, un inhibidor de la quinesina, un inhibidor de HDAC, un agente que daña el ADN, un agente alquilante de ADN, un intercalador de ADN, un enlazador del zurco menor de ADN y un inhibidor de la DHFR.

[0021] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la fracción de fármaco es una maitansinoide.

[0022] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la maitansinoide es N(2')-deacetil-N2-(4- mercapto-4-metil- 1 - oxopentil)-maitansina (DM4) o N(2')- deacetil-N(2')-(3-mercapto-l-oxopropil)-maitansina (DM1).

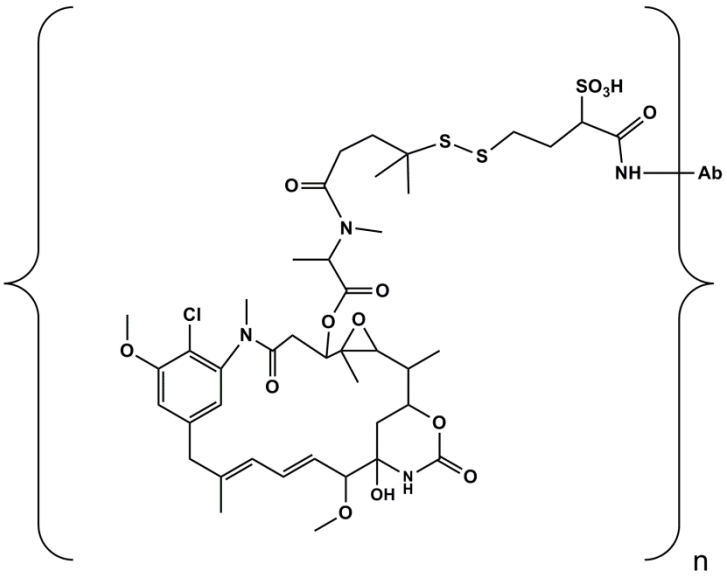
[0023] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores en combinación con otro agente terapéutico.

[0024] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores en combinación con un agente terapéutico listado en la Tabla 18.

[0025] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores en combinación con un inhibidor de BCL2, un inhibidor de Bcl-XL, un inhibidor de BCL2/ BCL-XL, un inhibidor de IAP o un inhibidor de MEK.

[0026] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores en combinación con una molécula moduladores inmune.

[0027] Un conjugado de fármaco de anticuerpo de la fórmula:



Ab-sulfo-SPDB-DM4

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que especificamente se une a CDH6 humano, y n es un entero de 1 a 10.

[0028] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une específicamente a un epítopo de CDH6 humana en la (SEC ID NO:4).

[0029] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a CDH6 humano en (SEC ID NO:534).

[0030] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende:

(i) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 224, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 225, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 226; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO: 227, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 228, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:229;

(ii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 210, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 211, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 212; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:213, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 214, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:215;

(iii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 266, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 267, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 268; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO: 269, (e) una HCDR2 de SEQ ID NO: 270, y (f) una HCDR3 de SEC ID NO: 271;

(iv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 308, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 309, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 310; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:311, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:312, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:313;

(v) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 14, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 15, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 16; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:17, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:18, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:19;

(vi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 28, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 29, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 30; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:31, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:32, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:33;

(vii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 42, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 43, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 44; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:45, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:46, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:47;

(viii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 56, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 57, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 58; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:59, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:60, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:61;

(ix) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 70, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 71, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 72; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:73, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:74, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:75;

(x) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 84, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 85, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 86; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:87, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 88, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO: 89;

(xi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 98, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 99, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 100; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:101, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:102, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:103;

(xii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 112, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 113, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 114; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:115, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:116, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:117;

(xiii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 126, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 127, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 128; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:129, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:130, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:131;

(xiv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 140, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 141, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 142; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:143, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:144, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:145;

(xv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 154, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 155, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 156; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:157, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:158, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:159;

(xvi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 168, (b) una LCDR2 de la

SEQ ID NO: 169, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 170; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:171, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:172, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:173;

(xvii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 182, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 183, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 184; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:185, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:186, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:187;

(xviii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 196, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 197, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 198; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:199, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:200, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:201;

(xix) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 238, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 239, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO:240; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:241, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:242, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:243;

(xx) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 252, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 253, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 254; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:255, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:256, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:257;

(xxi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 280, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 281, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 282; y una región variable de cadena

pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:283, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:284, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:285;

(xxii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 294, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 295, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 296; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:297, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:298, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:299; o

(xxiii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 322, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 323, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 324; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:325, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:326, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:327.

[0031] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores en donde al menos un aminoácido dentro de una CDR se sustituye por un residuo correspondiente de una CDR correspondiente de otro anticuerpo anti-CDH6 en la Tabla 5 o 6.

[0032] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores en donde uno o dos aminoácidos dentro de una CDR han sido modificados, eliminados o sustituidos.

[0033] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

(i) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEC ID NO: 230; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 231;

(ii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 216; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 217;

(iii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 272; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 273;

(iv) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 314, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 315;

(v) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 20, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 21;

(vi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 34; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 35;

(vii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 48, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 49;

(viii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 62, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 63;

(ix) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 76, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 77;

(x) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 90, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 91;

(xi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 104, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 105;

(xii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 118; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 119;

(xiii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 132; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 133;

(xiv) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 146; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 147;

(xv) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 160, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 161;

(xvi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 174; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 175;

(xvii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 188; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 189;

(xviii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 202; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 203;

(xix) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 244; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 245;

(xx) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 258, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 259;

(xxi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 286, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 287;

(xxii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 300, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 301; o

(xxiii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 328, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 329.

[0034] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores que retiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad en ya sea la región ligera variable o la región pesada variable.

[0035] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano modificado, un anticuerpo humano, un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) o un fragmento de anticuerpo.

[0036] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicha n es un entero de 2 a 8.

[0037] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicha n es un entero de 3 a 4.

[0038] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores en combinación con otro agente terapéutico.

[0039] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores en combinación con un agente terapéutico listado en la Tabla 18.

[0040] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores en combinación con un inhibidor de BCL2, un inhibidor de Bcl-XL, un inhibidor de BCL2/ BCL-XL, un inhibidor de IAP o un inhibidor de MEK.

[0041] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores en combinación con una molécula moduladores inmune.

[0042] Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0043] La composición farmacéutica de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicha composición se prepara como un liofilizado.

[0044] La composición farmacéutica de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho liofilizado comprende el conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores, succinato de sodio, y polisorbato 20.

[0045] Un método de tratamiento de un cáncer positivo CDH6 en un paciente en necesidad del mismo, que comprende administrar a dicho paciente el conjugado de fármarco con anticuerpo, o la composición farmacéutica.

[0046] El método en donde dicho cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en: cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer de tejidos blandos, cáncer del SNC, cáncer de tiroides y colangiocarcinoma.

[0047] El método en donde el conjugado de fármaco con anticuerpo o la composición farmacéutica se administra en combinación con otro agente terapéutico.

[0048] El método en donde el conjugado de fármaco con anticuerpo o la composición farmacéutica se administra en combinación con un agente terapéutico listado en la Tabla 18.

[0049] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores en combinación con un inhibidor de BCL2, un inhibidor de Bcl-XL, un inhibidor de BCL2/ BCL-XL, un inhibidor de IAP o un inhibidor de MEK.

[0050] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores en combinación con una molécula moduladores inmune.

[0051] El conjugado de fármaco de anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores, para su uso como un medicamento.

[0052] El conjugado de fármaco con anticuerpo, o la composición farmacéutica para uso del mismo en el tratamiento de un cáncer CDH6 positivo.

[0053] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores, administrado en combinación con otro agente terapéutico.

[0054] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores administrada en combinación con un agente terapéutico listado en la Tabla 18.

[0055] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores en combinación con un inhibidor de BCL2, un inhibidor de Bcl-XL, un inhibidor de BCL2/ BCL-XL, un inhibidor de IAP o un inhibidor de MEK.

[0056] El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las modalidades anteriores en combinación con una molécula moduladores inmune.

[0057] Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las modalidades anteriores.

[0058] Un vector que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las modalidades anteriores.

[0059] Una célula huésped que comprende el vectorsegún cualquiera de las modalidades anteriores.

[0060] Un proceso para producir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende cultivar la célula huésped y la recuperar del anticuerpo desde el cultivo.

[0061] Un proceso para producir un conjugado de fármaco con anticuerpo anti-CDH6, el proceso que comprende:

(a) unir de manera química N-succinimidil-4- (2-piridilditio) 2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB) a una fracción de fármaco DM-4;

(b) conjugar dicho enlazador-fármaco con el anticuerpo recuperado del cultivo celular; y

(c) purificar el conjugado de fármaco de anticuerpo.

[0062] El conjugado de fármaco con anticuerpo hecho según cualquiera de las modalidades anteriores, que tiene una relación media de maitansinoide a anticuerpo (MAR), medida con un espectrofotómetro UV, de aproximadamente 3.5.

[0063] Un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende: (i) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 224, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 225, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 226; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO: 227, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 228, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:229;

(ii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 210, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 211, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 212; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:213, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 214, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:215;

(iii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 266, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 267, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 268; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO: 269, (e) una HCDR2 de SEQ ID NO: 270, y (f) una HCDR3 de SEC ID NO: 271;

(iv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 308, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 309, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 310; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:311, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:312, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:313;

(v) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 14, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 15, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 16; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:17, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:18, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:19;

(vi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 28, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 29, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 30; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:31, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:32, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:33;

(vii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 42, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 43, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 44; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:45, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:46, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:47;

(viii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 56, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 57, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 58; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:59, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:60, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:61;

(ix) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 70, (b) una LCDR2 de la

SEQ ID NO: 71, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 72; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:73, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:74, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:75;

(x) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 84, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 85, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 86; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:87, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 88, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO: 89;

(xi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 98, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 99, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 100; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:101, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:102, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:103;

(xii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 112, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 113, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 114; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:115, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:116, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:117;

(xiii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 126, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 127, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 128; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:129, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:130, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:131;

(xiv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 140, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 141, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 142; y una región variable de cadena

pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:143, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:144, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:145;

(xv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 154, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 155, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 156; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:157, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:158, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:159;

(xvi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 168, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 169, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 170; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:171, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:172, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:173;

(xvii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 182, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 183, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 184; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:185, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:186, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:187;

(xviii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 196, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 197, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 198; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:199, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:200, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:201;

(xix) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 238, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 239, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO:240; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:241, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:242, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:243;

(xx) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 252, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 253, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 254; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:255, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:256, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:257;

(xxi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 280, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 281, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 282; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:283, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:284, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:285;

(xxii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 294, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 295, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 296; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:297, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:298, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:299; o

(xxiii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 322, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 323, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 324; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:325, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:326, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:327.

[0064] El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde al menos un aminoácido dentro de una CDR se sustituye por un residuo correspondiente de una CDR correspondiente de otro anticuerpo anti-CDH6 en la Tabla 5 o 6.

[0065] El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

(i) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 230; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 231;

(ii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 216; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 217;

(iii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 272; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 273;

(iv) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 314, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 315;

(v) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 20, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 21;

(vi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 34; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 35;

(vii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 48, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 49;

(viii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 62, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 63;

(ix) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 76, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 77;

(x) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 90, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 91;

(xi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 104, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 105;

(xii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 118; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 119;

(xiii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 132; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 133;

(xiv) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 146; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 147;

(xv) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 160, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 161;

(xvi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 174; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 175;

(xvii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 188; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 189;

(xviii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 202; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 203;

(xix) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 244; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 245;

(xx) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 258, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 259;

(xxi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 286, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 287;

(xxii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 300, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 301; o

(xxiii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 328, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 329.

[0066] Un reactivo de diagnóstico que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las modalidades anteriores, el cual está marcado.

[0067] El reactivo de diagnóstico de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste de un radiomarcador, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de formación de imágenes, y un ion metálico.

Definiciones

[0068] A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y frases en la presente pretenden tener los siguientes significados:

[0069] El término “alquilo”se refiere a una cadena de hidrocarburo saturada monovalente que tiene el número especificado de átomos de carbono. Por ejemplo, alquilo C_{1-6} se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden ser lineales ó ramificados. Grupos alquilo ramificados representativos tienen uno, dos, ó tres ramificaciones. Ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no están limitados a, metilo, etilo, propilo (n-propilo e isopropilo), butilo (n-butilo, isobutilo, sec-butilo, y t-butilo), pentil (n-pentilo, isopentilo, y neopentilo), y hexilo.

[0070] El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente se refiere a un polipéptido de la familia de inmunoglobulina que es capaz de unirse a un antígeno correspondiente de forma no covalente, de forma reversible, y de una manera específica. Por ejemplo, un anticuerpo IgG de origen natural es un tetrámero que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) inter-conectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada

(abreviada en este documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en las regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos huésped o factores, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

[0071] El término "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de camélidos, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos anti-idiotípicos (anti- Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti- id a anticuerpos de la divulgación). Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo/clase (ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2).

[0072] "Dominios determinantes de complementariedad" o "regiones determinantes complementarias ("CDR ") se refieren indistintamente a las regiones hipervariables de VL y VH. Las CDRs son el sitio de unión a proteína diana de las cadenas de anticuerpo que alberga especificidad para tal proteína diana. Hay tres CDRs (CDR1-3, secuencialmente numeradas desde el extremo N-terminal) de cada LV o VH humana, que constituyen aproximadamente el 15-20% de los dominios variables. Las CRD pueden citarse por su región y orden. Por ejemplo, "VHCDR1" o "HCDR1" hacen

referencia a la primera CDR de la región variable de cadena pesada. Las CDRs son estructuralmente complementarias al epítopo de la proteína diana y por tanto son directamente responsables de la especificidad de unión. Los tramos restantes de la VL o VH, las denominadas regiones marco, exhiben una menor variación en la secuencia de aminoácidos (Kuby, Immunology, 4ª ed., Capítulo 4. W.H. Freeman & Co., Nueva York, 2000).

[0073] Las posiciones de las CDR y regiones marco se pueden determinar usando diversas definiciones conocidas en la técnica, ej., Kabat, Chothia, y AbM (véase, por ej., Johnson *et al.*, Nucleic Acids Res., 29:205-206 (2001);. Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature, 342:877-883 (1989); Chothia, J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992); Al-Lazikani, J.Mol.Biol., 273:927-748 (1997)). Las definiciones de los sitios de combinación de antígeno también se describen a continuación: Ruiz, Nucleic Acids Res., 28:219–221 (2000); y Lefranc, M.P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001); MacCallum, J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996); y Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989); Martin, Methods Enzymol., 203:121-153 (1991); y Rees, In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172(1996).

[0074] Tanto las cadenas ligeras como pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se utilizan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de ambas las porciones de cadena ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento del antígeno y la especificidad. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren importantes propiedades biológicas tales como la secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor Fc, unión del complemento, y similares. Por convención, la numeración de los dominios de región constante aumenta a medida que se vuelven más distales desde el sitio de unión a antígeno o extremo amino del anticuerpo. El extremo N es una región variable y el

extremo C es una región constante; los dominios CH3 y CL en realidad comprenden los dominios de extremo carboxilo de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

[0075] La frase "fragmento de anticuerpo", como se utiliza en la presente, se refiere a un polipéptido que incluye una o más porciones de un anticuerpo que retienen la capacidad de interactuar específicamente con (por ejemplo, por unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) un epítopo de un antígeno. Ejemplos de fragmentos de unión incluyen, pero no se limitan a, Fvs de cadena sencilla (Fvsc), Fvs unidos por enlaces disulfuro (sdFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab') , un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH , CL y CH1; un fragmento F(ab)2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consta de los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), que consta de un dominio VH, y una región determinante de complementariedad (CDR), u otros fragmentos de unión a epítopo de un anticuerpo.

[0076] Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite ser hechos como una sola cadena proteica en la que las regiones VL y VH se parean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird, (1988) Science 242:423-426, 1988; y Huston *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883, 1988). Tales anticuerpos de cadena sencilla también están destinados a estar comprendidos dentro del término "fragmento de unión a antigeno". Estos fragmentos de unión a antígeno se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan según la utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos.

[0077] Los fragmentos de unión a antígeno también se pueden incorporar en anticuerpos de dominio único, maxibodies, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y scFv bis-(véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson,

Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005). Los fragmentos de unión a antigeno pueden ser injertados en andamios con base en polipéptidos tales como la fibronectina tipo III (Fn3) (véase la patente de EE.UU. No. 6.703.199, que describe monocuerpos polipeptídicos de fibronectina).

[0078] Los fragmentos de unión a antígeno se pueden incorporar en moléculas de cadena única que comprende un par de segmentos Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos complementarios de cadena ligera, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata., Protein Eng. 8:1057-1062, 1995; y Patente de EE.UU. No. 5,641,870).

[0079] El término "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente, se refiere a polipéptidos, incluyendo anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que tienen secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica o se derivan de la misma fuente genética. Este término también incluye preparaciones de moléculas de anticuerpos de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una sola especificidad y afinidad de unión para un epítopo particular.

[0080] El término "anticuerpo humano", como se utiliza en la presente, incluye anticuerpos que tienen regiones variables en las que ambas las regiones marco y regiones CDR se derivan a partir de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de dichas secuencias humanas, ej., secuencias de línea germinal humana, o versiones mutadas de las secuencias de línea germinal humana o anticuerpos que contienen secuencias variables de consenso derivadas de análisis de secuencias variables humanas, por ejemplo, como se describe en Knappik, J. Mol. Biol. 296:57-86, 2000.

[0081] Los anticuerpos humanos de la presente divulgación pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por

mutación somática in vivo, o una sustitución conservativa para promover estabilidad o fabricación).

[0082] El término "reconocer" como se utiliza en la presente se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que encuentra e interactúa (por ejemplo, se une) con su epítopo, bien sea que ese epitopo sea lineal o conformacional. El término "epítopo" se refiere a un sitio en un antígeno al que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la divulgación se une específicamente. Los epítopos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se retienen en la exposición a disolventes desnaturalizantes, mientras que los epítopos formados por el plegamiento terciario típicamente se pierden tras el tratamiento con disolventes desnaturalizantes. Un epítopo incluye normalmente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Métodos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen técnicas en el estado de la técnica, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones (ver, ej., Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)). A "paratopo" es la parte del anticuerpo que reconoce el epítopo del antígeno.

[0083] La frase "se une específicamente" o "se une selectivamente," cuando se utiliza en el contexto de describir la interacción entre un antígeno (ej, una proteína) y un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o agente de unión derivado de anticuerpo, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia del antígeno en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos, ej., en una muestra biológica, ej., una muestra de sangre, suero, plasma o tejido. Por lo tanto, bajo ciertas condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos o agentes de unión con una especificidad de unión particular se unen a un antígeno en particular por lo menos dos veces el fondo y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otros antígenos presentes en la muestra. En un aspecto, bajo ciertas condiciones de

inmunoensayo designadas, el anticuerpo o agente de unión con una especificidad de unión particular se une a un antígeno en particular por lo menos diez (10) veces el fondo y no se une sustancialmente en una cantidad significativa a otros antígenos presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo o agente de unión en tales condiciones puede requerir que el anticuerpo o agente hayan sido seleccionados por su especificidad para una proteína particular. Según se desee o sea apropiado, esta selección puede conseguirse restando anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con moléculas de otras especies (ej., ratón o rata) u otros subtipos. Alternativamente, en algunos aspectos, se seleccionan anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con ciertas moléculas deseadas.

[0084] El término "afinidad", como se utiliza en la presente se refiere a la fuerza de interacción entre el anticuerpo y el antígeno en sitios antigénicos únicos. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del anticuerpo "brazo" interactúa a través de débiles fuerzas no covalentes con el antígeno en numerosos sitios, entre más interacciones, más fuerte es la afinidad.

[0085] El término "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un antigeno puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

[0086] El término "la correspondiente secuencia de la línea germinal humana" se refiere a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos de la región variable humana o subsecuencia que comparte la más alta identidad de secuencia de aminoácidos determinada con una secuencia de aminoácidos de región variable o subsecuencia en comparación con todas las demás secuencias de aminoácidos de región variable conocidas codificadas por secuencias de región variable de inmunoglobulina de línea germinal humana. La secuencia de línea germinal humana correspondiente también se puede referir a la secuencia humana de aminoácidos de

región variable o subsecuencia con la más alta identidad de secuencia aminoacídica con una secuencia de aminoácidos de región variable de referencia o subsecuencia en comparación con todas las otras secuencias de aminoácidos de región variable evaluadas. La secuencia de línea germinal humana correspondiente puede ser regiones marco solamente, sólo regiones determinantes complementarias, regiones marco y determinantes de complementariedad, un segmento variable (como se define anteriormente), u otras combinaciones de secuencias o subsecuencias que comprenden una región variable. La identidad de la secuencia se puede determinar utilizando los métodos descritos en la presente, por ejemplo, alinear dos secuencias usando BLAST, ALIGN, u otros algoritmos de alineación conocidos en la técnica. La secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos de la línea germinal humana correspondiente pueden tener al menos aproximadamente 90%, 92%, 93% 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100 de identidad de secuencia con la secuencia de ácids nucleicos o aminoácidos de la región variable de referencia.

[0087] Una variedad de formatos de inmunoensayo se pueden usar para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se utilizan rutinariamente para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (ver, ej.,, Harlow y Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden utilizarse para determinar la inmunorreactividad específica) . Normalmente, una reacción de unión específica o selectiva producirá una señal de al menos dos veces sobre la señal de fondo y más típicamente al menos 10 a 100 veces sobre el fondo.

[0088] El término "constante de equilibrio de disociación (KD, M)" se refiere a la constante de tasa de disociación (kd, tiempo-1) dividida por la constante de tasa de asociación (ka, tiempo-1, M-1). Las constantes de equilibrio de disociación se pueden medir utilizando cualquier método conocido en la técnica. Los anticuerpos de la presente divulgación generalmente tendrán una constante de equilibrio de disociación de menos de

aproximadamente 10^{-7} o 10^{-8} M, por ejemplo, menos de aproximadamente 10^{-9} M o 10^{-10} M, en algunos aspectos, menos de aproximadamente -10^{-11} M, 10^{-12} M o 10^{-13} M.

[0089] El término "biodisponibilidad" se refiere a la disponibilidad sistémica (es decir, niveles en sangre/plasma) de una cantidad dada de fármaco administrado a un paciente. La biodisponibilidad es un término absoluto que indica la medición tanto del tiempo (tasa) y la cantidad total (extensión) del fármaco que llega a la circulación general desde una forma de dosificación administrada.

[0090] Como se utiliza en la presente, la frase "que consta esencialmente de" se refiere a los géneros o especies de agentes farmacéuticos activos incluidos en un método o composición, así como cualquiera de los excipientes inactivos para la finalidad prevista de los métodos o composiciones. En algunos aspectos, la frase "que consiste esencialmente en" excluye expresamente la inclusión de uno o más agentes activos adicionales distintos de un conjugado de fármaco de anticuerpo de la invención. En algunos aspectos, la frase "que consta esencialmente de" excluye expresamente la inclusión de uno o más agentes activos adicionales distintos de un conjugado de fármaco de anticuerpo de la presente divulgación y un segundo agente co-administrado.

[0091] El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural, sintéticos, y no naturales, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican más tarde, por ejemplo, hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un ácido amino de origen natural, es decir, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Miméticos de aminoácidos se refieren a los

compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero funciona de manera similar que un aminoácido de origen natural.

[0092] El término "variante modificada de manera conservativa" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como a secuencias de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias particulares de ácidos nucleicos, las variantes modificadas conservadoramente se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas de ácido, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición donde se especifica una alanina mediante un codón, el codón se puede alterar a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es comúnmente el único codón para metionina, y TGG, que es comunmente el único codón para triptófano) puede ser modificado para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

[0093] Para las secuencias de polipéptidos, "variantes modificadas de manera conservativa" incluyen sustituciones individuales, deleciones o adiciones a una secuencia de polipéptidos lo cual da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservadora son en adición a y no excluyen

variantes polimórficas, homólogos entre especies, y alelos. Los siguientes ocho grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T), y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)). En algunos aspectos, el término "modificaciones de secuencia conservativas" se utiliza para referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan significativamente o alteran las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos.

[0094] El término "optimizado" como se utiliza en la presente se refiere a una secuencia de nucleótidos que ha sido alterada para codificar una secuencia de aminoácidos utilizando codones que son preferidos en la producción de células o un organismo, generalmente una célula eucariota, por ejemplo, una célula de levadura, una célula de Pichia, una célula micotica, una célula de Trichoderma, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada es diseñada para retener completamente o tanto como sea posible la secuencia de aminoácidos originalmente codificada por la secuencia de nucleótidos de partida, que también se conoce como la secuencia "precursora".

[0095] Los términos "idéntico por ciento" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refiere a la extensión a la cual dos o más secuencias o subsecuencias son la misma. Dos secuencias son "idénticas" si tienen la misma secuencia de aminoácidos o nucleótidos sobre la región que se compara. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, identidad de 60%, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad sobre una región especificada, o, cuando no se especifica, sobre toda la secuencia), cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima en una ventana de comparación, o región designada medida

utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe en una región que tiene al menos 30 nucleótidos aproximadamente (o 10 aminoácidos) de longitud, o más preferiblemente en una región que tiene de 100 a 500 o 1000 nucleótidos o más (o 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.

[0096] Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se compara las secuencias de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en una computadora, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Los parámetros predeterminados del programa pueden utilizarse, o pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula luego el porcentaje de las identidades de secuencia para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

[0097] Una "ventana de comparación", como se utiliza en la presente, incluye la referencia a un segmento de uno cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consta de 20 a 600, por lo general 50 a 200 aproximadamente, más habitualmente 100 a 150 aproximadamente en el cual una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias están alineadas óptimamente. Métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 c (1970), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 1988:2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group,

575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Brent, Current Protocols in Molécular Biology, 2003).

[0098] Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul, (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977; y Altschul *et al.*, Mol. Biol. 215:403, -410, 1990 respectivamente. El software para realizar el análisis BLAST está públicamente disponible a través del Centro Nacional de Información de Biotecnología. Este algoritmo implica primero la identificación de pares de secuencias de alta puntuación (HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que bien sea corresponden o satisfacen algunos puntajes T umbral de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T conocido como el umbral de puntuación de palabra adyacente (Altschul, Supra). Estas coincidencias de palabra adyacente inicial actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs más largos que los contienen. Los hits de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como la puntuación de alineación acumulativa pueda ser aumentada. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre> 0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre <0). Para secuencias de aminoácidos, una matriz de puntuación se utiliza para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X de su valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa ; o el final de cada secuencia es alcanzado. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T, y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) o 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas hebras. Para

secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas hebras.

[0099] El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:5873-5787, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0.2, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.01, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 0.001.

[00100] El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller, Comput. Appl. Biosci. 4:11-17, 1988) que se incorpora en el programa ALIGN (version 2.0), utilizando una tabla de residuo corporal PAM120 una penalización por longitud de brecha de 12 y una penalización por brecha de 4. Además, el porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoacidos se pueden determinar utilizando el algoritmo Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG, utilizando ya sea una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de brecha de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

[00101] Aparte de porcentaje de identidad de secuencia se indicó anteriormente, otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico tiene inmunológicamente reactividad cruzada con los anticuerpos dirigidos contra el

polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Así, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren sólo por sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación. Sin embargo, otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que los mismos cebadores pueden usarse para amplificar la secuencia.

[00102] El término "ácido nucleico" se usa en la presente de manera intercambiable con el término "polinucleótido" y se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos o enlaces de esqueleto modificado, que son sintéticos, de origen natural, y que se producen de forma no natural, que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de una manera similar a la nucleótidos de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, ribonucleótidos 2-O-metilo, ácidos péptido-nucleicos (PNA).

[00103] A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácidos nucleicos particular abarca también implícitamente variantes modificadas conservativamente de los mismos (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, como se detalla a continuación, sustituciones de codones degenerados se pueden conseguir por generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer, (1991) Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka et al., (1985) J. Biol. Chem. 260:2605-2608; y Rossolini *et al.*, (1994) Mol. Cell. Probes 8:91-98).

[00104] El término "operativamente unido" en el contexto de ácidos nucleicos se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos polinucleótidos (por ejemplo,

ADN). Típicamente, se refiere a la relación funcional de una secuencia reguladora transcripcional a una secuencia transcrita. Por ejemplo, una secuencia promotora o potenciadora está unida operativamente a una secuencia codificadora si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificadora en una célula hospedera apropiada u otro sistema de expresión. Generalmente, secuencias reguladoras transcripcionales promotoras que están unidas operativamente a una secuencia transcrita están físicamente contiguas a la secuencia transcrita, es decir, son de actuación cis. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras transcripcionales, tales como potenciadoras, no necesitan estar físicamente contiguas o situadas en las proximidades de las secuencias codificadoras cuya transcripción mejoran.

[00105] Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un correspondiente aminoácido natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. A menos que se indique otra cosa, una secuencia polipeptídica particular abarca también implícitamente variantes modificadas de manera conservativa de la misma.

[00106] El término "inmunoconjugado" o "conjugado de fármaco de anticuerpo" tal como se utiliza en la presente, se refiere a la unión de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo con otro agente, tal como una carga útil, fracción de fármaco, un agente quimioterapéutico, una toxina, un agente inmunoterapéutico, una sonda de regristo, y similares. La unión puede ser enlaces covalentes o interacciones no covalentes, tales como a través de fuerzas electrostáticas. Varios enlazadores, conocidos en la técnica, se pueden emplear con el fin de formar el inmunoconjugado. Además, el inmunoconjugado se puede proporcionar en la forma de una proteína de fusión que puede expresarse a partir de un polinucleótido que codifica el inmunoconjugado. Como se usa en el presente documento, "proteína de fusión" se refiere a las proteínas creadas a través de la unión de dos o más genes o fragmentos de genes que originalmente codifican

proteínas separadas (incluyendo péptidos y polipéptidos). La traducción del gen de fusión resulta en una única proteína con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales.

[00107] El término "sujeto" incluye animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, los mamíferos y no mamíferos, tales como los primates no humanos, ovejas, perros, vacas, gallinas, anfibios y reptiles. Excepto cuando se indica, los términos "paciente" o "sujeto" se usan en la presente de forma intercambiable.

[00108] El término “toxina,” "citotoxina", o "agente citotóxico" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier agente que es perjudicial para el crecimiento y la proliferación de las células y puede actuar para reducir, inhibir, o destruir una célula o malignidad.

[00109] El término "agente anti-cáncer" como se utiliza en la presente se refiere a cualquier agente que pueda usarse para tratar un trastorno proliferativo celular tal como cáncer, incluyendo pero sin limitar a agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, radioterapia y agentes radioterapéuticos, agentes cancerígenos dirigidos, y agentes inmunoterapéuticos.

[00110] El término "fracción de fármaco" o "carga útil" tal como se utiliza aquí se refiere a un fracción química que está conjugada con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, y puede incluir cualquier agente terapéutico o de diagnóstico, por ejemplo, un agente anti-cáncer, anti -inflamatorio, anti-infeccioso (ej., anti-fungico, anti-bacteriano, anti-parasitario, anti-viral), o un agente anestésico. En ciertos aspectos, una fracción de fármaco se selecciona a partir de un inhibidor de la V-ATPasa, un inhibidor de HSP90, un inhibidor de IAP, un inhibidor de mTOR, un estabilizador de microtúbulos, un desestabilizador de microtúbulos, una auristatina, un dolastatina, un maitansinoide, una MetAP (aminopeptidasa metionina), un inhibidor de la exportación nuclear de las proteínas CRM1, un inhibidor de DPPIV, un inhibidor de las reacciones de transferencia de fosforilo en la mitocondria, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inhibidor de

quinasa, un inhibidor de CDK2, un inhibidor de CDK9, un inhibidor del proteasoma, un inhibidor de la quinesina, un inhibidor de HDAC, un agente que daña el ADN, un agente alquilante de ADN, un intercalador de ADN, un de unión al surco menor del ADN y un inhibidor de la DHFR. Métodos para unir cada uno de estos a un enlazador compatible con los anticuerpos y método de la presente invención son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Singh, (2009) Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols, vol. 445-457. Methods and Protocols, vol. 525, 445-457. Además, una carga útil puede ser una sonda biofísica, un fluoróforo, un marcador de espín, una sonda de infrarrojos, una sonda de afinidad, un quelante, una sonda espectroscópica, una sonda radioactiva, una molécula lipídica, un glicol de polietileno, un polímero, una etiqueta de giro, ADN, ARN, una proteína, un péptido, una superficie, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una nanopartícula, un punto cuántico, un liposoma, una partícula de PLGA, un sacárido o un polisacárido.

[00111] El término "fracción de fármaco maitansinoide" significa la subestructura de un conjugado de fármaco con anticuerpo que tiene la estructura de un compuesto maitansinoide. Maitansina se aisló primero desde el arbusto Maytenus de África del oriental (Patente EE.UU. No. 3,896,111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (Patente de EE.UU. No. 4,151,042). Se han reportado maitansinol sintético y análogos de maitansinol. Veáse Patente Estadounidense Nos. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; y 4,371,533, y Kawai et al (1984) Chem. Pharm. Bull. 3441-3451), cada uno de los cuales se incorporan expresamente por referencia. Los ejemplos específicos de maitansinoides útiles para la conjugación incluyen DM1, DM3 y DM4.

[00112] El término "tumor" se refiere a crecimiento celular neoplásico y proliferación, ya sea maligno o benigno, y todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos.

[00113] El término "actividad anti-tumoral" significa una reducción en la tasa de proliferación de células tumorales, viabilidad o actividad metastásica. Una posible manera de mostrar la actividad anti-tumoral es mostrar una disminución en la tasa de crecimiento de las células tumorales, la estasis de tamaño del tumor o la reducción del tamaño del tumor. Tal actividad se puede evaluar usando modelos tumorales in vivo o in vitro aceptados, incluyendo pero no limitado a los modelos de xenoinjertos, modelos de aloinjertos, modelos MMTV, y otros modelos conocidos en la técnica para investigar la actividad anti-tumoral.

[00114] El término "neoplasia" se refiere a un tumor no benigno o un cáncer. El término "cáncer" incluye una neoplasia caracterizada por un crecimiento celular desregulado o no controlado. Cánceres ejemplares incluyen: los carcinomas, sarcomas, leucemias, y linfomas.

[00115] El término "cáncer" incluye tumores malignos primarios (por ejemplo, aquellos cuyas células no han migrado a sitios en el cuerpo del sujeto distintos del sitio del tumor original) y tumores malignos secundarios (por ejemplo, los derivados de metástasis, la migración de las células tumorales a sitios secundarios que son diferentes del sitio del tumor original).

[00116] El término "Cadherin 6" o "CDH6" se refiere a una molécula de adhesión celular que es un miembro de la familia de las cadherinas de moléculas de adhesión célula-célula. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de CDH6 son conocidas, y han sido publicadas en GenBank números de acceso AK291290 (número de acceso de proteína BAF83979.1) Ver también SEQ ID NO.: 1 para la secuencia humana de ADNc CDH6 y SEQ ID NO: 2 para la secuencia humana de proteína CDH6. Estructuralmente, el receptor CDH6 es una cadherina tipo II con cinco repeticiones de cadherina estructural y tiene en toda su longitud al menos aproximadamente 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEC ID NO: 2. Estructuralmente, una secuencia de ácidos nucleicos CHD6 tiene en toda su longitud al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID NO1.

[00117] Los términos "cáncer que expresa CDH6" o "cáncer CDH6 positivo" se refieren a un cáncer que expresa CDH6 y/o una forma mutante de CDH6 en la superficie de las células cancerosas.

[00118] Como se utiliza en la presente, los términos “tratar”, “que trata” o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere en un aspecto, a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, retardar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otro aspecto “tratar”, “que trata”, o “tratamiento” se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico incluyendo aquellos los que pueden ser no discernibles por el paciente. En aún otro aspecto, “tratar” o “que trata,” o tratamiento se refiere a modular la enfermedad o trastorno, bien sea físicamente, (ej., estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente, (ej., estabilización de un parámetro físico), o ambos. En aún otro aspecto, “tratar”, “que trata”, o “tratamiento” se refiere a prevenir o retardar el comienzo o desarrollo o progresión de la enfermedad o trastorno.

[00119] El término "cantidad terapéuticamente aceptable" o "dosis terapéuticamente eficaz" de manera intercambiable se refiere a una cantidad suficiente para efectuar el resultado deseado (es decir, una reducción en el tamaño del tumor, la inhibición del crecimiento del tumor, la prevención de la metástasis, la inhibición o la prevención de infecciones virales, bacterianas, fúngicas o parasitarias) En algunos aspectos, una cantidad terapéuticamente aceptable no induce o causa efectos secundarios indeseables. Una cantidad terapéuticamente aceptable puede determinarse mediante primero la administración de una dosis baja, y luego aumentando gradualmente esa dosis hasta que se logre el efecto deseado. Una "dosis profilácticamente eficaz," y

una "dosis terapéuticamente eficaz" de las moléculas de la presente divulgación pueden prevenir la aparición de, o resultar en una disminución en la gravedad de, respectivamente, síntomas de la enfermedad, incluyendo síntomas asociados con el cáncer.

[00120] El término "co-administrar" se refiere a la presencia simultánea de dos agentes activos en la sangre de un individuo. Los agentes activos que son administrados conjuntamente pueden ser concurrente o secuencialmente entregados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

[00121] La Figura 1 es una representación gráfica de la unión celular de los anticuerpos anti-CDH6 EC50 en las células OVCAR3.

[00122] La Figura 2 muestra epítopo binning de anticuerpos anti-CDH6.

[00123] La Figura 3 representa el mapeo de deuterio de los cinco dominios EC de CDH6.

[00124] La Figura 4 es la estructura cristalina de la unión de NOV0710 al dominio CDH6 EC5 superpuesta en la estructura conocida de la CDH2 ECD.

[00125] La Figura 5 representa la estructura cristalina de unión de NOV0712 a CDH6.

[00126] La Figura 6 representa la estructura cristalina de unión de NOV0710 a CDH6.

[00127] La Figura 7 es un ensayo ELISA que muestra la capacidad de tres anticuerpos anti-CDH6 para unirse a formas mutantes de CDH6.

[00128] La Figura 8 son datos FACS de anticuerpos anti-CDH6 ya sea no conjugados o conjugados con enlazador/carga útil de sulfo-SPDB-DM4 que se unen a líneas celulares CHO que expresan CDH6 humano, cynomolgus, de rata o ratón.

[00129] La Figura 9 son gráficos FACS que muestran los niveles de expresión de CDH6 en líneas celulares de cáncer de ovario, incluyendo líneas CDH6 transfectadas y líneas con ARNsi de CDh6 silenciado.

[00130] La Figura 10 muestra los anticuerpos anti-CDH6 ya sea no conjugados o conjugados con un enlazador/carga útil de sulfo-SPDB-DM4 en un panel de líneas celulares de cáncer de ovario.

[00131] La Figura 11 muestra la actividad in vitro de anticuerpos anti-CDH6 cuando se conjugan con DM1 o DM4 en líneas celulares de cáncer de ovario.

[00132] La Figura 12 muestra *la* actividad *in vitro* de los anticuerpos no conjugados anti-CDH6 o anticuerpos anti-CDH6 conjugados con sulfo-SPDB-DM4.

[00133] La Figura 13 demuestra la eficacia de los anticuerpos anti-CDH6 cuando se conjuga con DM1 y se prueba en un modelo de ratón con xenoinjerto de cáncer de ovario.

[00134] La Figura 14 demuestra la eficacia de los anticuerpos anti-CDH6 cuando se conjuga con DM1 y se prueba en un modelo de ratón con xenoinjerto de cáncer de ovario.

[00135] La Figura 15 muestra la eficacia de los anticuerpos anti-CDH6 cuando se conjuga SPDB-DM4 y se prueba en un modelo de ratón con xenoinjerto de cáncer de ovario.

[00136] La Figura 16 compara la eficacia de NOV0712-SPDB-DM4 y NOV0712-SMCC-DM1 en un modelo de ratón con xenoinjerto de cáncer de ovario.

[00137] La Figura 17 compara La eficacia de las combinaciones enlazador/carga NOV0712 con SPDB-DM4, sulfo-SPDB-DM4 y SMCC-DM1 en pacientes con un xenoinjerto primario derivado de un tumor (PTX) del modelo de cáncer de ovario de ratón.

[00138] La Figura 18 muestra la eficacia de diferentes dosis de NOV0712 cuando se conjugan a SPDB-DM4 o sulfo-SPDB-DM4 en un modelo de ratón con xenoinjerto de cáncer de ovario.

[00139] La Figura 19 compara NOV0712 con sulfo-SPDB-DM4 con combinaciones de carga enlazador SMCC-DM1 en un modelo de ratón de xenoinjerto de tumor ovario primario derivado del paciente.

[00140] La Figura 20 demuestra la eficacia *in vivo* de anticuerpos anti-CDH6 conjugados con sulfo-SPDB-DM4 en un modelo de ratón con xenoinjerto primario derivado de paciente de cáncer de ovario.

[00141] La Figura 21 demuestra la eficacia *in vivo* de anticuerpos anti-CDH6 conjugados con sulfo-SPDB-DM4 en un modelo de ratón con xenoinjerto primario derivado de paciente de cáncer de ovario.

[00142] La Figura 22 demuestra la eficacia *in vivo* de anticuerpos anti-CDH6 conjugados con sulfo-SPDB-DM4 en un modelo de ratón con xenoinjerto primario derivado de paciente de cáncer de ovario.

[00143] La Figura 23 demuestra la eficacia *in vivo* de anticuerpos anti-CDH6 conjugados con sulfo-SPDB-DM4 en un modelo de ratón con xenoinjerto primario derivado de paciente de cáncer de ovario.

[00144] La Figura 24 proporciona las puntuaciones de Sinergía de Loewe para la actividad de combinación de ADCs dirigidas a CDH6 con inhibidores de BCL2/BCL-Xl, BCL-Xl, IAP and MEK.

[00145] La Figura 25 es una representación gráfica de la expresión de ARNm de CDH6 en los tejidos cancerosos.

[00146] La Figura 26 es una representación gráfica de la expresión de proteínas CDH6 por inmunohistoquímica en cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer renal y el tejido colangiocarcinoma.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[00147] **Descripción detallada** La presente descripción proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno), y conjugados de fármacos con anticuerpos que se unen a CDH6. En particular, la presente divulgación se dirige a anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (ej., fragmentos de unión a antígeno) que se unen a CDH6, y se internalizan tras dicha unión. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (ej., fragmentos de unión al antígeno) de la presente divulgación se pueden utilizar para la producción de conjugados de fármacos con anticuerpos. Además, la presente divulgación proporciona conjugados de fármacos con anticuerpos que tienen características farmacocinéticas deseables y otros atributos deseables, y por lo tanto se pueden utilizar para tratar cáncer que expresa CDH6, sin limitación, por ejemplo: cáncer

de ovario, renal, hepático, de tejido suave, CNS, de tiroides y colagiocarcinoma. La presente divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de fármacos de anticuerpos, y métodos de preparación y uso de tales composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer.

Conjugados de Farmacos con Anticuerpos

[00148] La presente divulgación proporciona conjugados de fármacos con anticuerpos, donde un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o su equivalente funcional que se une específicamente a CDH6 está vinculado a una fracción de fármaco. En un aspecto, los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno o sus equivalentes funcionales están unidos, a través de unión covalente por un enlazador, a una fracción de fármaco que es un agente anti-cancerígeno. Los conjugados de fármacos con anticuerpos pueden liberar selectivamente una dosis efectiva de un agente anti-cancerígeno (ej., un agente citotóxico) a los tejidos tumorales que expresan CDH6, mediante lo cual se puede conseguir una mayor selectividad (y dosis eficaz más baja).

[00149] En un aspecto, la divulgación proporciona un inmunoconjugado de la Fórmula (I):

$$Ab\text{-}(L\text{-}(D)_m)_n$$

En los que Ab representa un anticuerpo de unión a CDH6 o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmento de unión a antígeno) descrito en la presente;

L es un enlazador;

D es una fracción farmacológica;

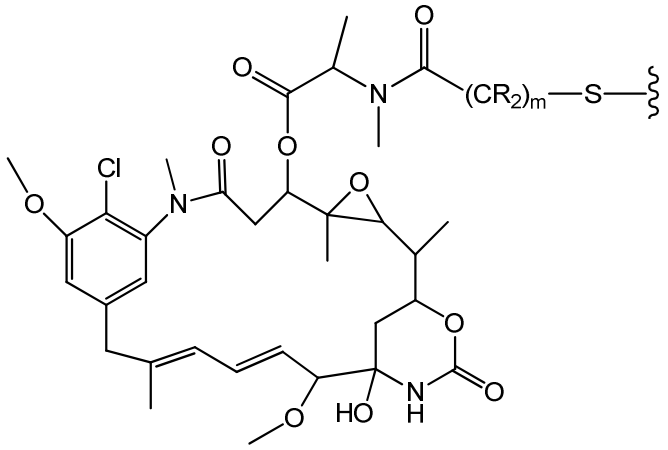
m es un entero de 1 a 8; y

n es un entero de 1 a 20. En un aspecto, n es un entero de 1 a 10, 2 a 8, o 2 a 5. En un aspecto específico, n es 3 a 4. En algunos aspectos, m es 1. En algunos aspectos, m es 2, 3 o 4.

[00150] Mientras que la relación de fracción de fármaco a anticuerpo tiene un valor entero exacto para una molécula conjugada específica (ej, n multiplicado por m en la Fórmula (I)), se entiende que el valor será a menudo un valor medio cuando se utiliza

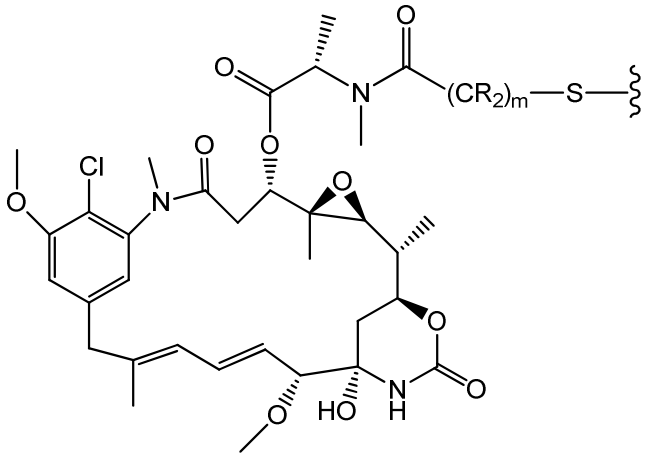
para describir una muestra que contiene muchas moléculas, debido a algún grado de falta de homogeneidad, típicamente asociado con la etapa de conjugación. La carga media de una muestra de un inmunoconjugado se denomina aquí como la relación de fracción de fármaco a anticuerpo, o "DAR." En el aspecto de maitansinoides, esto se puede referir como una proporción de maitansinoide a anticuerpo o "MAR". En algunos aspectos, el DAR está entre 1 y 5 aproximadamente, y típicamente está entre 3, 3.5, 4, 4.5 o 5. En algunos aspectos, al menos el 50% de una muestra en peso es compuesto que tiene el DAR promedio de más o menos 2, y preferiblemente al menos 50% de la muestra es un conjugado que contiene el DAR promedio más o menos 1. Otro aspecto incluye inmunoconjugados en donde el DAR es aproximadamente 3.5. En algunos aspectos, una DAR de 'aproximadamente n' significa que el valor medido para la DAR está dentro del 20% de n.

[00151] La presente divulgación proporciona inmunoconjugados que comprenden los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (ej., fragmentos de unión a antígeno) y sus equivalentes funcionales como se describe en la presente, ligados o conjugados a una fracción de fármaco. En un aspecto, la fracción farmacológica D es una fracción farmacológica de maitansinoide, incluyendo aquellos que tienen la estructura:

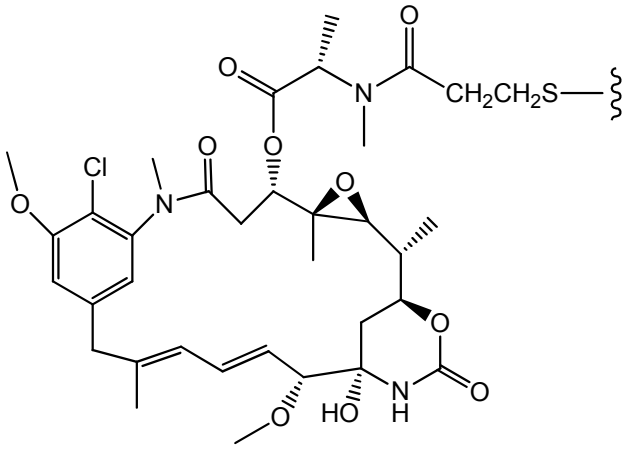


donde la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre del maitansinoide a un enlazador de un conjugado farmacológico de anticuerpos. R en cada caso es independientemente H o un alquilo C1-C6. La cadena de alquilen que une el grupo amida al átomo de sulfuro puede ser metanilo, etanilo, o propanilo, es decir, m es 1, 2 o 3. (Patente Estadounidense No. 633,410, la Patente de EE.UU. No. 5,208,020, Chari *et al*. (1992) Cancer Res. 52:127-131; Lui *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8618-8623).

[00152] Todos los estereoisómeros de la fracción del fármaco maitansinoide se contemplan para los inmunoconjugados divulgados, es decir. cualquier combinación de las configuraciones R y S en los carbonos quirales del maitansinoide. En un aspecto la fracción farmacológica maitansinoide tiene la siguiente estereoquímica.

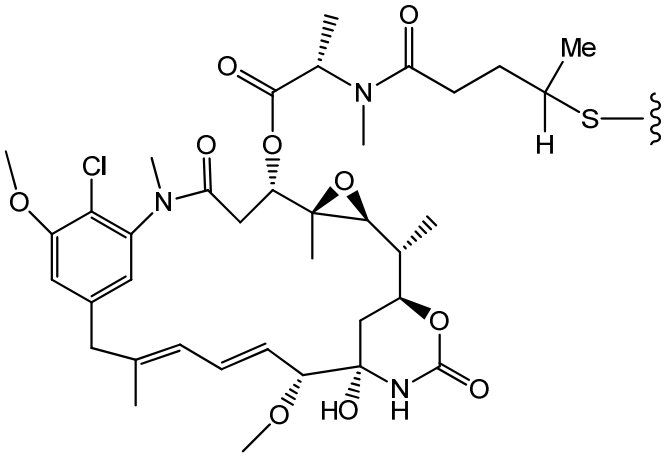


[00153] En un aspecto, la fracción del fármaco maitansinoide es $N^{2'}$-desacetil-$N^{2'}$-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (también conocida como DM1). DM1 está representada por la siguiente fórmula estructural.



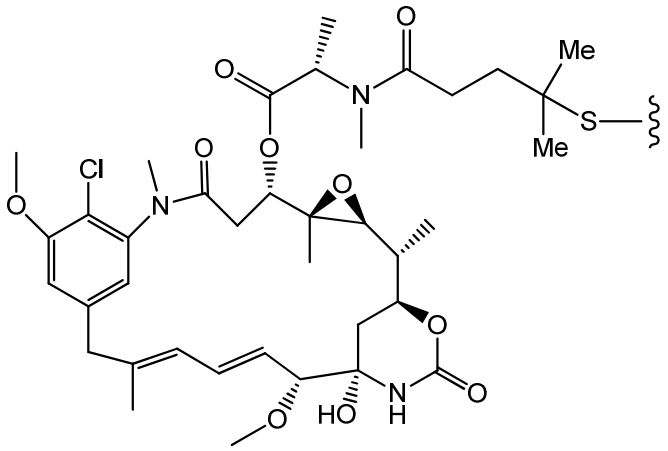
DM1

[00154] En un aspecto, la fracción del fármaco maitansinoide es $N^{2'}$-desacetil-$N^{2'}$-(4-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (también conocida como DM3). DM3 está representada por la siguiente fórmula estructural.



DM3

[00155] En otro aspecto, la fracción del fármaco maitansinoide es $N^{2'}$-desacetil-$N^{2'}$-(4-metil-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (también conocida como DM4). DM4 está representada por la siguiente fórmula estructural.



DM4

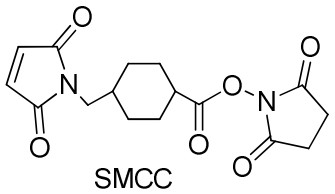
[00156] La porción de fármaco D puede estar unida con el anticuerpo Ab a través de un enlazador L. L es cualquier porción química capaz de enlazar el anticuerpo Ab a la fracción farmacológica D. El enlazador L une el anticuerpo Ab a la fracción de fármaco D a través de enlace(s) covalente(s). El reactivo enlazador es una fracción bifuncional o multifuncional que se puede usar para enlazar una fracción farmacológica D con un anticuerpo Ab para formar conjugados de fármaco con anticuerpos. Los conjugados de fármacos con anticuerpos se pueden preparar utilizando un enlazador que tiene una funcionalidad reactiva para la unión de una fracción farmacológica D y al anticuerpo Ab. Una cisteína, tiol o una amina, ej, N-terminal o cadena lateral de aminoácidos, tales como lisina del anticuerpo, pueden formar un enlace con un grupo funcional de un reactivo enlazador.

[00157] En un aspecto, L es un enlazador escindible. En otro aspecto, L es un enlazador no-escindible. En algunos aspectos, L es un enlazador lábil en medio ácido, enlazador foto-lábil, enlazador escindible de peptidasa, enlazador escindible de esterasa, un enlazador con un Puente disulfuro reducible, un enlazador hidrofílico, un enlazador procargado, o un enlazador de base de ácido dicarboxílico.

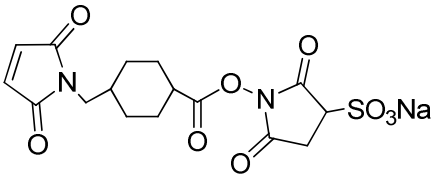
[00158] Reactivos entrecruzantes adecuados que forman un enlazador no escindible entre la fracción de fármaco D, por ejemplo maitansinoide, y el anticuerpo Ab son bien conocidos en la técnica, y pueden formar enlazadores no escindibles que

comprendan un átomo de azufre (tales como SMCC) o aquellos que no contengan un átomo de azufre. Los reactivos entrecruzantes preferidos que forman enlazadores no escindibles entre la fracción de fármaco D, por ejemplo maitansinoide, y el anticuerpo Ab comprenden una fracción basada en maleimido o haloacetilo. De acuerdo con la presente divulgación, se dice que tales enlazadores no escindibles se derivan de fracciones basadas en maleimido o haloacetilo.

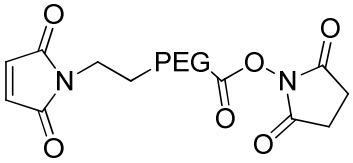
[00159] Los reactivos entrecruzantes que comprenden una fracción basada en maleimido incluyen, pero no se limitan a, N -succinimidil-4- (maleimidometil) ciclohexanocarboxilato (SMCC), 4- (N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC), *N* -succinimidil-4- (maleimidometil) ciclohexano-1-carboxi- (6-amidocaproato), que es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC-SMCC), éster N -succinimidilo del ácido -κ maleimidoundeconoico (KMUA), éster N -succinimidilo del ácido γ- maleimidobutírico (GMBS), éster N -succinimidilo del ácido ε maleimidocaproico (EMCS), éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster N- (α-maleimidoacetoxi)-succinimida (AMSA), succinimidil- (β-maleimidopropionamido) hexanoato (SMPH), N -succinimidIl-4- (p-maleimidofenil) butirato (SMPB), N-(p-maleomidofenil)isocianato (PMIP) y reactivos entrecruzantes basados en maleimido que contienen un separador de glicol de polietileno, tales como MAL-PEG-NHS. Estos reactivos entrecruzantes forman enlazadores no escindibles derivados de fracciones basadas en maleimido. Las estructuras representativas de reactivos entrecruzantes basadas en maleimido se muestran a continuación.



SMCC



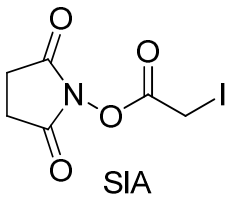
Sulfo-SMCC



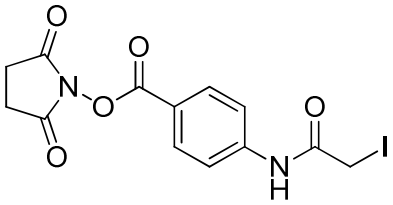
MAL-PEG-NHS

[00160] En otro aspecto , el enlazador L se deriva de N-succinimidil-4-(maleimidometil) ciclohexanocarboxilato (SMCC), sulfosuccinimidil 4 - (N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) o MAL-PEG-NHS.

[00161] Reactivos entrecruzantes que comprenden una fracción basada en haloacetilo incluyen yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), N-succinimidil (4-yodoacetil) aminobenzoato (SIAB), bromoacetato de N-succinimidilo (SBA) y N-succinimidil 3 - (bromoacetamido) propionato de etilo (SBAP). Estos reactivos entrecruzantes forman enlazadores no escindibles derivados de fracciones basadas en haloacetilo. Las estructuras representativas de reactivos entrecruzantes basadas en haloacetilo se muestran a continuación.



SIA



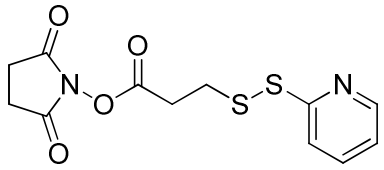
SIAB

o

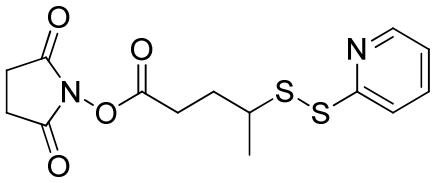
[00162] En un aspecto, el enlazador L se deriva a partir de N-succinimidilo yodoacetato (SIA) o N-succinimidil (4-yodoacetil) aminobenzoato (SIAB).

[00163] Reactivos entrecruzante adecuados que forman un enlazador escindible entre la fracción farmacológica D, por ejemplo maitansinoide, y el anticuerpo Ab son bien conocidos en la técnica. Enlazadores que contienen disulfuro son enlazadores escindibles a través de intercambio de disulfuro, que pueden ocurrir en condiciones fisiológicas. De acuerdo con la presente divulgación, se dice que tales enlazadores

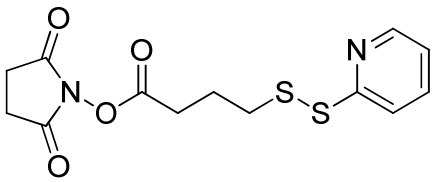
escindibles se derivan de fracciones basadas en disulfuro. Reactivos entrecruzantes de disulfuros adecuados incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP),N-succinimidil-4-(2-piridilditio) pentanoato (SPP), N-succinimidil-4-(2-piridilditio) butanoato (SPDB) y *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)2-sulfo-butanoato de metilo (sulfo-SPDB), cuyas estructuras se muestran a continuación. Estos reactivos entrecruzantes forman enlazadores escindibles derivados de fracciones basadas en disulfuro.



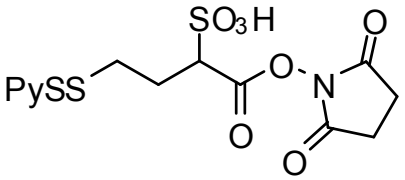
N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP),



N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP),



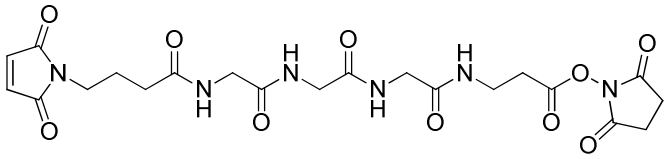
N-succinimidil-4-(2-piridilditio) butanoato (SPDB) y



N-Succinimidil-4-(2-piridilditio)2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB).

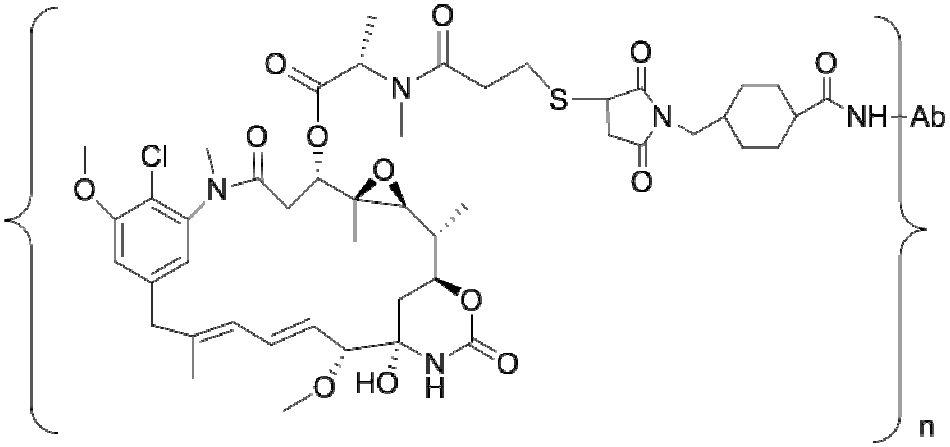
[00164] En un aspecto, el enlazador L se deriva a partir de N-succinimidil-4-(2-piridilditio)2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB).

[00165] Reactivos entrecruzante adecuados que forman un enlazador cargado entre la fracción farmacológica D, por ejemplo maitansinoide, y el anticuerpo Ab se conocen como reactivos entrecruzantes procargados. En un aspecto, el enlazador L se deriva del reactivo entrecruzante procargado CX1-1. La estructura de CX1-1 se encuentra a continuación.

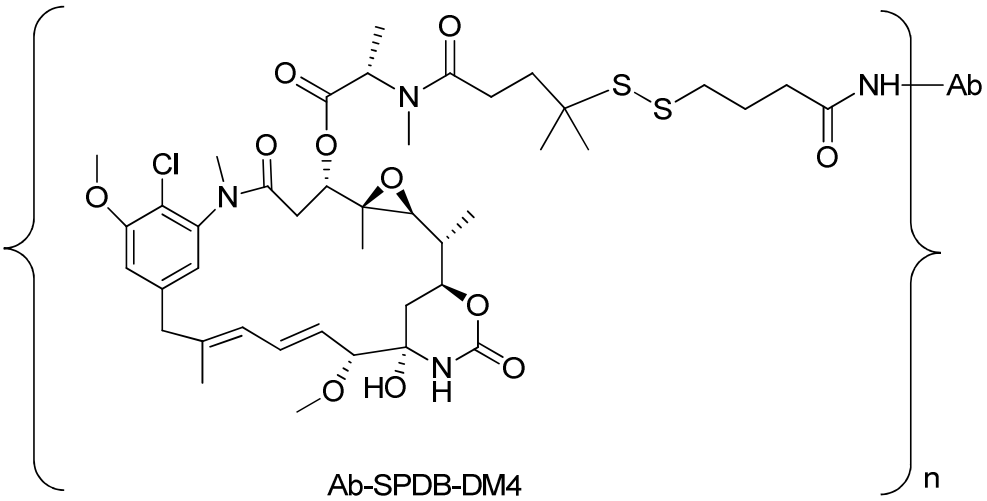


2,5-dioxopirrolidin-1-il 17-(2,5-dioxo-2 ,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5,8,11,14-tetraoxo-4, 7,10,13-tetraazaheptadecan-1-oato (CX1-1)

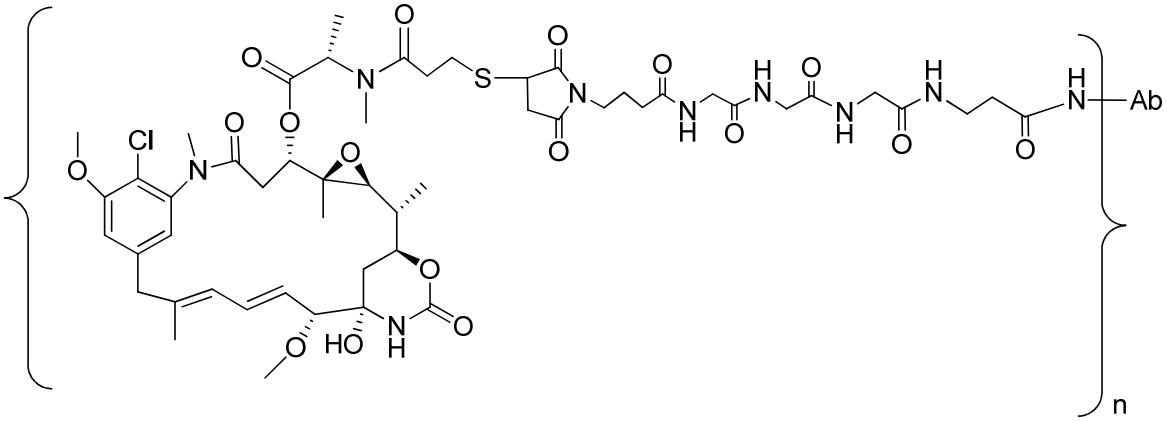
[00166] En un aspecto proporcionado por la divulgación, el conjugado está representado por cualquiera de las siguientes fórmulas estructurales



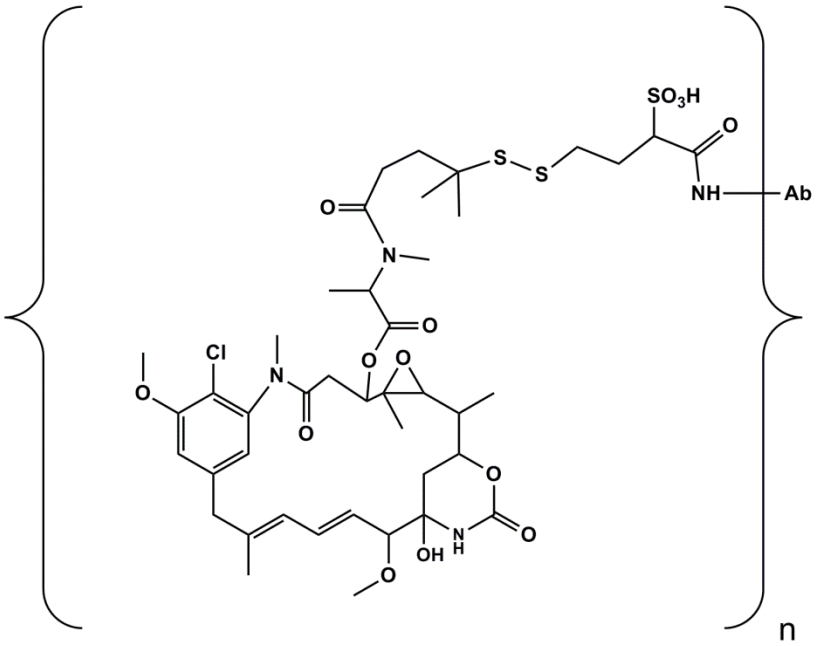
Ab-MCC-DM1



Ab-SPDB-DM4



Ab-CX1-1-DM1



Ab-sulfo-SPDB-DM4

[00167] en donde:

[00168] Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CDH6 humano;

[00169] n, que indica el número de grupos D-L fijados al Ab a través de la formación de un enlace de amida con una amina primaria del Ab, es un número entero de 1 a 20. En un aspecto, n es un entero de 1 a 10, 2 a 8, o 2 a 5. En un aspecto específico, n es 3 a 4.

[00170] En una modalidad, la relación molar media de fármaco (*por ejemplo*, DM1 o DM4) al anticuerpo en el conjugado (*es decir*., el valor promedio de n, también conocido como Relación de Anticuerpo de Maitanisnoide (MAR)) es de 1 a 10 aproximadamente, 2 a 8 aproximadamente (*por ejemplo*,1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 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, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, o 8.1), 2,5 a 7 aproximadamente, 3 a 5

aproximadamente, 2,5 a 4,5 aproximadamente (*por ejemplo*, aproximadamente 2,5, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,7, aproximadamente 2,8, aproximadamente 2,9, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5), de 3,0 a 4,0 aproximadamente, de 3,2 a 4,2 aproximadamente, o de 4,5 a 5,5 aproximadamente (*por ejemplo*, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,1, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,3, aproximadamente 5,4, o aproximadamente 5,5).

[00171] En un aspecto proporcionado por la divulgación, el conjugado tiene sustancialmente alta pureza y una o más de las siguientes características: (a) mayor de aproximadamente 90% (ej., mayor o igual a aproximadamente 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%), preferiblemente mayor que aproximadamente 95% de las especies conjugadas son monoméricas, (b) nivel de enlazador no conjugado en la preparación de conjugado es menor que aproximadamente 10% (ej., menos de o igual a aproximadamente 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, o 0%) (en relación con enlazador total), (c) menos de 10% de las especies conjugadas están entrecruzadas (ej., menos o igual a aproximadamente 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, o 0%), (d) la fracción de fármaco libre (ej., DM1 o DM4) en la preparación del conjugado es menor que aproximadamente 2% (ej., menos de o igual a aproximadamente 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1,0%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1 % o 0%) (mol/mol con respecto al total del agente citotóxico).

[00172] Como se usa en la presente, el término "enlazador no conjugado" se refiere al anticuerpo que se une covalentemente con un enlazador derivado de un reactivo entrecruzado (ej., SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-o SPDB CX1-1), en el que el anticuerpo no está acoplado covalentemente a la fracción de fármaco (ej., DM1 o DM4) a

través de un enlazador (es decir, el "enlazador no conjugado" se puede representar por Ab-MCC, Ab-SPDB, Ab-sulfo-SPDB, o Ab-CX1-1).

1. Fracción farmacológica

[00173] La presente divulgación proporciona inmunoconjugados que se unen específicamente a CDH6. Los inmunoconjugados de la presente divulgación comprenden anticuerpos anti-CDH6, fragmentos de anticuerpos (ej., Fragmentos de unión de antígeno) o equivalentes funcionales que se conjugan a una fracción farmacológica, ej., un agente anti-cancerígeno, agente de trastorno anti-hematológico, un agente de tratamiento autoinmune, un agente anti-inflamatorio, un agente antifúngico, un agente antibacteriano, un agente anti-parasitario, un agente anti-viral, o un agente anestésico. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales pueden conjugarse con varios fracciones farmacológicas idénticas o diferentes utilizando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica.

[00174] En ciertos aspectos, se selecciona la fracción farmacológica de los inmunoconjugados de la presente divulgación a partir de un grupo compuesto por: un maitansinoide, un inhibidor de la V-ATPasa, un agente pro-apoptótico, un inhibidor de Bcl2, un inhibidor MCL1, un inhibidor de la HSP90, un inhibidor de IAP, un inhibidor de mTor, un estabilizador de microtúbulos, un desestabilizador de microtúbulos, una auristatina, una dolastatina, una MetAP (aminopeptidasa metionina), un inhibidor de la exportación nuclear de las proteínas CRM1, un inhibidor de DPPIV, inhibidores del proteasoma, un inhibidor de las reacciones de transferencia de fosforilo en mitocondrias, un inhibidor de síntesis de proteínas, un inhibidor de quinasa, un inhibidor de CDK2, un inhibidor de CDK9, un inhibidor de quinesina, un inhibidor de HDAC, un agente dañino de ADN, un agente alquilante de ADN, un intercalador de ADN, un enlazador de ranura menor de ADN y un inhibidor de la DHFR .

[00175] En un aspecto, la fracción farmacológica de los inmunoconjugados de la presente divulgación es una fracción farmacológica de maitansinoide, tal como, pero no limitado a, DM1, DM3, o DM4.

[00176] Además, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente divulgación se pueden conjugar a una fracción farmacológica que modifique una respuesta biológica dada. Las fracciones farmacológicas no se deben interpretar como limitadas a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción farmacológica puede ser una proteína, péptido o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, toxina del cólera o toxina diftérica, una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, α-interferón, β-interferón, factor de crecimiento de nervios, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, una citoquina, un agente apoptótico, un agente anti-angiogénico, o, un modificador de respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfoquina.

[00177] En un aspecto, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (ej., Fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente divulgación se conjugan con una fracción farmacológica, tal como una citotoxina, un fármaco (ej., un inmunosupresor) o una radiotoxina. Ejemplos de citotoxina incluyen, pero no se limitan a, taxanos (ver, por ejemplo, Solicitud de Patente Internacional (PCT) Nº WO 01/38318 y PCT/US03/02675), agentes alquilantes de ADN (por ejemplo, análogos de CC-1065), antraciclinas, análogos de tubulisina, análogos de duocarmicina, auristatina E, auristatina F, maitansinoides, y agentes citotóxicos que comprende una fracción de polietilenglicol reactiva (véase, ej., Sasse et al., J. Antibiot. (Tokio), 53, 879-85 (2000), Suzawa *et al,* Bioorg. Med. Chem., 8, 2175-84 (2000), Ichimura *et al., J. Antibiot.* (Tokyo), 44, 1045-53 (1991), Francisco *et al.*, Blood 2003 15;102(4):1458-65), U.S. Pat. Nos. 5,475,092, 6,340,701, 6,372,738, y 6,436,931, Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 2001/0036923 Al, Solicitud de Patente Estadounidense Pendiente Ser. Nos. 10/024,290 y 10/116,053, y Solicitud de Patente Internacional (PCT) No. WO 01/49698), taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina,

dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes paliativos (ej., mecloretamina, tiotepa clorambucil, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) cisplatino (DDP), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (ej., vincristina y vinblastina). (Véase, por ejemplo, Seattle Genetics US20090304721).

[00178] Otros ejemplos de citotoxinas que pueden conjugarse con anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente divulgación incluyen duocarmicinas, calicheamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas.

[00179] Varios tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos a anticuerpos son conocidos en la técnica, véase, ej., Saito, (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail *et al,* (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan y Kreitman, (2002) Curr. Opin. Investig. Fármacos 3:-1091; Senter y Springer, (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264.

[00180] Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (ej., Fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente divulgación también pueden conjugarse con un isótopo radioactivo para generar radiofármacos citotóxicos, referidos como radioinmunoconjugados. Ejemplos de isótopos radiactivos que se pueden conjugar con anticuerpos para uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero no se limitan a, yodo-131, indio-111, itrio-90, y lutetio-177. Métodos para la preparación de radioinmunoconjugados están establecidos en la técnica. Ejemplos de

radioinmunoconjugados están comercialmente disponibles, incluyendo Zevalin™ (DEC Pharmaceuticals) y Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), y métodos similares se pueden utilizar para preparar radioinmunoconjugados utilizando los anticuerpos divulgados en la presente. En ciertos aspectos, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N ', N", N'"-tetraacético (DOTA) el cual puede conectarse al anticuerpo a través de una molécula de enlace. Tales moléculas de enlace son comúnmente conocidas en la técnica y se describen en Denardo, (1998) Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson *et al,* (1999) Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; y Zimmerman *et al,* (1999) Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50, cada uno incorporado por referencia en su totalidad.

[00181] Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (ej., fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente divulgación también pueden conjugarse a una proteína heteróloga o polipéptido (o fragmento de la misma, preferiblemente a un polipéptido de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50 , al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. En particular, la presente divulgación proporciona proteínas de fusión que comprenden un fragmento de anticuerpo (ej., Fragmento de unión a antígeno) descrito en el presente documento (ej., un fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F (ab) 2, un dominio VH, una CDR VH, un dominio VL o un CDR VL) y una proteína heteróloga, polipéptido o péptido.

[00182] Proteínas de fusión adicionales pueden generarse a través de las técnicas de transposiciones genéticas, transposiciones de motivos, transposiciones de exones, y/o transposiciones de codones (denominadas de manera colectiva “transposiciones de ADN”). Las transposiciones de ADN pueden emplearse para alterar las actividades de los anticuerpos de la presente divulgación o fragmentos de los mismos (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos con afinidades mayores y tasas de disociación menores). Ver, generalmente, Patentes Estadounidenses Nos. 5,605,793, 5,811,238, 5,830,721, 5,834,252, y 5,837,458; Patten, (1997), Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33; Harayama, (1998) Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson, 1999, J. Mol. Biol. 287:265-

76, y Lorenzo y Blasco, (1998) Biotechniques 24 (2): 308 - 313 (cada una de estas patentes y publicaciones se incorporan en la presente como referencia en su totalidad). Los anticuerpos o fragmentos de los mismos, o los anticuerpos codificados o fragmentos de los mismos, pueden ser alterados al ser sometidos a mutagénesis aleatoria por PCR propensa a errores, inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos antes de la recombinación. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a un antigeno puede ser recombinado con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

[00183] Además, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (ej., Fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente divulgación se pueden conjugar con secuencias marcadoras, tales como un péptido, para facilitar la purificación. En aspectos preferidos, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz *et al,* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86:821-824, por ejemplo, hexa-histidina proporciona purificación conveniente de la proteina de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta de hemaglutinina ("HA"), que corresponde a un epítopo derivado de la proteína hemaglutinina de la influenza (Wilson, (1984) Cell 37:767), y la etiqueta "bandera" (A. Einhauer, J. Biochem. Biophys. Methods 49: 455-465, 2001). Como se describe en la presente divulgación, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno también se pueden conjugar con péptidos que penetran el tumor con el fin de mejorar su eficacia.

[00184] En otros aspectos, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (ej, fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente divulgación se conjugan a un agente de diagnóstico o detectable. Tales inmunoconjugados pueden ser útiles para monitorear o pronosticar el inicio, desarrollo, progresión y/o gravedad de una enfermedad o trastorno como parte de un procedimiento de ensayo clínico, tal como la

determinación de la eficacia de una terapia particular. Tal diagnóstico y detección se puede lograr mediante el acoplamiento de los anticuerpos a sustancias detectables incluyendo, pero no limitando a, enzimas diversas, tales como, pero no limitadas a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero no limitados a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no limitados a, Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 500, Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 750, umbeliferona, fluoresceína , isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero no limitados a, el luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero no limitados a, la luciferasa, luciferina, y aequorina; materiales radiactivos, tales como, pero no limitados a, yodo (131I, 125I, 123I,y 121I), carbono (14C), azufre (35S), tritio (3H), indio (115In, 113In, 112In,y 111In), tecnecio (99Tc) , talio (201Ti), galio (68Ga, 67Ga), paladio (103Pd), molibdeno (99Mo), el 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, 64Cu, 113Sn y 117Sn; y emisor de positrones metales utilizando diversas tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos .

[00185] Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente divulgación también pueden estar unidos a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

2. Enlazador

[00186] Como se usa en la presente, un "enlazador" es cualquier fracción química que es capaz de enlazar un anticuerpo, fragmento de anticuerpo (ej., fragmentos de unión a antígeno) o equivalente funcional a otra fracción, tal como una fracción de fármaco. Los enlazadores pueden ser susceptibles a escisiones (enlazador escindible), tales como, la escisión inducida por ácido, la escisión foto-inducida, la escisión inducida por peptidasa, la escisión inducida por esterasa, y la escisión del enlace disulfuro, en condiciones en las que el compuesto o el anticuerpo permanecen activos. Alternativamente, los enlazadores pueden ser sustancialmente resistentes a la escisión (ej., enlazador estable o enlazador no escindible). En algunos aspectos, el enlazador es un enlazador procargado, un enlazador hidrofílico, o un enlazador en bace de ácido dicarboxílico.

[00187] En un aspecto, el enlazador utilizado se deriva de un reactivo entrecruzante tal como N-succinimidilo-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), N-succinimidilo 4-(2-piridilditio) pentanoato (SPP), N-succinimidilo 4-(2-piridilditio) butanoato (SPDB), N-succinimidilo-4-(2-piridilditio)-2-sulfo-butanoato de metilo (sulfo-SPDB), Yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), N-succinimidilo (4-yodoacetil) aminobenzoato (SIAB), maleimida de PEG NHS, N-succinimidilo 4-(maleimidometil) ciclohexanocarboxilato (SMCC), N-sulfosuccinimidilo 4-(maleimidometil) ciclohexanocarboxilato (sulfo-SMCC) o 2,5-dioxopirrolidin-1-il 17-(2,5-dioxo-2, 5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5,8,11,14-tetraoxo-4 ,7,10,13-tetraazaheptadecan-1-oato (CX1-1). En otro aspecto, el enlazador utilizado se deriva de un agente de entrecruzamiento tal como N-succinimidil-3- (2-piridilditio) propionato (SPDP), N-succinimidil 4- (maleimidometil) ciclohexanocarboxilato (SMCC), N-sulfosuccinimidil 4 - (maleimidometil) ciclohexanocarboxilato (sulfo-SMCC), N - succinimidyl-4- (2-piridilditio) -2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB) o 2,5-dioxopirrolidin-1-il 17-(2,5- dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il) -5,8,11,14-tetraoxo-4,7,10,13-tetraazaheptadecan-1-oato (CX1-1).

[00188] Enlazadores no escindibles son cualquier fracción química capaz de enlazar una fracción de fármaco, como un maitansinoide, a un anticuerpo de una manera

covalente estable y no entra en las categorías enumeradas anteriormente para enlazadores escindibles. Por lo tanto, los enlazadores no escindibles son sustancialmente resistentes a la escisión inducida por ácido, escisión foto-inducida, escisión inducida por división peptidasa, escisión inducida por división esterasa y la escisión del enlace disulfuro. Adicionalmente, no escindible se refiere a la capacidad del enlace químico en el enlazador o contiguo al enlazador para soportar la escisión inducida por un agente de escisión ácido fotolábil, una peptidasa, una esterasa, o un compuesto químico o fisiológico que escinde un enlace de disulfuro, en condiciones en las que la fracción de fármaco, tal como un maitansinoide o el anticuerpo no pierden su actividad.

[00189] Enlazadores lábiles en medio ácido son enlazadores escindibles a pH ácido. Por ejemplo, ciertos compartimientos intracelulares, tales como los endosomas y lisosomas, tienen un pH ácido (pH 4-5), y proporcionan las condiciones adecuadas para escindir los enlazadores lábiles de medio ácido.

[00190] Los enlazadores foto lábiles son enlazadores que son útiles en la superficie del cuerpo y en muchas cavidades del cuerpo que son accesibles a la luz. Además, la luz infrarroja puede penetrar el tejido.

[00191] Algunos enlazadores pueden ser escindidos por peptidasas, es decir, de enlazadores escindibles de peptidasa. Sólo ciertos péptidos se escinden fácilmente dentro o fuera de las células, ver por ejemplo, Trout et al., 79 Proc. Natl. Acad.Sci. EE.UU., 626-629 (1982) y Umemoto et al. 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989). Además, los péptidos están compuestos de aminoácidos-α y enlaces peptídicos, que son químicamente enlaces de amida entre el carboxilato de un aminoácido y el grupo amino de un segundo aminoácido. Se entiende que otros enlaces amida, tales como la unión entre un carboxilato y el grupo amino-□ de la lisina, no son enlaces peptídicos y se consideran no escindibles.

[00192] Algunos enlazadores pueden ser escindidos por peptidasas, es decir, enlazadores escindibles de peptidasa. Una vez más, sólo ciertos ésteres pueden ser escindidos por esterasas presentes en el interior o exterior de las células. Los ésteres se

forman por la condensación de un ácido carboxílico y un alcohol. Ésteres simples son ésteres producidos con alcoholes simples, tales como alcoholes alifáticos, alcoholes aromáticos pequeños y alcoholes cíclicos pequeños.

[00193] Los enlazadores procargados se derivan de los reactivos entrecruzantes cargados que conservan su carga después de su incorporación a un conjugado de fármaco anticuerpo. Ejemplos de enlazadores procargados se pueden encontrar en EE.UU. 2009/0274713.

3. Conjugación y Preparación de ADCs

[00194] Los conjugados de la presente divulgación se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en la patente de EE.UU. Nº 7.811.572, 6.411.163, 7.368.565, y 8.163.888, y publicaciones de solicitudes estadounidenses 2011/0003969, 2011/0166319, 2012/0253021 y 2012/0259100. Todas las enseñanzas de estas publicaciones de patentes y solicitudes de patentes se incorporan en la presente por referencia.

Proceso de una etapa

[00195] En un aspecto, los conjugados de la presente divulgación se pueden preparar mediante un proceso de una etapa. El proceso comprende combinar el anticuerpo, fármaco y el agente entrecruzante en un medio sustancialmente acuoso, que contiene opcionalmente uno o más co-disolventes, a un pH adecuado. En un aspecto, el proceso comprende la etapa de poner en contacto el anticuerpo de la presente invención con un fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) para formar una primera mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco, y luego poner en contacto la primera mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco con un agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1) en una solución que tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 para proporcionar una mezcla que comprende (i) el conjugado (por ejemplo, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 o Ab-CX1-1-DM1), (ii) el fármaco libre (por ejemplo, DM1 o DM4), y (iii) los subproductos de reacción.

[00196] En un aspecto, el proceso de una etapa comprende poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) y luego el agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1) en una solución que tiene un

pH de aproximadamente 6 o mayor (por ejemplo, 6 a 9 aproximadamente, 6 a 7 aproximadamente , 7 a 9 aproximadamente,7 a 8,5 aproximadamente , 7,5 a 8,5 aproximadamente, 7,5 a 8,0 aproximadamente , 8,0 a 9,0 aproximadamente o 8,5 a 9,0 aproximadamente). Por ejemplo, el proceso comprende poner en contacto un agente de unión a células con el fármaco (DM1 o DM4) y luego el agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1) en una solución que tiene un pH de aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,1, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,3, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8 , aproximadamente 6,9, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,6, aproximadamente 7,7, aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,1, aproximadamente 8,2, aproximadamente 8,3, aproximadamente 8,4, aproximadamente 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, aproximadamente 8,9 o aproximadamente 9,0. En otro aspecto, el proceso comprende poner en contacto un agente de unión a células con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) y luego el agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1) en una solución que tiene un pH de aproximadamente 7,8 (por ejemplo, un pH de 7,6 a 8,0 o un pH de 7.7 a 7.9).

[00197] El proceso de una etapa (es decir, poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) y entonces el agente de reticulación (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CXL-1) se puede llevar a cabo a cualquier temperatura adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, el proceso de un solo paso puede ocurrir a aproximadamente 20 º C o menos (por ejemplo, aproximadamente -10° C (a condición de que se prevenga la congelación de la solución, ej., por la presencia de disolvente orgánico utilizado para disolver el agente citotóxico y el reactivo entrecruzante bifuncional) a aproximadamente 20° C, 0° C a 18º C aproximadamente, 4º C a 16° C aproximadamente), a temperatura ambiente (ej., 20º C a 30° C aproximadamente o 20° C a 25° C aproximadamente), o a una temperatura elevada (ej., 30° C a 37° C aproximadamente). En un aspecto, el proceso de una etapa se produce a una temperatura de 16° C a 24° C aproximadamente (por ejemplo, 16° C aproximadamente, 17° C aproximadamente, 18° C aproximadamente, 19° C aproximadamente, 20° C

aproximadamente, 21° C aproximadamente, 22° C aproximadamente, 23° C aproximadamente, 24° C aproximadamente, o 25° C aproximadamente). En otro aspecto, el proceso de una etapa se realiza a una temperatura de aproximadamente 15° C o menos (por ejemplo, -10° C a 15° C aproximadamente, o 0º C a 15° C aproximadamente). Por ejemplo, el proceso comprende poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) y luego el agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1) a una temperatura de aproximadamente 15 ° C, aproximadamente 14 ° C, aproximadamente 13 ° C, aproximadamente 12 ° C, aproximadamente 11 ° C, aproximadamente 10 ° C , aproximadamente 9 º C, aproximadamente 8 º C, aproximadamente 7 º C, aproximadamente 6 º C, aproximadamente 5 º C, aproximadamente 4 º C, aproximadamente 3 ° C, aproximadamente 2 º C, aproximadamente 1 º C, aproximadamente 0 ° C , aproximadamente -1 ° C, aproximadamente -2 ° C, aproximadamente -3 º C, aproximadamente -4 ° C, aproximadamente -5 ° C, aproximadamente -6 ° C, aproximadamente -7 ° C, aproximadamente 8 º C, aproximadamente - 9 ° C, o aproximadamente -10 º C, a condición de que se evite que la solución se congele, por ejemplo, por la presencia de disolvente orgánico(s) utilizado para disolver el agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, sulfo-SPDB SPDB, o CX1-1). En un aspecto, el proceso comprende poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (ej., DM1 o DM4) y luego el agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CXL-1) a una temperatura de -10° C a 15° C aproximadamente, 0° C a 15º C aproximadamente, 0° C a 10º C aproximadamente, 0° C a 5° C aproximadamente, 5º C a 15º C aproximadamente, 10° C a 15° C aproximadamente, o 5° C a 10º C aproximadamente . En otro aspecto, el proceso comprende poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (ej., DM1 o DM4) y luego el agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CXL-1) a una temperatura de 10° C aproximadamente (ej., una temperatura de 8° C a 12° C o una temperatura de 9° C a 11° C).

[00198] En un aspecto, la puesta en contacto descrita anteriormente se efectúa al proporcionar el anticuerpo, luego poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) para formar una primera mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) y, luego, poner en contacto la primera mezcla que

comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) con el agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1). Por ejemplo, en un aspecto, el anticuerpo se proporciona en un recipiente de reacción, el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) se añade al recipiente de reacción (mediante lo cual se pone en contacto el anticuerpo), y luego el agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1) se añade a la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) (mediante lo cual se pone en contacto la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco). En un aspecto, el anticuerpo se proporciona en un recipiente de reacción, y el fármaco (ej., DM1 o DM4) se añade al recipiente de reacción inmediatamente después de proporcionar el anticuerpo al recipiente. En otro aspecto, el anticuerpo se proporciona en un recipiente de reacción, y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) se añade al recipiente de reacción después de un intervalo de tiempo siguiente proporcionando el anticuerpo al recipiente (por ejemplo, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1 día o más después de proporcionar el agente de unión a células al espacio). El fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) se pueden añadir rápidamente (es decir, dentro de un intervalo de tiempo corto, tal como aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos) o lentamente (por ejemplo, mediante el uso de una bomba).

[00199] La mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) puede luego ponerse en contacto con el agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1) ya sea inmediatamente después de poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) o en algún momento posterior (por ejemplo, aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 8 horas o más) después de poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4). Por ejemplo, en un aspecto, el agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1) se añade a la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) inmediatamente después de la adición del fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) al recipiente de reacción que comprende el anticuerpo. Alternativamente, la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) puede ponerse en contacto con el agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC,

sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1) en aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas o más después de poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4).

[00200] Después de que la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) se pone en contacto con el agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1) se permite que la reacción proceda durante aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, o más tiempo (por ejemplo, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 45 horas, o aproximadamente 48 horas).

[00201] En un aspecto, el proceso de una etapa comprende además una etapa de inactivación para inactivar cualquier fármaco sin reaccionar (por ejemplo, DM1 o DM4) y/o agente entrecruzante sin reaccionar (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1). La etapa de inactivación se realiza típicamente antes de la purificación del conjugado. En un aspecto, la mezcla se inactivó al poner en contacto la mezcla con un reactivo de inactivación. Como se usa en la presente, el “reactivo de inactivación” se refiere a un reactivo que reacciona con el fármaco libre (por ejemplo, DM1 o DM4) y/o agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1). En un aspecto, los reactivos inactivadores de maleimida o haloacetamida, tales como el ácido 4-maleimidobutírico, ácido 3-maleimidopropiónico, N-etilmaleimida, yodoacetamida, o ácido iodoacetamidopropiónico, se pueden utilizar para asegurar que cualquier grupo sin reaccionar (tal como tiol) en el fármaco (ej., DM1 o DM4) se apaga. La etapa de inactivación puede ayudar a prevenir la dimerización del fármaco (por ejemplo, DM1). El

DM1 dimerizado puede ser difícil de eliminar. Tras la inactivación con reactivos polares cargados inactivados por tiol, (tales como ácido 4 – maleimidobutírico o ácido 3-maleimidopropiónico), el exceso de DM1 sin reaccionar se convierte en un aducto cargado polar soluble en agua que se puede separar fácilmente del conjugado enlazado de manera covalente durante la etapa de purificación. También se puede utilizar inactivación con reactivos inactivados por tiol no polar y neutral. En un aspecto, la mezcla se apaga al poner en contacto la mezcla con un reactivo de extinción que reacciona con el agente entrecruzante sin reaccionar (ej., SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1). Por ejemplo, nucleófilos se pueden añadir a la mezcla con el fin de inactivar cualquier SMCC sin reaccionar. El nucleófilo es preferiblemente un grupo amino que contiene nucleófilo, tal como lisina, taurina e hidroxilamina.

[00202] En otro aspecto, se dejó que la reacción (es decir, poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (ej., DM1 o DM4) y luego el agente entrecruzante (ej., SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1)) continuara hasta su finalización antes de poner en contacto la mezcla con un reactivo de inactivación. A este respecto, se añade el reactivo de inactivación a la mezcla de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 48 horas (por ejemplo, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 25 hora a aproximadamente 48 horas) después de que la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) se pone en contacto con el agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1).

[00203] Alternativamente, la mezcla se inactivó mediante la reducción del pH de la mezcla a aproximadamente 5.0 (por ejemplo, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1 o 5.2). En otro aspecto, la mezcla se inactivó mediante la reducción del pH a menos de 6.0, menos de 5.5, menos de 5.0, menos de 4.8, menos de 4.6, menos de 4.4, menos de 4.2, menos de 4.0.

Alternativamente, el pH se reduce a aproximadamente 4.0 (por ejemplo, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1 o 4.2) a aproximadamente 6.0 (por ejemplo, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1 o 6.2), de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 5.0, de aproximadamente 4.5 (por ejemplo, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 o 4.7) a aproximadamente 5.0. En un aspecto, la mezcla se inactivó mediante la reducción del pH de la mezcla a 4.8. En otro aspecto, la mezcla se inactivó mediante la reducción del pH de la mezcla a 5.5.

[00204] En un aspecto, el proceso de una etapa comprende además una etapa de sujeción para liberar los enlazadores unidos de forma inestable al anticuerpo. La etapa de sujeción comprende la sujeción de la mezcla antes de la purificación del conjugado (por ejemplo, después de la etapa de reacción, entre la etapa de reacción y la etapa de inactivación, o después de la etapa de inactivación). Por ejemplo, el proceso comprende (a) poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) para formar una mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4), y luego poner en contacto la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) con el agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1), en una solución que tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 para proporcionar una mezcla que comprende (i) el conjugado (por ejemplo, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 o Ab-CX1-1-DM1), (ii) el fármaco libre (por ejemplo, DM1 o DM4), y (iii) los subproductos de reacción, (b) mantener la mezcla preparada en la etapa (a) para liberar los enlazadores unidos de forma inestable del agente de unión a células, y (c) purificar la mezcla para proporcionar un conjugado purificado.

[00205] En otra modalidad, el proceso comprende (a) poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) para formar una mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4), y luego poner en contacto la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) con el agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1), en una solución que tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 para proporcionar una mezcla que comprende (i) el conjugado, (ii) el fármaco libre (por ejemplo, DM1 o DM4), y (iii) los subproductos de reacción, (b) inactivar la mezcla preparada en la etapa (a) para inactivar cualquier fármaco sin reaccionar (por ejemplo, DM1 o DM4), y/o agente entrecruzate sin reaccionar (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC,

SPDB, Sulfo-SPDB or CX1-1), (c) mantener la mezcla preparada en la etapa (b) para liberar los enlazadores unidos de forma inestable del agente de unión a células, y (d) purificar la mezcla para proporcionar un conjugado purificado (por ejemplo, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 o Ab-CX1-1-DM1).

[00206] Alternativamente, la etapa de sujeción se puede realizar después de la purificación del conjugado, seguido por una etapa de purificación adicional.

[00207] En otro aspecto, la reacción se deja proceder hasta su terminación antes de la etapa de sujeción. A este respecto, la etapa de sujeción se puede realizar de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 48 horas (por ejemplo, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 24 hora a aproximadamente 48 horas) después de que la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) se pone en contacto con el agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1).

[00208] La etapa de sujeción comprende el mantenimiento de la solución a una temperatura adecuada (por ejemplo, de aproximadamente 0 º C a aproximadamente 37 º C) durante un periodo de tiempo adecuado (por ejemplo, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 8 horas, o de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas) para liberar los enlazadores unidos de forma inestable del anticuerpo, mientras que no se libera sustancialmente los enlazadores unidos de forma estable del anticuerpo. En un aspecto, la etapa de sujeción comprende el mantenimiento de la solución a aproximadamente 20º C o menos (por ejemplo, de 0º C a 18º C aproximadamente, 4º C a 16º C aproximadamente), a temperatura ambiente (ej., 20º C a 30º C aproximadamente o 20º C a 25º C aproximadamente), o a una temperatura elevada (por ejemplo, de 30 ºC a 37º C aproximadamente). En un aspecto, la etapa de sujeción

comprende el mantenimiento de la solución a una temperatura de 16° C a 24° C aproximadamente (por ejemplo, 15ºC, 16º C aproximadamente, 17º C aproximadamente, 18º C aproximadamente, 19º C aproximadamente, 20º C aproximadamente, 21º C aproximadamente, 22º C aproximadamente, 23º C aproximadamente, 24º C aproximadamente, o 25º C aproximadamente). En otro aspecto, la etapa de sujeción comprende el mantenimiento de la solución a una temperatura de 2º C a 8º C aproximadamente (ej., aproximadamente 0º C, aproximadamente 1º C, aproximadamente 2º C, aproximadamente 3º C, aproximadamente 4º C, aproximadamente 5º C, aproximadamente 6º C, aproximadamente 7º C, aproximadamente 8º C, aproximadamente 9º C, o aproximadamente 10º C). En otro aspecto, la etapa de sujeción comprende el mantenimiento de la solución a una temperatura de aproximadamente 37° C (por ejemplo, aproximadamente 34º C, aproximadamente 35º C, aproximadamente 36º C, aproximadamente 37º C, aproximadamente 38º C, aproximadamente 39º C, o aproximadamente 40º C).

[00209] La duración de la etapa de sujeción depende de la temperatura y el pH al que se realiza la etapa de sujeción. Por ejemplo, la duración de la etapa de sujeción puede reducirse sustancialmente mediante la modalidad de la etapa de sujeción a temperatura elevada, con la temperatura máxima limitada por la estabilidad del conjugado de agente de unión a células-agente citotóxico. La etapa de sujeción puede comprender el mantenimiento de la solución durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 1 día (por ejemplo, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 22 horas, o aproximadamente 24 horas), aproximadamente 10 horas a aproximadamente 24 horas, aproximadamente 12 horas a aproximadamente 24 horas, aproximadamente 14 horas a aproximadamente 24 horas, aproximadamente 16 horas a aproximadamente 24 horas, aproximadamente 18 horas a aproximadamente 24 horas, aproximadamente 20 horas a aproximadamente 24 horas, aproximadamente 5 horas a aproximadamente 1 semana, aproximadamente 20 horas a aproximadamente 1 semana, aproximadamente 12 horas a aproximadamente 1 semana (por ejemplo,

aproximadamente 12 horas, 16 horas, 20 horas, 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, o aproximadamente 7 días), o aproximadamente 1 día a aproximadamente 1 semana.

[00210] En un aspecto, la etapa de sujeción comprende el mantenimiento de la solución a una temperatura de 2º C a 8º C aproximadamente durante un período de al menos 12 horas aproximadamente hasta una semana. En otro aspecto, la etapa de sujeción comprende el mantenimiento de la solución a una temperatura de 2º C a 8º C aproximadamente durante la noche (por ejemplo, de 12 a 24 horas aproximadamente, preferiblemente aproximadamente 20 horas).

[00211] El valor de pH para la etapa de sujeción es preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 10. En un aspecto, el valor de pH para la etapa de mantenimiento es de aproximadamente 4 o más, pero menos de aproximadamente 6 (por ejemplo, de 4 a 5.9) o aproximadamente 5 o más, pero menos de aproximadamente 6 (por ejemplo, de 5 a 5.9). En otro aspecto, los valores pH para la etapa de sujeción oscila de 6 a 10 aproximadamente (por ejemplo, de 6.5 a 9 aproximadamente, de 6 a 8 aproximadamente). Por ejemplo, los valores de pH para la etapa de retención pueden ser de aproximadamente 6, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9, aproximadamente 9,5, o aproximadamente 10.

[00212] En otros aspectos, la etapa de sujeción puede comprender la incubación de la mezcla a 25 °C a un pH de aproximadamente 6-7,5 durante aproximadamente 12 horas a aproximadamente 1 semana, incubando la mezcla a 4 ° C a un pH de aproximadamente 4.5 a -5.9 durante aproximadamente 5 horas a aproximadamente 5 días, o incubando la mezcla a 25 ° C a un pH de aproximadamente 4.5 a 5.9 durante aproximadamente 5 horas a aproximadamente 1 día.

[00213] El proceso de una etapa puede incluir, opcionalmente, la adición de sacarosa para la etapa de reacción para aumentar la solubilidad y la recuperación de los conjugados. Deseablemente, la sacarosa se añade a una concentración de aproximadamente de 0,1% (w/v) a aproximadamente 20% (w/v) (por ejemplo, aproximadamente 0,1% (w/v), 1% (w/v), 5% (w/v), 10% (w/v), 15% (w/v), o 20% (w/v)). Preferiblemente, se añade sacarosa a una concentración de aproximadamente 1% (w/v) a

aproximadamente 10% (w/v) (por ejemplo, aproximadamente 0,5% (w/v), aproximadamente 1% (w/v), aproximadamente 1,5% (w/v), aproximadamente 2% (w/v), aproximadamente 3% (w/v), aproximadamente 4% (w/v), aproximadamente 5% (w/v), aproximadamente 6% (w/v), aproximadamente 7% (w/v), aproximadamente 8% (w/v), aproximadamente 9% (w/v), aproximadamente 10% (w/v), o aproximadamente 11% (w/v)). Además, la etapa de reacción también puede comprender la adición de un agente de amortiguación. Cualquier agente de amortiguación adecuado conocido en la técnica se puede utilizar. Agentes de amortiguación adecuados incluyen, por ejemplo, un búfer de citrato, un búfer de acetato, un búfer de succinato y un búfer de fosfato. En un aspecto, el agente de amortiguación se selecciona del grupo que consiste de HEPPSO (N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(ácido 2-hidroxipropanosulfónico)), POPSO (piperazina-1 ,4-bis-(ácido 2-hidroxi -propano-sulfónico) deshidrato), HEPES (ácido 4 - (2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico), HEPPS (EPPS) (4 - (2-hidroxietil) piperazina-1-propanosulfónico), TES (ácido N- [tris (hidroximetil) metil]-2-aminoetanosulfónico), y una combinación de los mismos.

[00214] El proceso de una etapa puede comprender además la etapa de purificación de la mezcla para proporcionar conjugado purificado (ej., Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4, Ab-Sulfo-SPDB-DM4 o Ab-CX1-1-DM1). Los métodos de purificación conocidos en la técnica pueden ser utilizados para purificar los conjugados de la presente divulgación. En un aspecto, los conjugados de la presente divulgación usa filtración de flujo tangencial (TFF), cromatografía no adsorbente, cromatografía absorbente, filtración absorbente, precipitación selectiva, o cualquier otro proceso de purificación adecuado, así como combinaciones de los mismos. En otro aspecto, antes de someter a los conjugados al proceso de purificación descrito anteriormente, los conjugados se filtran primero a través de una o más membranas de PVDF. Alternativamente, los conjugados se filtraron a través de una o más membranas de PVDF después de someter a los conjugados al proceso de purificación descrito anteriormente. Por ejemplo, en un aspecto, los conjugados se filtraron a través de una o más membranas de PVDF y después se purificaron utilizando filtración de flujo tangencial. Alternativamente, los conjugados se purificaron usando filtración de flujo tangencial y después se filtraron a través de una o más membranas de PVDF.

[00215] Cualquier sistema TFF adecuado pueden utilizarse para la purificación, incluyendo un sistema de tipo Pellicon (Millipore, Billerica,Massachusetts), un sistema Sartocon Casete (Sartorius AG, Edgewood,Nueva York), y un sistema de tipo Centrasette (Pall Corp., East Hills,Nueva York).

[00216] Cualquier resina de cromatografía absorbente adecuada puede utilizarse para la purificación. Resinas de cromatografía absorbente preferidas incluyen cromatografía de hidroxiapatita, cromatografía de inducción de carga hidrófoba (HCIC), cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio iónico de modo mixto, cromatografía de afinidad metálica inmovilizada (IMAC), cromatografía de ligando de colorante, cromatografía de afinidad, cromatografía de fase inversa, y combinaciones de los mismos. Ejemplos de resinas de hidroxiapatita adecuados incluyen hidroxiapatita cerámica (CHT tipo I y tipo II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), HA Ultrogel hidroxiapatita (Pall Corp., East Hills, Nueva York), y fluoroapatita de cerámica (CFT Tipo I y Tipo II , Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Un ejemplo de una resina HCIC adecuada es la resina MEP HyperCel® (Pall Corp., East Hills,Nueva York). Ejemplos de resinas de HIC adecuadas incluyen butil-Sefarosa, hexilo-Sepaharosa, Fenil-Sefarosa, y resinas de Octil Sefarosa (todas de GE Healthcare, Piscataway, NJ), así como resinas de Macro-Prep Metilo y Macro-Prep® t-butilo (BioRad Laboratorios, Hercules, CA). Ejemplos de resinas de intercambio iónico adecuadas incluyen SP-Sefarosa®, CM-Sefarosa, y resinas de Q-Sefarosa® (todas de GE Healthcare, Piscataway, NJ), y resina Unosphere® S (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Ejemplos de intercambiadores de iones de modo mixto adecuados incluyen resina Bakerbond® ABx (JT Baker, Phillipsburg Nueva Jersey). Ejemplos de resinas IMAC adecuadas incluyen resina quelante Sefarosa® (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y resina Profinity® IMAC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Ejemplos de resinas ligantes colarante adecuadas incluyen resina Sefarosa Azul (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y resina Affi-gel Azul IMAC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Ejemplos de resinas de afinidad adecuadas incluyen la resina de Sefarosa de Proteína A (por ejemplo, MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ) y resinas de afinidad de lectina, por ejemplo resina de Sefarosa de lectina de lenteja (GE Healthcare, Piscataway, NJ), donde el anticuerpo tiene sitios de unión a lectina apropiados. Ejemplos de resinas de fase inversa adecuados incluyen resinas de C4, C8, y C18 (Grace Vydac, Hesperia,California).

[00217] Cualquier resina de cromatografía no absorbente adecuada puede utilizarse para la purificación. Ejemplos de resinas de cromatografía no adsorbente adecuada incluyen, pero no se limitan a resinas SEPHADEX™ G-25, G-50, G-100, SEPHACRYL ™ (por ejemplo, resinas S-200 y S-300) SUPERDEX ™ (por ejemplo, SUPERDEX ™ 75 y SUPERDEX ™ 200), resinas BIO-GEL ® (por ejemplo, P-6, P-10, P-30, P-60 y P-100), y otros conocidos por los expertos normales en la técnica.

Proceso de Dos Etapas y Proceso de un recipiente

[00218] En un aspecto, los conjugados de la presente divulgación se pueden preparar como se describe en la Publicación de Patente EE.UU. 7.811.572 y la Solicitud de Patente de EE.UU. N º 2006/0182750. El proceso comprende las etapas de (a) poner en contacto el anticuerpo de la presente divulgación con el agente entrecruzante (ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1) para unir covalentemente el enlazador (es decir, Ab-SMCC, Ab-SPDB o Ab-CX1-1) con el anticuerpo y de ese modo preparar una primera mezcla que comprende el anticuerpo que tiene el enlazador unido a la misma; (b) someter opcionalmente la primera mezcla a un proceso de purificación para preparar una primera mezcla purificada de anticuerpo que tiene el enlazador unido al mismo; (c) conjugar el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) con el anticuerpo que tiene el enlazador unido al mismo en la primera mezcla por reacción del anticuerpo que tiene el enlazador unido al mismo con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) en una solución que tiene un pH de 4 a 9 aproximadamente para preparar una segunda mezcla que comprende (i) conjugado (por ejemplo, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4, Ab-Sulfo-SPDB-DM4 o Ab-CX1-1-DM1), (ii) fármaco libre (por ejemplo, DM1 o DM4), y (iii) subproductos de reacción, y (d) someter la segunda mezcla a un proceso de purificación para purificar el conjugado de los otros componentes de la segunda mezcla. Alternativamente, se puede omitir la etapa de purificación (b). Los métodos de purificación descritos en la presente se pueden utilizar para los pasos (b) y (d). En una modalidad, la TFF se utiliza para ambas etapas (b) y (d). En otra modalidad, la TFF se utiliza para la etapa (b) y cromatografía de absorción (por ejemplo, CHT) se utiliza para la etapa (d).

Reactivos de una etapa y Procesos In-situ

[00219] En un aspecto, los conjugados de la presente divulgación se pueden preparar mediante la conjugación de compuesto fármaco-enlazador preformado (por ejemplo, SMCC-DM1, Sulfo-SMCC-DM1, SPDB-DM4, Sulfo-SPDB-DM4 o CX1-1-DM1) para el anticuerpo de la presente divulgación, tal como se describe en la patente de EE.UU. 6.441.163 y la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. Nos. 2011/0003969 y 2008/0145374 seguido por un paso de purificación. Se pueden utilizar los métodos de purificación descritos en la presente. El compuesto fármaco-enlazador se prepara por reacción del fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) con el agente entrecruzante (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, sulfo-SPDB o CX1-1). El compuesto fármaco-enlazador (por ejemplo, SMCC-DM1, Sulfo-SMCC-DM1, SPDB-DM4, Sulfo-SPDB-DM4 o CX1-1-DM1) está opcionalmente sometido a purificación antes de conjugarse con el anticuerpo.

4. Caracterización y Selección de Anticuerpos Deseables y Conjugados de Anticuerpo y Fármaco.

[00220] Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) o conjugados de fármacos de anticuerpos de la presente divulgación se pueden caracterizar y seleccionar por sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante varios ensayos conocidos en la técnica.

[00221] Por ejemplo, un anticuerpo de la presente divulgación se puede probar para su actividad de unión a antígeno mediante métodos conocidos tales como ELISA, FACS, Biacore o Western blot.

[00222] Los animales transgénicos y las líneas celulares son particularmente útiles en la selección de conjugados de anticuerpos y fármacos (ADC) que tienen potencial como tratamientos profilácticos o terapéuticos de la sobreexpresión cancerosa de antígenos asociados a tumores y receptores de la superficie celular. La selección de un ADC útil puede incluir la administración de un ADC candidato en un rango de dosis al animal transgénico, y probar en diferentes puntos de tiempo para el efecto (s) del ADC de la enfermedad o trastorno que se está evaluando. Alternativamente, o adicionalmente, el fármaco se puede administrar antes de o simultáneamente con la exposición a un inductor de la enfermedad, si es aplicable. El ADC candidato puede seleccionarse en serie y de forma individual, o en paralelo bajo formato de selección de medio o alto rendimiento.

[00223] Un aspecto es un método de cribado que comprende (a) el trasplante de células desde una línea celular de cáncer estable o tumor de paciente humano que expresan CDH6 (ej., una línea celular de ovario o fragmento tumoral, una línea celular renal o fragmento de tumor, una línea celular hepática o fragmento de tumor, una línea celular de tiroides o fragmento de tumor, una línea celular de cáncer CNS o fragmento de tumor, una línea celular de colangiocarcinoma o fragmento de tumor, células primarias de ovario, renales, hepáticas, de tejido suave, CNS, de la tiroides, o de colangiocarcinoma) en un animal no humano, (b) la administración de un fármaco candidato ADC al animal no humano y (c) determinar la capacidad del candidato para inhibir el crecimiento de tumores desde la línea celular trasplantada. La presente divulgación también abarca un método de selección de candidatos de ADC para el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la sobreexpresión de CDH6 que comprende (a) poner en contacto células de una línea celular cancerosa estable que expresa CDH6 con un fármaco candidato, y (b) evaluar la capacidad del candidato ADC para inhibir el crecimiento de la línea celular estable.

[00224] Otro aspecto adicional es un método de selección que comprende (a) poner en contacto células de una línea celular cancerosa estable que expresa CDH6 con un candidato a fármaco ADC y (b) evaluar la capacidad del candidato ADC para inducir la muerte celular. En un aspecto se evalúa la capacidad del candidato ADC para inducir la apoptosis.

[00225] Los ADC candidatos se pueden seleccionar al administrarlos al animal transgénico en un rango de dosis, y evaluar la respuesta fisiológica del animal a los compuestos con el tiempo. En algunos casos, puede ser apropiado administrar el compuesto conjuntamente con co-factores que aumentarían la eficacia del compuesto. Si se utilizan líneas celulares derivadas de los sujetos animales transgénicos para la detección de los ADCs útiles en el tratamiento de diversos trastornos asociados con la sobreexpresión de CDH6, los ADCs de prueba se añaden al medio de cultivo celular en

un momento apropiado, y la respuesta celular a los ADCs se evalúa en el tiempo utilizando los ensayos bioquímicos y/o histológicos apropiados.

[00226] Por lo tanto, la presente divulgación proporciona ensayos para la identificación de ADC que se dirigen específicamente y se unen a CDH6, y expresión de CDH6 en las células tumorales.

Anticuerpos CDH6

[00227] La presente divulgación proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (ej., fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a CDH6. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión al antígeno) de la presente divulgación incluyen, pero no están limitados a, los anticuerpos humanos monoclonales o fragmentos de los mismos, aislados como se describe en los ejemplos a continuación.

[00228] La presente divulgación en ciertos aspectos proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a CDH6, dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) comprenden un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 20, 34, 48, 62, 76, 90, 104, 118, 132, 146, 160, 174, 188, 202, 216, 230, 244, 258, 272, 286, 300, 314 o 328 (Tabla 5 y 6). La presente divulgación también proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a CDH6, dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) comprenden una CDR VL que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDRs VL enumeradas en las Tablas 5 y 6. En aspectos particulares, la presente divulgación proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (ej., fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a CDH6, dichos anticuerpos que comprenden (o alternativamente, consisten en) uno, dos, tres, cuatro, cinco o más CDRs VH que tienen

una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDRs VH enumeradas en las Tablas 5 y 6.

[00229] La presente divulgación proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a CDH6, dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) comprenden un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 21, 35, 49, 63, 77, 91, 105, 119, 133, 147, 161, 175, 189, 203, 217, 231, 245, 259, 273, 287, 301, 315 o 329 (Tabla 5 y 6). La presente divulgación también proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a CDH6, dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) comprenden una CDR VL que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDRs VL enumeradas en las Tablas 5 y 6 más adelante. En particular, la divulgación proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (ej., fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a CDH6, dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (ej., fragmentos de unión a antígeno) comprenden (o alternativamente, consisten en) uno, dos, tres, o más CDR VL que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDRs VL enumeradas en las Tablas 5 y 6.

[00230] Otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (ej., fragmentos de unión a antígeno) de la presente descripción incluyen aminoácidos que se han mutado, sin embargo, tienen al menos 60, 70, 80, 90 o 95 por ciento de identidad en las regiones CDR con las regiones CDR representadas en la secuencias descritas en las Tablas 5 y 6. En algunos aspectos, se incluyen secuencias de aminoácidos mutantes en donde no más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos se han mutado en las regiones CDR, en comparación con las regiones CDR representadas en las secuencias descritas en la Tabla y y 6.

[00231] La presente divulgación también proporciona secuencias de ácidos nucleicos que codifican VH, VL, la cadena pesada de longitud completa, y la cadena ligera de longitud completa de los anticuerpos que se unen específicamente a CDH6. Tales

secuencias de ácidos nucleicos pueden ser optimizados para la expresión en células mamíferas.

[00232] Otros anticuerpos de la presente divulgación incluyen aquellos donde los aminoácidos o ácidos nucleicos que se han mutado, pero tienen al menos 60, 70, 80, 90, o 95% de identidad con las secuencias descritas en la Tabla 5 y 6. En algunos aspectos, se incluyen secuencias de aminoácidos mutantes en donde no más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos se han mutado en las regiones variables, en comparación con las regiones variables representadas en las secuencias descritas en la Tabla 5 y 6 mientras se retiene sustancialmente la misma actividad terapéutica.

[00233] Como cada uno de estos anticuerpos pueden unirse a CDH6, la VH, VL, cadena ligera de longitud completa, y secuencias de cadena pesada de longitud completa (secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos) pueden "mezclarse y combinarse" para crear otros anticuerpos de unión a CDH6. Tales anticuerpos de unión a CDH6 "mezclados y cambinados" pueden ser probados utilizando los ensayos de unión conocidos en la técnica (por ejemplo, ELISAs, y otros ensayos descritos en la sección de Ejemplos). Cuando estas cadenas se mezclan y se combinan, una secuencia VH a partir de un pareo VH/VL particular debe ser reemplazada por una secuencia VH estructuralmente similar. Del mismo modo una secuencia de cadena pesada de longitud completa a partir de un pareo de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa particular debe ser reemplazada por una secuencia de cadena pesada de longitud completa de estructura similar. Del mismo modo, una secuencia VL a partir de un pareo VH/VL particular debe ser reemplazada por una secuencia VL estructuralmente similar. Del mismo modo una secuencia de cadena ligera de longitud completa desde un pareo particular de cadena pesada de longitud completa /cadena ligera de longitud completa debe ser reemplazada por una secuencia de cadena ligera de longitud completa estructuralmente similar. En consecuencia, en un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o una región de unión a antígeno del mismo que comprende una secuencia de

aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de las SEC ID NO: 20, 34, 48, 62, 76, 90, 104, 118, 132, 146, 160, 174, 188, 202, 216, 230, 244, 258, 272, 286, 300, 314 o 328 (Tabla 5 y 6); y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de las SEC ID NO: 21, 35, 49, 63, 77, 91, 105, 119, 133, 147, 161, 175, 189, 203, 217, 231, 245, 259, 273, 287, 301, 315, o 329 (Tabla 5 y 6); en donde el anticuerpo se une específicamente a CDH6.

[00234] En otro aspecto, la divulgación proporciona (i) un anticuerpo monoclonal aislado que tiene: una cadena pesada de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos que ha sido optimizada para expresión en la célula de un mamífero seleccionada del grupo que consta de las SEC ID NO: 24, 38, 52, 66, 80, 94, 108, 122, 136, 150, 164, 178, 192, 206, 220, 234, 248, 262, 276, 290, 304, 318 o 332; y una cadena ligera de longitud completa que comprende una secuencia aminoácida que ha sido optimizada para expresión en una célula mamífera seleccionada del grupo que consta de SEC ID NO: 25, 39, 53, 67, 81, 95, 109, 123, 137, 151, 165, 179, 193, 207, 221, 235, 249, 263, 277, 291, 305, 319 o 333; o (ii) una proteína funcional que comprende una porción de unión al antígeno de la misma.

[00235] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos de unión a CHD6 que comprenden CDR1s, CDR2s y CDR3s de cadena pesada y cadena ligera como se describe en la Tabla 5 y 6, o combinaciones de los mismos. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1s VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 17, 31, 45, 59, 73, 87, 101, 115, 129, 143, 157, 171, 185, 199, 213, 227, 241, 255, 269, 283, 297, 311 y 325. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2s VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 18, 32, 46, 60, 74, 88, 102.116, 130, 144, 158, 172, 186, 200, 214, 228, 242, 256, 270, 284, 298, 312 y 326. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3s VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 19, 33, 47, 61, 75, 89, 103, 117, 131, 145, 159, 173, 187, 201, 215, 229, 243, 257, 271, 285, 299, 313 y 327. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1s VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 14, 28, 42, 56, 70, 84, 98, 112, 126, 140, 154, 168, 182, 196, 210, 224, 238,

252, 266, 280, 294, 308 y 322. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2s VL de los anticuerpos se muestran en las SEC ID NOs: 15, 29, 43, 57, 71, 85, 99, 113, 127, 141, 155, 169, 183, 197, 211, 225, 239, 253, 267, 281, 295, 309 y 323. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3s VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 16, 30, 44, 58, 72, 86, 100, 114, 128, 142, 156, 170, 184, 198, 212, 226, 240, 254, 268, 282, 296, 310 y 324.

[00236] Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a CDH6 y que la especificidad de unión a antígenos es proporcionada principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias VH CDR1, 2 y 3 y las secuencias VL CDR1, 2 y 3 pueden “mezclarse y combinarse” (es decir, las CDRs de diferentes anticuerpos pueden mezclarse y combinarse, aunque cada anticuerpo debe contener una VH CDR1, 2 y 3 y una VL CDR1, 2 and 3 para crear otras moléculas de unión a CDH6. Tales anticuerpos de unión a CHD6 "mezclados y combinados " pueden ser probados utilizando los ensayos de unión conocidos en la técnica y aquellos descritos en los Ejemplos (por ejemplo, ELISAs). Cuando las secuencias CDR VH se combinan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 a partir de una secuencia VH particular debe reemplazarse por una o varias secuencias CDR estructuralmente similares. Del mismo modo, cuando las secuencias CDR VL se combinan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 a partir de una secuencia VL particular debe reemplazarse por una o varias secuencias CDR estructuralmente similares. Será evidente para el experto que las secuencias VH y VL novedosas pueden crearse al sustituir una o más secuencias de regiones CDR VH y/o VL por secuencias estructuralmente similares a partir de las secuencias CDR mostradas en la presente para anticuerpos monoclonales de la presente divulgación.

[00237] En consecuencia, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o una región de unión a antígeno del mismo que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEQ ID NO: 17, 31, 45, 59, 73, 87, 101, 115, 129, 143, 157, 171, 185, 199, 213, 227, 241, 255, 269, 283, 297, 311 y 325.; una CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que

consta de SEQ ID NOs: 18, 32, 46, 60, 74, 88, 102.116, 130, 144, 158, 172, 186, 200, 214, 228, 242, 256, 270, 284, 298, 312 y 326.; una CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEC ID NOs: 19, 33, 47, 61, 75, 89, 103, 117, 131, 145, 159, 173, 187, 201, 215, 229, 243, 257, 271, 285, 299, 313 y 327; una CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEC ID NOs: 14, 28, 42, 56, 70, 84, 98, 112, 126, 140, 154, 168, 182, 196, 210, 224, 238, 252, 266, 280, 294, 308 y 322.; una CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 15, 29, 43, 57, 71, 85, 99, 113, 127, 141, 155, 169, 183, 197, 211, 225, 239, 253, 267, 281, 295, 309 y 323.; y una CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 16, 30, 44, 58, 72, 86, 100, 114, 128, 142, 156, 170, 184, 198, 212, 226, 240, 254, 268, 282, 296, 310 y 324; en donde el anticuerpo se une específicamente a CDH6.

[00238] En una aspecto específico, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (ej., fragmentos de unión a antígenos) que se une específicamente a CDH6 que comprende:
(i) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 224, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 225, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 226; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO: 227, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 228, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:229;
(ii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 210, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 211, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 212; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:213, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 214, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:215;
(iii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 266, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 267, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 268; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO: 269, (e) una HCDR2 de SEQ ID NO: 270, y (f) una HCDR3 de SEC ID NO: 271;

(iv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 308, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 309, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 310; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:311, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:312, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:313;

(v) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 14, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 15, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 16; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:17, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:18, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:19;

(vi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 28, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 29, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 30; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:31, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:32, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:33;

(vii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 42, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 43, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 44; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:45, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:46, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:47;

(viii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 56, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 57, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 58; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:59, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:60, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:61;

(ix) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 70, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 71, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 72; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:73, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:74, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:75;

(x) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 84, (b) una LCDR2 de la

SEQ ID NO: 85, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 86; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:87, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 88, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO: 89;

(xi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 98, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 99, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 100; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:101, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:102, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:103;

(xii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 112, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 113, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 114; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:115, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:116, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:117;

(xiii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 126, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 127, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 128; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:129, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:130, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:131;

(xiv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 140, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 141, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 142; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:143, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:144, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:145;

(xv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 154, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 155, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 156; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:157, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:158, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:159;

(xvi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 168, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 169, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 170; y una región variable de cadena

pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:171, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:172, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:173;

(xvii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 182, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 183, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 184; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:185, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:186, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:187;

(xviii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 196, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 197, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 198; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:199, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:200, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:201;

(xix) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 238, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 239, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO:240; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:241, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:242, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:243;

(xx) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 252, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 253, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 254; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:255, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:256, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:257;

(xxi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 280, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 281, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 282; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:283, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:284, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:285;

(xxii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 294, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 295, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 296; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:297, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:298, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:299; o

(xxiii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 322, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 323, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 324; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:325, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:326, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:327.

[00239] En ciertos aspectos, un anticuerpo que se une específicamente a CDH6 es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (ej., fragmento de unión a antígeno) que se describe en la Tabla 5 y/o 6.

1. Identificación de Epítopos y Anticuerpos que se unen al mismo Epítopo

[00240] La presente divulgación proporciona anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se unen a un epítopo de dentro del dominio extracelular de CDH6. En ciertos aspectos los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pueden unirse a epítopos dentro de los dominios del dominio extracelular CDH6.

[00241] La presente divulgación proporciona anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se unen al mismo epítopo como los anticuerpos anti-CDH6 descritos en las Tablas 5 y 6. Por lo tanto, anticuerpos adicionales y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) se pueden identificar en base a su capacidad de competir de manera cruzada (por ejemplo, para inhibir competitivamente la unión de, de una manera estadísticamente significativa) con otros anticuerpos en ensayos de unión a CDH6. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) de la presente divulgación a un proteína CDH6 (ej., CDH6 humano) demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) para la unión a CDH6; tal anticuerpo puede, según una teoría no limitante, unirse al mismo epítopo o a uno relacionado (por ejemplo, estructuralmente similar o espacialmente próximo) en la proteína CDH6 como el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (ej., fragmentos de unión a

antígenos) con el que compite. En cierto aspecto, el anticuerpo que se une al mismo epítopo en CDH6 como los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) de la presente divulgación es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado. Tales anticuerpos monoclonales humanos o humanizados pueden prepararse y aislarse como se describe en la presente.

2. Alteración Adicional del Marco de la Región Fc

[00242] La presente divulgación proporciona inmunoconjugados etiquetados específicos a sitio. Estos inmunoconjugados pueden comprender anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno modificados de los mismos que comprenden además modificaciones a residuos de marco dentro de VH y/o VL, por ejemplo para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente tales modificaciones de marco están hechas para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque consiste en "retro mutar" uno o más residuos marco a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sido objeto de mutación somática puede contener residuos del marco que difieren de la secuencia de línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Tales residuos pueden ser identificados mediante la comparación de las secuencias del marco del anticuerpo con las secuencias de línea germinal de las que se deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden ser "retro-mutadas" a la secuencia de línea germinal, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio. Tales anticuerpos "retro-mutados" también pretenden ser contemplados.

[00243] Otro tipo de modificación marco implica la mutación de uno o más residuos dentro de la región marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar epítopos de células T para disminuir así la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también se conoce como "desinmunización" y se describe con más detalle en la Publicación de patente de EE.UU. No. 2003/0153043 por Carr.

[00244] Además o como alternativa a las modificaciones realizadas dentro de las regiones marco o CDR, los anticuerpos pueden ser diseñados para incluir modificaciones

dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como vida media en suero, fijación del complemento, unión al receptor Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo puede ser modificado químicamente (por ejemplo, una o más fracciones químicas se pueden unir al anticuerpo) o se pueden modificar para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estos aspectos se describe en más detalle a continuación.

[00245] En un aspecto, la región de bisagra de CH1 puede ser modificada de tal manera que el número de residuos de cisteína en la región bisagra se altera, por ejemplo, se aumenta o disminuye. Este enfoque se describe adicionalmente en la patente EE.UU. No. 5.677.425 por Bodmer. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

[00246] En otro aspecto, la región de bisagra Fc de un anticuerpo es mutada para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o más mutaciones aminoácidas se introducen en la región de interfaz de dominio CH2-CH3 del fragmento Fc-bisagra de tal manera que el anticuerpo queda con una unión defectuosa a SpA (proteína estafilocóccica A) con relación a la unión nativa de SpA con el dominio Fc-bisagra. Este enfoque es descrito en más detalle en la Patente EEUU. No. 6.165.745 por Ward.

[00247] En aún otros aspectos, la región Fc puede ser alterada mediante la sustitución de al menos un residuo aminoácido por un residuo aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden ser sustituidos por un residuo aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada para un ligando efector pero retenga la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo precursor. El ligando efector al que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe en las patentes de EE.UU. Nos. 5.624.821 y 5.648.260, ambas por Winter.

[00248] En otro aspecto, uno o más aminoácidos seleccionados a partir de residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos por un residuo de aminoácido diferente tal que el anticuerpo tenga unión de C1q alterada y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) abolida y/o disminuida. Este enfoque se describe en la patente de EE.UU. No. 6.194.551 por Idusogie.

[00249] En otro aspecto, uno o más residuos de aminoácidos se pueden alterar para alterar la capacidad del anticuerpo para fijarse al complemento. Este enfoque se describe en ej., la publicación PCT WO 94/29351 por Bodmer. En una modalidad específica, uno o más aminoácidos de un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de los mismos de la presente divulgación se sustituyen por uno o más residuos aminoácidos alotípicos, para la subclase IgG1 y el isotipo kappa. Residuos aminoácidos alotípicos también incluyen, pero no se limitan a, la región constante de la cadena pesada de las subclases IgG1, IgG2, y IgG3, así como la región constante de la cadena ligera del isotipo kappa como se describe por Jefferis *et al.*, MAbs. 1:332-338 (2009)).

[00250] En aún otro aspecto, la región Fc puede ser modificada para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ mediante la modificación de uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe en ej., la publicación PCT WO 00/42072 por Presta. Además, se han mapeado los sitios de unión en IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn y se han descrito las variantes con unión mejorada (véase Shields et al., (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001).

[00251] En aún otro aspecto, la glicosilación de un anticuerpo es modificada. Por ejemplo, un anticuerpo aglicosilado puede fabricarse (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede ser alterada, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por el “antígeno”. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr, por ejemplo, mediante la alteración de uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia de anticuerpos. Por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos pueden realizarse que resulten en la eliminación de uno o más sitios de glicosilación del

marco de región variable para eliminar así la glicosilación en dicho sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal enfoque se describe en por ejemplo la patente de EE.UU. Nos. 5.714.350 y 6.350.861 por Co.

[00252] Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede ser hecho que tenga un tipo de alteración de la glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosil o un anticuerpo que tiene estructuras GlcNAc de bisección aumentada. Tales patrones de glicosilación alterados han demostrado que aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con la maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden utilizar como células huésped para expresar los anticuerpos recombinantes para producir con ello un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 por Hang, describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente interrumpido, que codifica una fucosiltransferasa, de tal manera que los anticuerpos expresados en tal línea celular exhiben hipofucosilación. La publicación PCT WO 03/035835 por Presta describe una línea celular CHO variante, células Lecl3, con una capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos unidos por Asn (297), resultando también en hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields et al ., (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). La publicación PCT WO 99/54342 por Umana et al. describe líneas celulares diseñadas para expresar glicosil transferasas modificadoras de glicoproteínas (por ejemplo, beta (1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de tal manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas presenten estructuras de GlcNAc de bisección aumentada que resulta en actividad ADCC aumentada de los anticuerpos (véase también Umana et al., (1999) Nat. Biotech. 17:176-180, 1999).

[00253] En otro aspecto, el anticuerpo puede ser modificado para aumentar su vida media biológica. Diversos enfoques son posibles. Por ejemplo, una o más de las

siguientes mutaciones pueden ser introducidas: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de EE.UU. N º 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la vida media biológica, el anticuerpo puede ser alterado dentro de la región CH1 o CL para contener un epítopo de unión al receptor silvestre tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, tal como se describe en la patente de EE.UU. Nos. 5.869.046 y 6.121.022 de Presta.

[00254] Con el fin de minimizar la actividad ADCC de un anticuerpo, las mutaciones específicas en la región Fc resultan en anticuerpos "Fc silenciosos" que tienen una mínima interacción con células efectoras. En general, la "región Fc de IgG" se usa se utiliza para definir la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo la región Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. La región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define generalmente como que comprende el residuo de aminoácido de la posición C226 o de P230 al extremo carboxilo del anticuerpo IgG. La numeración de los residuos en la región Fc es del índice EU de Kabat. La lisina C-terminal (residuo K447) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o la purificación del anticuerpo.

[00255] Las funciones efectoras silenciadas se pueden obtener mediante la mutación en la región Fc de los anticuerpos y se han descrito en la técnica: LALA y N297A (Strohl, W., 2009, Curr Opin Biotechnol vol 20 (6): 685-691); y D265A (Baudino, 2008, J. Immunol 181: 6664- -69) véase también Heusser, WO2012065950. Ejemplos de anticuerpos Fc IgG1 silentes son el mutante LALA que comprende la mutación L234A y L235A en la secuencia de aminoácidos IgG1 Fc. Otro ejemplo de un anticuerpo IgG1 silencioso es la mutación DAPA (D265A, P329A) (US 6,737,056). Otro anticuerpo IgG1 silencioso comprende la mutación N297A, que da lugar a anticuerpos aglicosilados/ no glicosilados.

[00256] Los anticuerpos Fc silenciosos resultan en actividad ADCC baja o nula, lo que significa que un anticuerpo Fc silencioso exhibe una actividad ADCC que está por debajo de 50% de lisis específica de células, sin actividad ADCC significa que el

anticuerpo Fc silencioso exhibe una actividad ADCC (lisis celular específica) por debajo de 1%.

3. Producción de los Anticuerpos CDH6

[00257] Los anticuerpos Anti-CDH6 y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) de los mismos pueden producirse por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo pero sin limitar a, la expresión recombinante, síntesis química, y digestión enzimática de tetrámeros de anticuerpos, mientras que los anticuerpos monoclonales de longitud completa se pueden obtener, por ejemplo, por hibridoma o producción recombinante. La expresión recombinante puede ser de cualquier célula huésped apropiada conocida en la técnica, por ejemplo, células huésped de mamífero , células huésped bacterianas, células huésped de levadura, células huésped de insecto, etc.

[00258] La divulgación proporciona además polinucleótidos que codifican los anticuerpos descritos en la presente, por ejemplo, polinucleótidos que codifican regiones variables de cadena pesada o ligera o segmentos que comprenden la regiones determinantes de complementariedad como se describe en la presente. En algunos aspectos, el polinucleótido que codifica las regiones variables de cadena pesada tiene al menos 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido seleccionado del grupo que consta de las SEQ ID NOs: 22, 36, 50, 64, 78, 92, 106, 120, 134, 148, 162, 176, 190, 204, 218, 232, 246, 260, 274, 288, 302, 316, y 330. En algunos aspectos, el polinucleótido que codifica las regiones variables de cadena ligera tiene al menos 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido seleccionado del grupo que consta de las SEQ ID NOs: 23, 37, 51, 65, 79, 93, 107, 121, 135, 149, 163, 177, 191, 205, 219, 233, 247, 261, 275, 289, 303, 317, y 331.

[00259] En algunos aspectos, el polinucleótido que codifica la cadena pesada tiene al menos 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de

identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido de las SEQ ID NOs: 26, 40, 54, 68, 82, 96, 110, 124, 138, 152, 166, 180, 194, 208, 222, 236, 250, 264, 278, 292, 306, 320, y 334. En algunos aspectos, el polinucleótido que codifica la cadena ligera tiene al menos 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido de las SEQ ID NOs: 27, 41, 55, 69, 83, 97, 111, 125, 139, 153, 167, 181, 195, 209, 223, 237, 251, 265, 279, 293, 307, 321, y 335.

[00260] Los polinucleótidos de la presente divulgación pueden codificar sólo la secuencia de región variable de un anticuerpo anti-CDH6. También pueden codificar tanto una región variable y una región constante del anticuerpo. Algunas de las secuencias de polinucleótidos codifican un polipéptido que comprende regiones variables tanto de cadena pesada y cadena ligera de uno de un anticuerpo anti-CDH6 ejemplificado. Algunos otros polinucleótidos codifican dos segmentos polipeptídicos que respectivamente son sustancialmente idénticos a las regiones variables de la cadena pesada y cadena ligera de uno de los anticuerpos de ratón.

[00261] Las secuencias polinucleotídicas pueden ser producidas por síntesis de ADN de fase sólida de novo o mediante mutagénesis PCR de una secuencia existente (ej., secuencias como se describe en los Ejemplos a continuación) que codifica un anticuerpo anti-CDH6 o su fragmento de unión. La síntesis química directa de ácidos nucleicos puede realizarse por métodos conocidos en la técnica, tales como el método de fosfotriéster de Narang, *et al.* Meth. Enzymol. 68:90, 1979; el método de fosfodiéster de Brown *et al.*, Meth. Enzymol. 68:109, 1979; el método de dietilfosforamidita de Beaucage, Tetra. Lett., 22: 1859, 1981; y el método de soporte sólido de la Patente de Estados Unidos No. 4.458.066. La introducción de mutaciones en una secuencia de polinucleótidos por PCR se puede realizar como se describe en, por ejemplo, Tecnología PCR: Principios y Aplicaciones para la amplificación de ADN, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; Protocoles PCR: A Guide to Methods and Applications, Innis *et al.*

(Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila, Nucleic Acids Res. 19:967, y Eckert, (1991) PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

[00262] También se proporciona en la presente invención vectores de expresión y células huésped para la producción de anticuerpos anti-CDH6 descritos anteriormente. Varios vectores de expresión pueden emplearse para expresar los polinucleótidos que codifican las cadenas de anticuerpos de unión a anti-CDH6 o fragmentos de unión. Vectores de expresión tanto basados en virus como no virales pueden utilizarse para producir los anticuerpos en una célula hospedera mamífera. Vectores y sistemas no virales incluyen plásmidos, vectores episomales, típicamente con un casete de expresión para expresar una proteína o ARN, y cromosomas artificiales humanos (véase, por ejemplo, Harrington, (1997) Nat Genet 15:345). Por ejemplo, vectores no virales útiles para la expresión de los polinucleótidos y polipéptidos anti-CDH6 en células mamíferas (por ejemplo, humanas) incluyen pThioHis A, B y C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B y C, (Invitrogen, San Diego, CA), vectores MPSV, y muchos otros vectores conocidos en la técnica por expresar otras proteínas. Vectores virales útiles incluyen vectores basados en retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, vectores basados en SV40, virus del papiloma, virus de Epstein Barr HBP, vectores de virus vaccinia y virus Semliki Forest (SFV). Vease, Brent, arriba; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; y Rosenfeld, Cell 68:143, 1992.

[00263] La elección del vector de expresión depende de las células huésped deseadas en las cuales el vector se va a expresar. Típicamente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (por ejemplo, potenciadoras) que están enlazadas operativamente a los polinucleótidos que codifican una cadena o fragmento de anticuerpo anti-CDH6. En algunos aspectos, un promotor inducible es empleado para evitar la expresión de secuencias insertadas, excepto bajo condiciones de inducción. Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo, arabinosa, lacZ, promotor de la metalotioneína o un promotor de choque térmico. Los cultivos de organismos transformados pueden ampliarse bajo condiciones de no inducción sin sesgar

la población a secuencias de codificación cuyos productos de expresión son mejor tolerados por las células huésped. Además de promotores, otros elementos reguladores también pueden ser necesitados o deseados para la expresión eficaz de una cadena o fragmento de anticuerpo anti-CDH6. Estos elementos incluyen típicamente un codón de iniciación ATG y un sitio de unión a ribosoma adyacente u otras secuencias. Además, la eficacia de la expresión puede ser aumentada por la inclusión de potenciadores apropiados al sistema celular en uso (véase, ej., Scharf, Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; and Bittner *et al.*, Meth. Enzymol., 153:516, 1987). Por ejemplo, el potenciador SV40 o potenciador CMV pueden usarse para aumentar la expresión en células huésped mamíferas.

[00264] Los vectores de expresión también pueden proporcionar una posición de secuencia de señal de secreción para formar una proteína de fusión con polipéptidos codificados por secuencias insertadas de anticuerpos anti-CDH6. Más a menudo, las secuencias insertadas de anticuerpos anti-CDH6 están ligadas a secuencias señal antes de su inclusión en el vector. Los vectores que se utilizan para recibir secuencias que codifican los dominios variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos anti-CDH6 algunas veces también codifican las regiones constantes o partes de la misma. Tales vectores permiten la expresión de las regiones variables como proteínas de fusión con las regiones constantes conduciendo así a la producción de anticuerpos intactos o fragmentos de los mismos. Típicamente, tales regiones constantes son humanas.

[00265] Las células hospederas para albergar y expresar las cadenas de anticuerpo anti-CDH6 pueden ser procariotas o eucariotas. E. coli es un hospedero procariota útil para clonación y expresión de los polinucleótidos de la presente descripción. Otros huéspedes microbianos adecuados para utilizar incluyen bacilos, tales como Bacillus subtilis, y otras enterobacterias, tales como Salmonella, Serratia, y varias especies de Pseudomonas. En estos hospederos procariotas, también se pueden hacer vectores de expresión, que típicamente contienen secuencias de control de expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación). Además,

cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos estará presente, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (trp), un sistema promotor de beta-lactamasa, o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores típicamente controlan la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias de sitios de unión a ribosomas y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción. Otros microbios, tales como levaduras, también pueden emplearse para expresar los polipéptidos anti-CDH6. También pueden utilizare células de insecto en combinación con vectores de baculovirus.

[00266] En otros aspectos, las células huésped de mamífero se usan para expresar y producir los polipéptidos anti-CDH6 de la presente divulgación. Por ejemplo, pueden ser bien sea una línea celular de hibridoma que expresa genes de inmunoglobulina endógena (ej., un clon de hibridoma de mieloma) o una línea celular mamífera que alberga un vector de expresión exógeno (ej., las células de mieloma SP2/0). Estas incluyen cualquier célula animal o humana mortal normal o normal o inmortal anormal. Por ejemplo, un número de líneas de células hospederas adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas se han desarrollado incluyendo líneas de células CHO, varias líneas de celulas COS, células HeLa, líneas de células de mieloma, células B transformadas e hibridomas. El uso de cultivo celular de tejido mamífero para expresar polipéptidos se discute en general en, ej., Winnacker, De Genes a Clones, VCH Publishers, Nueva York, NY, 1987. Los vectores de expresión para células hospederas mamíferas pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, y un potenciador (véase, ej., Queen, Immunol. Rev. 89: 49-68, 1986), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras de la transcripción. Estos vectores de expresión contienen generalmente promotores derivados de genes mamíferos o de virus mamíferos. Los promotores adecuados pueden ser constitutivos, específico al tipo celular, específicos a la etapa, y/o modulables o regulables. Promotores útiles incluyen, pero no se limitan a, el promotor de la metalotioneína, el promotor tardío

principal de adenovirus constitutivo, el promotor dexametasona de MMTV, el promotor SV40, el promotor MRP polIII, el promotor MPSV constitutivo, el promotor inducible por tetraciclina de CMV (tal como el promotor temprano inmediato CMV humano), el promotor CMV constitutivo, y combinaciones potenciadoras del promotor conocidas en la técnica.

[00267] Métodos para la introducción de vectores de expresión que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección de cloruro de calcio se utiliza comúnmente para las células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o electroporación puede utilizarse para otros huéspedes celulares (ver generalmente Sambrook *et al.*, supra). Otros métodos incluyen, por ejemplo, electroporación, tratamiento con fosfato de calcio, transformación mediada por liposomas, inyección y microinyección, métodos balísticos, virosomas, inmunoliposomas, policatión: conjugados de ácidos nucleicos, ADN desnudo, viriones artificiales, fusión a la proteína estructural VP22 del virus del herpes (Elliot y O'Hare, (1997) Cell 88:223), agente potenciador de captación de ADN, y transducción ex vivo. Para producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, a menudo se desea expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable cadenas de anticuerpos anti-CDH6 o fragmentos de unión pueden prepararse utilizando vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Tras la introducción del vector, las células pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que se cambien a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento de células que expresan con éxito las secuencias introducidas en medios selectivos. Las células resistentes, transfectadas establemente se pueden proliferar usando técnicas de cultivo de tejidos apropiadas para el tipo de célula.

Usos Terapéuticos y de Diagnóstico

[00268] Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno), y conjugados de fármacos con anticuerpos de la presente divulgación

son útiles en una variedad de aplicaciones, incluyendo, pero sin limitar a, tratamiento de cáncer, tales como cánceres sólidos. En ciertos aspectos, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno), y conjugados de fármacos con anticuerpos son útiles para inhibir el crecimiento tumoral, inducir la diferenciación, reducir el volumen del tumor, y/o reducir la tumorigenicidad de un tumor. Los métodos de uso pueden ser métodos in vitro, ex vivo, o in vivo.

[00269] En un aspecto, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno), y conjugados de fármacos con anticuerpos son útiles para detectar la presencia de CDH6 en una muestra biológica. El término "detección" como se usa en la presente abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En ciertos aspectos, una muestra biológica comprende una célula o tejido. En ciertos aspectos, tales tejidos incluyen tejidos normales y/o cancerosos que expresan CDH6 a niveles más altos en comparación con otros tejidos.

[00270] En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para detectar la presencia de CDH6 en una muestra biológica. En ciertos aspectos, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-CDH6 bajo condiciones permisivas para la unión del anticuerpo al antígeno, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y el antígeno.

[00271] También se incluye un método para diagnosticar un trastorno asociado con la expresión aumentada de CDH6. En ciertos aspectos, el método comprende poner en contacto una célula de ensayo con un anticuerpo anti-CDH6; determinar el nivel de expresión (ya sea cuantitativa o cualitativamente) de CDH6 en la célula de ensayo mediante la detección de la unión del anticuerpo anti-CDH6 al antígeno CDH6; y comparar el nivel de expresión de CDH6 en la célula de ensayo con el nivel de expresión de CDH6 en una célula de control (ej., una célula normal del mismo origen de tejido como la célula de prueba o una célula que expresa CDH6 a niveles comparables a tal célula normal), en donde un mayor nivel de expresión de CDH6 en la celda de ensayo en comparación con la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado con la

expresión aumentada de CDH6. En ciertos aspectos, la célula de ensayo se obtiene de un individuo sospechoso de padecer un trastorno asociado con la expresión aumentada de CDH6. En ciertos aspectos, el trastorno es un trastorno proliferativo celular, tal como un cáncer o un tumor.

[00272] En ciertos aspectos, un método de diagnóstico o detección, tal como los descritos anteriormente, comprende detectar la unión de un anticuerpo anti-CDH6 a CDH6 expresado en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida a partir de una célula que expresa CDH6 en su superficie. Un ensayo de ejemplo para detectar la unión de un anticuerpo anti-CDH6 a CDH6 expresado en la superficie de una célula es un ensayo de "FACS".

[00273] Ciertos otros métodos pueden ser utilizados para detectar la unión de anticuerpos anti-CDH6 a CDH6. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión a antígenos que son bien conocidos en la técnica, tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), inmunoensayo tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, e inmunohistoquímica (IHC).

[00274] En ciertos aspectos, los anticuerpos anti-CDH6 están etiquetados. Las etiquetas incluyen, pero no se limitan a, etiquetas o fracciones que se detectan directamente (etiquetas fluorescentes, de cromóforo, densas en electrones, quimioluminiscentes, y radioactivas), así como fracciones, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, ej., a través de una reacción enzimática o interacción molecular.

[00275] En ciertos aspectos, los anticuerpos anti-CDH6 se inmovilizan sobre una matriz insoluble. La inmovilización implica separar el anticuerpo anti-CDH6 de cualquiera de las proteínas CDH6 que permanecen libres en solución. Esto se lleva a cabo convencionalmente ya sea por insolubilización del anticuerpo anti-CDH6 antes del procedimiento de ensayo, como por adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich et al, Patente de EE.UU. N º 3.720.760), o por acoplamiento covalente (por

ejemplo, utilizando entrecruzamiento de glutaraldehído), o mediante la insolubilización del anticuerpo anti-CDH6 después de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-CDH6 y proteína CDH6, por ejemplo, por inmunoprecipitación.

[00276] Cualquiera de los aspectos anteriores de diagnóstico o detección se pueden llevar a cabo utilizando un inmunoconjugado de la presente divulgación en lugar de o en adición de un anticuerpo anti-CDH6.

[00277] En un aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad que comprende administrar los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno), y conjugados de fármacos con anticuerpos a un paciente, tratando de este modo la enfermedad. En ciertos aspectos, la enfermedad tratada con los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno), y conjugados de fármacos con anticuerpos es un cáncer. Ejemplos de enfermedades que pueden ser tratadas y/o prevenidas incluyen, pero no se limitan a, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer de tejido suave, canceres de CNS, cáncer de tiroides y colangiocarcinoma. En ciertos aspectos, el cáncer se caracteriza por células que expresan CDH6 a las que los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (ej., fragmentos de unión a antígeno), y conjugados de fármacos con anticuerpo se pueden unir específicamente.

[00278] La presente divulgación proporciona métodos para tratar cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno), o conjugados de fármacos con anticuerpos. En ciertos aspectos, el cáncer es un cáncer solidó. En ciertos aspectos, el sujeto es un humano.

[00279] En ciertos aspectos, el método de inhibición del crecimiento tumoral comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno), o conjugados de fármacos con anticuerpos. En ciertos aspectos, el sujeto es un humano. En ciertos aspectos, el sujeto tiene un tumor o ha tenido un tumor extirpado.

[00280] En ciertos aspectos, el tumor expresa la CDH6 a la que se une el anticuerpo anti-CDH6. En ciertos aspectos, el tumor sobreexpresa la CDH6 humana.

[00281] Para el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno), o conjugados de fármacos con anticuerpos depende de varios factores, tales como el tipo de enfermedad a tratar, la gravedad y curso de la enfermedad, la capacidad de respuesta de la enfermedad, la terapia anterior, la historia clínica del paciente, y así sucesivamente. El anticuerpo o agente se puede administrar una vez o durante una serie de tratamientos que duran desde varios días a varios meses, o hasta que una cura se efectúe o se logre una disminución del estado de la enfermedad (por ejemplo, Reducción en el tamaño del tumor). Horarios de dosificación óptimos pueden ser calculados a partir de medidas de acumulación de fármacos en el cuerpo del paciente y variaran dependiendo de la potencia relativa de un anticuerpo individual, fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno), o conjugados de fármacos con anticuerpos. En ciertos aspectos, la dosis es de 0,01 mg a 10 mg (por ejemplo, 0,01 mg, 0,05 mg, 0.lmg, 0.5mg, 1mg, 2 mg, 3mg, 4mg, 5mg, 7mg, 8mg, 9mg, o 10mg) por kg de peso corporal, y puede darse una o más veces al día, semanal, mensual o anualmente. En ciertos aspectos, el anticuerpo, fragmento de anticuerpo (ej., fragmento de unión a antígeno), o conjugado de fármaco de anticuerpos de la presente divulgación se administra una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. El médico tratante puede estimar las tasas de repetición para la dosificación con base en los tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en fluidos o tejidos corporales.

Terapia de combinación

[00282] En ciertos ejemplos, una anticuerpo, fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmento de unión a antígeno), o conjugado de fármaco de anticuerpos de la presente divulgación se combina con otros agentes terapéuticos, tales como otros agentes anticancerígenos, agentes antialérgicos, agentes anti-náuseas (o antieméticos), analgésicos, agentes citoprotectores , y combinaciones de los mismos.

[00283] Agentes quimioterapéuticos generales considerados para utilizar en terapias de combinación incluyen anastrozol (Arimidex ®), bicalutamida (Casodex ®), sulfato de bleomicina (Blenoxane ®), busulfán (Myleran ®), busulfán inyectable (Busulfex ®), capecitabina (Xeloda®), N4- pentoxicarbonil- 5- deoxi- 5- fluorocitidina, carboplatino (Paraplatin ®), carmustina (BiCNU®), clorambucil (Leukeran ®), cisplatino (Platinol ®), cladribina (Leustatin ®), ciclofosfamida (Cytoxan ® o Neosar ®), citarabina, arabinósido de citosina (Cytosar- U ®), citarabina liposomal inyectable (DepoCyt ®), dacarbazina (DTIC- Dome ®), dactinomicina (actinomicina D, Cosmegan), clorhidrato de daunorubicina (Cerubidine ®), inyección de citrato de daunorubicina liposomal (DaunoXome ®), dexametasona, docetaxel (Taxotere ®), clorhidrato de doxorubicina (Adriamicin ®, Rubex ®), etopósido (Vepesid ®), fosfato de fludarabina (Fludara ®), 5- fluorouracilo (Adrucil ®, Efudex ®), flutamida (Eulexin ®), tezacitibina, gemcitabina (difluorodeoxicitidina), hidroxiurea (Hydrea ®), idarubicina (Idamycin ®), ifosfamida (IFEX ®), irinotecan (Camptosar ®), L- asparaginasa (Elspar ®), leucovorina cálcica, melfalán (Alkeran ®), 6- mercaptopurina (Purinetol ®), metotrexato (Folex ®), mitoxantrona (Novantrone ®), Mylotarg, paclitaxel (Taxol ®), Phoenix (Yttrium90/MX- DTPA), pentostatina, polifeprosan 20 con implante de carmustina (Gliadel®), citrato de tamoxifeno (Nolvadex ®), tenipósido (Vumon ®), 6- tioguanina, tiotepa, tirapazamina (Tirazone ®), clorhidrato de topotecán inyectable (Hycamptin ®), vinblastina (Velban ®), vincristina (Oncovin ®), y vinorelbina (Navelbine ®).

[00284] En un aspecto, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmento de unión a antígeno), o conjugado de fármaco de anticuerpos de la presente divulgación se combina en una formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación como terapia de combinación, con un segundo compuesto que tiene propiedades anti-cancerigenas. El segundo compuesto de la formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación puede tener actividades complementarias al anticuerpo o inmunoconjugado de la combinación de tal manera que no se afecten negativamente entre sí. Por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de anticuerpos (por

ejemplo, fragmento de unión a antígeno), o conjugado de fármaco de anticuerpos de la presente divulgación se pueden administrar en combinación con, pero sin limitar a, un agente quimioterapéutico, un inhibidor de la tirosina quinasa, por ejemplo, Imatinib.

[00285] El término "combinación farmacéutica" como se usa en la presente se refiere a bien sea una combinación en una forma de dosificación unitaria, o una combinación no fija o un kit de partes para la administración combinada donde dos o más agentes terapéuticos se pueden administrar de forma independiente al mismo tiempo o por separado dentro de intervalos de tiempo, sobre todo cuando estos intervalos de tiempo permiten que los patrones de combinación muestren un efecto cooperativo, por ejemplo sinérgico.

[00286] El término "terapia de combinación" se refiere a la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una condición o trastorno terapéutico descrito en la presente divulgación. Dicha administración abarca la co-administración de estos agentes terapéuticos en una manera sustancialmente simultánea, tal como en una sola cápsula que tiene una tasa fija de ingredientes activos. Alternativamente, dicha administración abarca la co-administración en recipientes múltiples, o separados (ej., cápsulas, polvos y líquidos) para cada ingrediente activo. Los polvos y/o líquidos se pueden reconstituir o diluir a una dosis deseada antes de la administración. Además, tal administración también abarca el uso de cada tipo de agente terapéutico en una manera secuencial, bien sea al mismo tiempo aproximadamente o en tiempos diferentes. En cualquier caso, el régimen de tratamiento proporcionará efectos beneficiosos de la combinación de fármacos en el tratamiento de condiciones o trastornos descritos en la presente.

[00287] La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y demostrar "sinérgica", es decir., el efecto logrado cuando los ingredientes activos utilizados juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan del uso de los compuestos por separado. Un efecto sinérgico se puede alcanzar cuando los ingredientes activos son: (1) co-formulados y administrados o suministrados simultáneamente en una formulación de dosificación unitaria combinada; (2) entregados por la alternancia o en paralelo como

formulaciones separadas, o (3) por algún otro régimen. Cuando se entrega en la terapia de alternancia, un efecto sinérgico se puede alcanzar cuando los compuestos se administran o se entregan secuencialmente, por ejemplo, por diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia de alternancia, una dosificación eficaz de cada ingrediente activo se administra secuencialmente, es decir., en serie, mientras que en la terapia de combinación, las dosis efectivas de dos o más ingredientes activos se administran juntas.

[00288] En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de cáncer mediante la administración, a un sujeto en necesidad del mismo, de un conjugado de fármaco de anticuerpos en combinación con uno o más inhibidores de la tirosina quinasa, incluyendo, pero sin limitar a, inhibidores EGFR, inhibidores Her2, inhibidores Her3, inhibidores IGFR e inhibidores Met.

[00289] Por ejemplo, inhibidores de la tirosina quinasa incluyen, pero no se limitan a, hidrocloruro de erlotinib (Tarceva ®); Linifanib (N-[4 - (3-amino-1H-indazol-4-il) fenil]-N'-(2-fluoro -5-metilfenil) urea, también conocido como ABT 869, disponible en Genentech); malato de sunitinib (Sutent ®); bosutinib (4-[(2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino]-6-metoxi-7-[3-(4-metilpiperazin-1-il)propoxi]quinolina-3-carbonitrilo, también conocido como SKI-606, y descrito en la patente de EE.UU. N º 6.780.996); dasatinib (Sprycel ®); pazopanib (pazopanib ®); sorafenib (Nexavar ®); Zactima (ZD6474); nilotinib (Tasigna®); Regorafenib (Stivarga®) e imatinib o mesilato de imatinib (Gleevec ® y Gilvec ®).

[00290] Inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) incluyen, pero no se limitan a, hidrocloruro de erlotinib (Tarceva ®), Gefitnib (Iressa ®); N-[4-[(3-Cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[[(3''S'')-tetrahidro-3-furanil]oxi]-6-quinazolinil]-4(dimetilamino)-2-butenamida, Tovok ®); vandetanib (Caprelsa ®); Lapatinib (Tykerb ®); (3R,4R)-4-Amino-1-((4-((3-metoxifenil)amino)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)metil)piperidin-3-ol (BMS690514); dihidrocloruro de canertinib (CI-1033); 6 - [4 - [(4-Etil-1-piperazinil) metil] fenil]-N-[(1R)-1-feniletil] - 7H-pirrolo [2, 3-d] pirimidin-4-amina (AEE788, CAS 497839-62-0); Mubritinib (TAK165); Pelitinib (EKB569); Afatinib (BIBW2992); Neratinib

(HKI-272); ácido N-[4-[[1-[(3-Fluorofenil)metil]-1H-indazol-5-il]amino]-5-metilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-il]-carbamico, éster de (3S)-3-morfolinilmetilo (BMS599626); N-(3,4-Dicloro-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[[(3aα,5β,6aα)-octahidro-2-metilciclopenta[c]pirrol-5-il]metoxi]- 4-quinazolinamina (XL647, CAS 781613-23-8), y 4 - [4 - [[(1R)-1-feniletil] amino]-7H-pirrolo [2,3-d] pirimidin-6-il]-fenol (PKI166, CAS 187724-61-4).

[00291] Los anticuerpos EGFR incluyen, pero no se limitan a, Cetuximab (Erbitux ®); panitumumab (Vectibix ®); matuzumab (EMD-72000); Nimotuzumab (hR3); zalutumumab; TheraCIM h-R3; MDX0447 (CAS 339151 -96-1) y ch806 (MAB-806, CAS 946414-09-1).

[00292] Los inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (receptor HER2) (también conocido como Neu, ErbB-2, CD340, o p185) incluyen, pero no se limitan a, trastuzumab (Herceptin ®); pertuzumab (Omnitarg ®); Neratinib (HKI-272 , (2E)-N-[4-[[3-cloro-4-[(piridin-2-il)metoxi]fenil]amino]-3-ciano-7-etoxiquinolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida, y se describen en la publicación PCT N º WO 05/028443); lapatinib o lapatinib ditosilato (TYKERB ®); (3R,4R)-4-amino-1-((4-((3-metoxifenil)amino)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)metil)piperidin-3-ol (BMS690514); (2E)-N-[4-[(3-Cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[[(3S)-tetrahidro-3-furanil]oxi]-6-quinazolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida (BIBW-2992, CAS 850140-72-6); ácido N-[4-[[1-[(3-Fluorofenil)metil]-1H-indazol-5-il]amino]-5-metilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-il]-carbámico, éster (3S)-3-morfolinilmetilo (BMS 599626, CAS 714971-09-2); dihidrocloruro de canertinib (PD183805 o CI-1033); y N-(3,4-Dicloro-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[[(3aα,5β,6aα)-octahidro-2-metilciclopenta[c]pirrol-5-il]metoxi]- 4-quinazolinamina (XL647, CAS 781613-23-8).

[00293] Inhibidores HER3 incluyen, pero no se limitan a, LJM716, MM-121, AMG-888, RG7116, REGN-1400, AV-203, MP-RM-1, MM-111, y MEHD-7945A.

[00294] Inhibidores MET incluyen, pero no se limitan a, Cabozantinib (XL184, CAS 849217-68-1); Foretinib (GSK1363089, anteriormente XL880, CAS 849217-64-7); Tivantinib (ARQ197, CAS 1000873-98-2); 1- (2-hidroxi-2-metilpropil) -*N*- (5 - (7-

metoxiquinolin-4-iloxi) piridin-2-il)-5-metil-3-oxo-2-fenil-2 ,3-dihidro-1*H*-Pirazol-4-carboxamida (AMG 458); Crizotinib (Xalkori ®, PF-02341066); (3Z)-5-(2,3-Dihidro-1H-indol-1-ilsulfonil)-3-({3,5-dimetil-4-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-1H-pirrol-2-il}metileno)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (SU11271); (3Z)-N-(3-Clorofenil)-3-({3,5-dimetil-4-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-1H-pirrol-2-il}metileno)-N-metil-2-oxoindolina-5-sulfonamida (SU11274); (3Z)-N-(3-Clorofenil)-3-{[3,5-dimetil-4-(3-morfolin-4-ilpropil)-1H-pirrol-2-il]metileno}-N-metil-2-oxoindolina-5-sulfonamida (SU11606); 6 - [difluoro [6 - (1-metil-1H-pirazol-4-il) -1,2,4-triazolo [4,3-b] piridazin-3-il] metil]-quinolina (JNJ38877605, CAS 943540-75-8); 2 - [4 - [1 - (quinolin-6-ilmetil)-1H-[1,2,3] triazolo [4,5-b] pirazin-6-il] - 1H-pirazol-1-il] etanol (PF04217903, CAS 956905-27-4); N-((2R)-1,4-Dioxan-2-ilmetil)-N-metil-N'-[3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-5-oxo-5H-benzo[4,5]ciclohepta[1,2-b]piridin-7-il]sulfamida (MK2461, CAS 917879-39-1); 6 - [[6 - (1-metil-1H-Pirazol-4-il) -1,2,4-triazolo [4,3 -b] Piridazin-3-il] tio]-quinolina (SGX523, CAS 1022150-57-7); y (3Z) -5 - [[(2,6-diclorofenil) metil] sulfonil] -3 - [[3,5-dimetil-4-[[(2R) -2 - (1-pirrolidinilmetil)-1-pirrolidinil] carbonil] -1H-Pirrol-2-il] metileno] -1,3-dihidro-2H-Indol-2-ona (PHA665752, CAS 477575-56-7).

[00295] Inhibidores IGF1R incluyen, pero no se limitan a, BMS-754807, XL-228, OSI-906, GSK0904529A, A-928605, AXL1717, KW-2450, MK0646, AMG479, IMCA12, MEDI-573, y BI836845. Veáse ej., Yee, JNCI, 104; 975 (2012) para revisión.

[00296] En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de cáncer mediante la administración, a un sujeto en necesidad del mismo, de un conjugado de fármaco de anticuerpos en combinación con uno o más inhibidores de ruta de señalización corriente abajo FGF, incluyendo, pero sin limitar a, inhibidores MEK, inhibidores Braf, inhibidores PI3K/Akt, inhibidores SHP2, y también inhibidores de la mTor.

[00297] Por ejemplo, inhibidores de proteína quinasa activadas por mitógenos (MEK) incluyen, pero no se limitan a, XL-518 (también conocido como GDC-0973, Cas N º 1029872-29-4, disponible en ACC Corp.); 2 - [(2-cloro-4-yodofenil) amino] - N-(ciclopropilmetoxi) -3,4-difluoro-benzamida (también conocido como CI-1040 o PD184352 y descrito en la Publicación PCT N º WO2000035436), N-[(2R) -2,3-dihidroxipropoxi] -3,4 -

difluoro-2-[(2-fluoro-4-yodofenil) amino] - benzamida (también conocido como PD0325901 y descrito en la Publicación PCT N º WO2002006213); 2,3-bis [amino [(2-aminofenil) tio] metileno] -butanodinitrilo (también conocido como U0126 y descrito en la Patente de EE.UU. N º 2.779.780), N-[3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-yodofenil) amino]-6-metoxifenil] -1 - [(2R) -2,3-dihidroxipropil] - ciclopropanosulfonamida (también conocido como RDEA119 o BAY869766 y descrito en la Publicación PCT N º WO2007014011); (3S, 4R, 5Z, 8S, 9S, 11E) -14 - (etilamino) -8, 9,16-trihidroxi-3 ,4-dimetil-3, 4,9, 19-tetrahidro-1H-2-benzoxaciclotetradecina-1, 7 (8H)-diona] (también conocido como E6201 y descrito en la Publicación PCT N º WO2003076424); 2'-amino-3'-metoxiflavona (también conocido como PD98059 disponible de Biaffin GmbH & Co., KG, Alemania); vemurafenib (PLX-4032, CAS 918504-65-1); (R)-3-(2,3-Dihidroxipropil)-6-fluoro-5-(2-fluoro-4-iodofenilamino)-8-metilpirido[2,3-d]pirimidina-4,7(3H,8H)-diona (TAK-733, CAS 1035555-63-5); Pimasertib (AS-703 026, CAS 1204531-26-9) y dimetilsulfóxido de Trametinib (GSK-1.120.212, CAS 1204531-25-80).

[00298] Los inhibidores de la fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) incluyen, pero no se limitan a,4-[2-(1H-Indazol-4-il)-6-[[4-(metilsulfonil)piperazin-1-il]metil]thieno[3,2-d]pirimidin-4-il]morfolina (también conocido como GDC 0941 y descrito en la Publicación PCT Nos. WO 09/036082 y WO 09/055730); 2-mti-2-[4-[3-metil-2-oxo-8-(quinolin-3-il)-2,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-1-il]fenil]propionitrilo (también conocido como BEZ 235 o NVP-BEZ 235, y descrito en la publicación PCT N o. WO 06/122806); 4 - (trifluorometil)-5-(2,6-dimorfolinopirimidin-4-il) piridin-2-amina (también conocido como BKM120 o NVP-BKM120, y descrito en la Publicación PCT No. WO2007/084786); Tozasertib (VX680 o MK-0457, CAS 639089-54-6); (5Z) -5 - [[4 - (4 - piridinil)-6-quinolinil] metileno] -2,4-tiazolidinediona (GSK1059615, CAS 958852-01-2); (1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(Acetiloxi)-1-[(di-2-propenilamino)metileno]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-octahidro-11-hidroxi-4-(metoximetil)-4a,6a-dimetil-ciclopenta[5,6]nafto[1,2-c]piran-2,7,10(1H)-triona (PX866, CAS 502632-66-8), y 8-fenil-2-(morfolin-4-il)-cromen-4-ona (LY294002, CAS 154447-36-6).

[00299] Inhibidores de mTOR incluyen pero no se limitan a Temsirolimus (Torisel®); Ridaforolimus (anteriormente conocido como deferolimus, dimetilfosfinato de (1*R*,2*R*,4*S*)-4-[(2*R*)-2 [(1*R*,9*S*,12*S*,15*R*,16*E*,18*R*,19*R*,21*R*,23*S*,24*E*,26*E*,28*Z*,30*S*,32*S*,35*R*)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23, 29,35-hexameti-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1.0,4,9] hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexilo, también conocido como AP23573 y MK8669, y descrito en la Publicación PCT No. WO 03/064383); Everolimus (Afinitor® or RAD001); Rapamicina (AY22989, Sirolimus®); Simapimod (CAS 164301-51-3); (5-{2,4-Bis[(3S)-3-metilmorfolin-4-yl]pirido[2,3-d]pirimidin-7-il}-2-metoxifenil)metanol (AZD8055); 2-Amino-8-[*trans*-4-(2-hidroxietoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metil-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7(8*H*)-ona (PF04691502, CAS 1013101-36-4); y ^{N2}-[1,4-dioxo-4-[[4-(4-oxo-8-fenil-4*H*-1-benzopiran-2-il)morfolinio-4-il]metoxi]butil]-L-arginilglicil-L--aspartilL-serina-, sal interna (SF1126, CAS 936487-67-1).

[00300] En aún otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de cáncer mediante la administración, a un sujeto en necesidad del mismo, de un conjugado de fármaco con anticuerpo en combinación con uno o más pro-apoptóticos, incluyendo, pero sin limitar a, inhibidores IAP, inhibidores Bcl2, inhibidores MCl1, agentes Trail e inhibidores Chk.

[00301] Por ejemplo, inhibidores de la IAP incluyen, pero no se limitan a, NVP-LCL161, GDC-0917, AEG-35156, AT406, y TL32711. Otros ejemplos de inhibidores de IAP incluyen, pero no se limitan a los descritos en WO04/005284, WO 04/007529, WO05/097791, WO 05/069894, WO 05/069888, WO 05/094818, US2006/0014700, US2006/0025347, WO 06/069063, WO 06/010118, WO 06/017295, y WO08/134679, todos los cuales se incorporan en la presente como referencia.

[00302] Inhibidores BCL-2 incluyen, pero no se limitan a, 4-[4-[[2-(4-Clorofenil)-5,5-dimetil-1-ciclohexen-1-il]metil]-1-piperazinil]-N-[[4-[[(1R)-3-(4-morfolinil)-1-[(feniltio)metil]propil]amino]-3-[(trifluorometil)sulfonil]fenil]sulfonil]benzamida (también conocida como ABT-263 y descrita en la publicación PCT N º WO 09/155386); Tetrocarcin

A; antimicina; Gosipol ((-) BL-193); obatoclax; Etil-2-amino-6-ciclopentil-4-(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetil)-4Hcromona-3-carboxilato (HA14 - 1); Oblimersen (G3139, Genasense ®); péptido BH3 de Bak; (-)- ácido acético gosipol (AT-101); 4-[4-[(4'-Cloro[1,1'-bifenil]-2-il)metil]-1-piperazinil]-N-[[4-[[(1R)-3-(dimetilamino)-1-[(feniltio)metil]propil]amino]-3-nitrofenil]sulfonil]-benzamida (ABT-737, CAS 852808-04-9) y Navitoclax (ABT-263, CAS 923564-51-6).

[00303] Agonistas de los receptores proapoptóticos (PARAs) incluyendo DR4 (TRAILR1) y DR5 (TRAILR2), incluyendo, pero sin limitar a, Dulanermin (AMG-951, RhApo2L/TRAIL); mapatumumab (HRS-ETR1, CAS 658052-09-6); Lexatumumab (HGS-ETR2, CAS 845816-02-6); Apomab (Apomab ®); Conatumumab (AMG655, CAS 896731-82-1) y Tigatuzumab (CS1008, CAS 946415-34-5, disponible en Daiichi Sankyo).

[00304] Inhibidores de la quinasa de chequeo (CHK) incluyen, pero no están limitados a 7-Hidroxistaurosporina (UCN-01); 6-bromo-3-(1-metil-1H-Pirazol-4-il) -5 - (3R)-3-piperidinil-pirazolo [1,5 -a] Pirimidin-7-amina (SCH900776, CAS 891494-63-6); N-[(S)-piperidin-3-il] amida del ácido 5 - (3-fluorofenil)-3-ureidotiofeno-2-carboxílico (AZD7762, CAS 860352-01-8); 4 - [((3S)-1-azabiciclo [2.2.2] oct-3-il) amino] -3 - (1H-bencimidazol-2-il)-6-cloroquinolin-2 (1H)-ona (CHIR 124, CAS 405168-58-3); 7-aminoactinomicina (7-AAD), isogranulatimida, debromohimenialdisina, N-[5-bromo-4-metil-2-[(2S) -2 -morfolinilmetoxi]-fenil]-N'-(5-metil-2-pirazinilo) urea (LY2603618, CAS 911222-45-2); sulforafano (CAS 4478-93-7, 4-Metilsulfinilbutil isotiocianato); 9,10,11 ,12-tetrahidro-9,12-epoxi-1H-diindolo [1,2,3 -fg: 3 ', 2', 1'-kl] Pirrolo [3,4 -i] [1,6] benzodiazocina-1, 3 (2H)-diona (SB-218078, CAS 135897-06-2) y TAT-S216A (YGRKKRRQRRRLYRSPAMPENL) y CBP501 ((d-BPA)sws (d-Phe-F5) (d-Cha) rrrqrr). Cáncer. Ther 2007; 6(1):147-153), y CBP501.

[00305] En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento del cáncer mediante la administración, a un sujeto en necesidad del mismo, de un conjugado de fármaco de anticuerpos en combinación con uno o más inhibidores FGFR. Por ejemplo, los inhibidores de FGFR incluyen, pero no se limitan a, alaninato de

Brivanib (BMS-582664, (S)-((R)-1-(4-(4-fluoro-2-metil-1H-indol-5-iloxi)-5-metilpirrolo [2,1 - f][l, 2,4] triazin-6-iloxi) propan-2-il) 2-aminopropanoato); vargatef (BIBFI120, CAS 928326-83-4); ácido diláctico de Dovitinib (TKI258, CAS 852433-84-2); 3-(2,6-Dicloro-3,5-dimetoxi-fenil)-1-{6-|4-(4-etil-piperazin-1-il)-fenilamino]-pirimidin-4-il}-1-metil-urea (BGJ398, CAS 872511-34-7); Danusertib (PHA-739358); y (PDI73074, CAS 219580-11-7). En un aspecto específico, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento del cáncer mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo de un conjugado de fármaco con anticuerpo en combinación con un inhibidor de FGFR2, tal como 3-(2,6-dicloro-3,5-dimetoxifenil)-1-(6((4-(4-etilpiperazin-1-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-1-metilurea (también conocida como BGJ-398), o 4-amino-5-fluoro-3-(5 - (4-metilpiperazin1-il) -1H-Benzo [d] Imidazol-2-il) quinolin-2 (1H)-ona (también conocida como dovitinib o TKI-258). AZD4547 (Gavine *et al.*, 2012, Cancer Research 72, 2045-56, N-[5 - [2 - (3,5-dimetoxifenil) etil]-2H-pirazol-3-il] -4 - (3R, 5S)-dimetilpiperazin-1- il) benzamida), Ponatinib (AP24534; Gozgit *et al.*, 2012, Mol Cancer Ther., 11; 690-99;. 3 - [2 - (imidazo [1,2-b] piridazin-3-il) etinil]-4-metil-N-{4 - [(4 - metilpiperazin-1-il) metil] -3 - (trifluorometil) fenil} benzamida, CAS 943319-70-8)

<u>Composiciones Farmacéuticas</u>

[00306] Para preparar las composiciones farmacéuticas o estériles incluyendo inmunoconjugados, los inmunoconjugados de la invención se mezclan con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener adicionalmente uno o más de otros agentes terapéuticos que son adecuados para el tratamiento o la prevención del cáncer, por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer de tejido suave, cánceres de CNS, cáncer de tiroides y colangiocarcinoma.

[00307] Las formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico se pueden preparar mediante la mezcla con vehículos, excipientes, o estabilizadores fisiológicamente aceptables en la forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, suspensiones, soluciones

acuosas, lociones o suspensiones (véase, por ejemplo, Hardman, et al. (2001) de Goodman y Gilman The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nueva York, NY; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, y Wilkins, New York, NY., 2000; Avis, *et al*. (eds.) Formas Farmacéuticas de Dosificación: Medicamentos Precursores, Marcel Dekker, NY, 1993; Lieberman, (eds.) Formas Farmacéuticas de Dosificación: Tabletas, Marcel Dekker, NY, 1990; Lieberman, *et al*. (eds.) Formas Farmacéuticas de Dosificación: Sistemas Dispersos, Marcel Dekker, NY, 1990; Weiner y Kotkoskie Excipiente Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY., 2000).

[00308] En un aspecto específico, la forma de servicio clínico (CSF) de los conjugados de fármacos con anticuerpos de la presente descripción es un liofilizado en vial que contiene el ADC, succinato de sodio y polisorbato 20. El liofilizado se puede reconstituir con agua para inyección, la solución comprende el ADC, succinato de sodio, sacarosa y polisorbato 20 a un pH de 5.0 aproximadamente. Para la administración intravenosa posterior, la solución obtenida generalmente se diluirá adicionalmente en una solución portadora.

[00309] Seleccionar un régimen de administración para un agente terapéutico depende de varios factores, incluyendo la tasa de renovación sérica o tisular de la entidad, el nivel de síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica. En ciertos aspectos, un régimen de administración maximiza la cantidad de agente terapéutico administrado al paciente coherente con un nivel aceptable de efectos secundarios. En consecuencia, la cantidad de agente biológico entregado depende en parte de la entidad particular y la gravedad de la condición a tratar. Orientación en la selección de dosis apropiadas de anticuerpos, citoquinas y moléculas pequeñas están disponibles (véase, por ejemplo, Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK, 1996; Kresina (ed.) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Artritis, Marcel Dekker, New York, NY., 1991; Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoinmune Diseases, Marcel Dekker,

New York, NY, 1993; Baert, et al, New Engl. J. Med. 348:601-608, 2003; Milgrom, New Engl. J. Med. 341:1966-1973, 1999; Slamon, New Engl. J. Med. 344:783-792, 2001; Beniaminovitz, New Engl. J. Med. 342:613-619, 2000; Ghosh, New Engl. J. Med. 348:24-32, 2003; Lipsky, New Engl. J. Med. 343:1594-1602, 2000).

[00310] La determinación de la dosis apropiada se realiza por el médico, por ejemplo, usando parámetros o factores conocidos o supuestos en la técnica que afectan el tratamiento o se prevé que afectan al tratamiento. Generalmente, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y se aumenta en pequeños incrementos a partir desde allí hasta que el efecto deseado u óptimo se obtiene con respecto a cualquier efecto secundario negativo. Importantes medidas de diagnóstico incluyen las de síntomas de, por ejemplo, la inflamación o el nivel de citoquinas inflamatorias producidas.

[00311] Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en los conjugados de fármacos con anticuerpos de composiciones farmacéuticas pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares empleadas de la presente divulgación, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica anterior del paciente a tratar, y factores de este tipo conocidos en las técnicas médicas.

[00312] Las composiciones que comprenden anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden ser proporcionadas por infusión continua, o mediante dosis a intervalos de, por ejemplo, un día, una semana, o 1-7 veces por semana. Las dosis se pueden proporcionar por vía intravenosa, subcutánea, tópica, oral, nasal, rectal, intramuscular,

intracerebral o por inhalación. Un protocolo de dosis específico es uno que implica la dosis máxima o frecuencia de la dosis que evita efectos secundarios indeseables significativos.

[00313] Para los inmunoconjugados de la presente divulgación, la dosificación administrada a un paciente puede ser 0.0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosificación puede estar entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, 0,0001 mg/kg a 0,25 mg/kg, de 0,0001 a 0,15 mg/kg, de 0,0001 a 0,10 mg/kg, de 0,001 a 0,5 mg/kg, 0,01 a 0,25 mg/kg o de 0,01 a 0,10 mg/kg de peso corporal del paciente. La dosificación de los anticuerpos o fragmentos de los mismos se puede calcular utilizando el peso del paciente en kilogramos (kg) multiplicado por la dosis a ser administrada en mg/kg.

[00314] Las dosis de los inmunoconjugados pueden ser repetidas y las administraciones se pueden separar por lo menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses, o por lo menos 6 meses. En un aspecto específico, las dosis de los inmunoconjugados de la presente divulgación se repiten cada 3 semanas.

[00315] Una cantidad eficaz para un paciente particular puede variar dependiendo de factores tales como la condición a tratar, la salud general del paciente, la vía, método y dosis de administración y la severidad de efectos secundarios (véase, por ejemplo, Maynard, et al. (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent, Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., Londres, UK, 2001).

[00316] La vía de administración puede ser mediante, por ejemplo, la aplicación tópica o cutanea, inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial intracerebroespinal, intralesional, o mediante sistemas de liberación sostenida o un implante (Ver, por ejemplo., Sidman, (1983)

Biopolymers 22:547-556; Langer, (1981) J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277; Langer (1982) Chem. Tech. 12:98-105; Epstein, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692; Hwang, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034; Patente Nos. 6,350,466 y 6,316,024). Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante o un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección, o ambos. Además, la administración pulmonar también se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosol. Veáse, por ejemplo Patente EE.UU. Nos. 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540, y 4.880.078, y la publicación PCT N º WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903, cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

[00317] Una composición de la presente divulgación también se puede administrar por una o más vías de administración utilizando una o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las rutas de administración seleccionadas para los inmunoconjugados incluyen rutas intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras rutas parenterales de administración, por ejemplo por inyección o infusión. La administración parenteral puede representar modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal. Alternativamente, una composición de la presente divulgación puede administrarse por vía no parenteral, tal como una ruta de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual, o tópica. En un aspecto, los inmunoconjugados de la presente divulgación se administran por infusión. En otro aspecto, los inmunoconjugados se administran por vía subcutánea.

[00318] Si los inmunoconjugados de la presente divulgación se administran en un sistema de liberación controlada o liberación sostenida, una bomba puede ser usada para conseguir una liberación controlada o sostenida (véase Langer, supra; Sefton, CRC Crit. Ref Biomed. Eng. 14:20, 1987; Buchwald *et al.*, Surgery 88:507, 1980; Saudek *et al.*, N. Engl. J. Med. 321:574, 1989). Los materiales poliméricos pueden utilizarse para lograr liberación controlada o sostenida de las terapias de los inmunoconjugados (véase ej., *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla., 1974; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York, 1984; Ranger y Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61, 1983; veáse también Levy, Science 228:190, 1985; During, Ann. Neurol. 25:351, 1989; Howard, J. Neurosurg. 7 1:105, 1989; Patente EE.UU. No. 5,679,377; Patente EE.UU. No. 5,916,597; Patente EE.UU. No. 5,912,015; Patente EE.UU. No. 5,989,463; Patente EE.UU. No. 5,128,326; Publicación PCT WO 99/15154; y Publicación PCT No. WO 99/20253. Ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli (metacrilato de 2-hidroxietilo), poli (metacrilato de metilo), poli (ácido acrílico), poli (acetato de etileno-co-vinilo), poli (ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli (N-vinil pirrolidona), poli (alcohol vinílico), poliacrilamida, poli (etilenglicol), polilactidas (PLA), poli (lactida-co-glicólidos) (PLGA), y poliortoésteres. En un aspecto, el polímero utilizado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixiviables, estable al almacenamiento, estéril y biodegradable. Un sistema de liberación controlada o sostenida se puede colocar en proximidad de la diana profiláctica o terapéutica, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, arriba, vol. 2, pp. 115-138, 1984).

[00319] Sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer, Science 249:1527-1533, 1990). Cualquier técnica conocida por un experto en la técnica puede ser utilizada para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más inmunoconjugados de la presente divulgación. Veáse, por ejemplo Patente

EE.UU. No. 4.526.938, la publicación PCT WO 91/05548, la publicación PCT WO 96/20698, Ning , (1996), Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al., (1995) PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, Cleek *et al*., (1997) Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, 1997; y Lam., Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, 1997, cada una de las cuales se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

[00320] Si los inmunoconjugados de la divulgación se administran por vía tópica, se pueden formular en forma de una pomada, crema, parche transdérmico, loción, gel, shampoo, spray, aerosol, solución, emulsión u otra forma bien conocida por un experto en la técnica. Véase, ej., Ciencias Farmacéuticas e Introducción a Formas Farmacéuticas de Dosificación de Remington, 19a ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para formas de dosificación tópicas no pulverizables, típicamente se emplean formas viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tiene una viscosidad dinámica, en algunos casos, mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, ungüentos, y similares, que son, si se desea, esterilizados o mezclados con agentes auxiliares (por ejemplo, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, buffers, o sales) para influir en diversas propiedades, tales como, por ejemplo, presión osmótica. Otras formas adecuadas de dosificación tópica incluyen preparaciones en aerosol pulverizables en donde el ingrediente activo, en algunos casos, en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un volátil presurizado (por ejemplo, un propelente gaseoso, tal como freón) o en una botella a presión. Hidratantes o humectantes también se pueden añadir a las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación si se desea. Ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

[00321] Si las composiciones que comprenden los inmunoconjugados se administran por vía intranasal, se puede formular en una forma de aerosol, pulverización,

neblina o en forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para uso de acuerdo con la presente divulgación pueden administrarse convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos (compuestos de, por ejemplo, gelatina) para uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla de polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

[00322] Los métodos para la co-administración o el tratamiento con un segundo agente terapéutico, por ejemplo, una citoquina, esteroide, agente quimioterapéutico, antibiótico o radiación, son conocidos en la técnica (see, e.g., Hardmanet al., (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10.sup.th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner y Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.). Una cantidad efectiva de agente terapéutico puede disminuir los síntomas en al menos un 10%; por lo menos 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos 40%, o al menos 50%.

[00323] Terapias adicionales (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos), que se pueden administrar en combinación con los inmunoconjugados se pueden administrar con menos de 5 minutos de diferencia, menos de 30 minutos de diferencia, 1 hora de diferencia, 1 hora de diferencia aproximadamente, entre 1 y 2 horas de diferencia aproximadamente, entre 2 y 3 horas de diferencia aproximadamente, entre 3 y 4 horas de diferencia aproximadamente, entre 4 y 5 horas de diferencia aproximadamente, entre 5 y 6 horas aproximadamente de diferencia, entre 6 y 7 horas de diferencia aproximadamente, entre 7 horas y 8 horas de diferencia aproximadamente, entre 8 y 9

horas de diferencia aproximadamente, entre 9 y 10 horas de diferencia aproximadamente, entre 10 y 11 horas de diferencia aproximadamente, entre 11 y 12 horas de diferencia aproximadamente, entre 12 horas y 18 horas de diferencia, entre 18 y 24 horas de diferencia, entre 24 y 36 horas de diferencia, entre 36 y 48 horas de diferencia, entre 48 a 52 horas de diferencia aproximadamente, entre 52 y 60 horas de diferencia aproximadamente, entre 60 y 72 horas de diferencia aproximadamente, entre 72 horas y 84 horas de diferencia aproximadamente, entre 84 y 96 horas de diferencia aproximadamente, o entre 96 y 120 horas de diferencia aproximadamente de los inmunoconjugados de la presente divulgación. Las dos o más terapias pueden administrarse dentro de una misma visita del paciente.

[00324] En ciertos aspectos, los inmunoconjugados pueden formularse para asegurar la distribución apropiada in vivo. Por ejemplo, la barrera sangre-cerebro (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la divulgación crucen la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véase, ej., Patentes EE.UU Nos. 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender una o más fracciones que se transportan selectivamente a células u órganos específicos, mejorando así la entrega dirigida de fármacos (véase, ej., Ranade, (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Fracciones de direccionamiento de Ejemplo incluyen folato o biotina (veáse, ej., Pat. EE.UU. No. 5,416,016 de Low); mannosidas (Umezawa, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (Bloeman, (1995) FEBS Lett. 357:140; Owais, (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor de proteína A surfactante (Briscoe, (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p 120 (Schreier et al, (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); veáse también K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Inmunomethods4:273.

[00325] La presente divulgación proporciona protocolos para la administración de la composición farmacéutica que comprende inmunoconjugados sola o en combinación con otras terapias a un sujeto en necesidad del mismo. Las terapias de combinación (ej.,

agentes profilácticos o terapéuticos) pueden administrarse de forma concomitante o secuencial a un sujeto. La terapia (ej., agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación también se puede administrar cíclicamente. La terapia cíclica incluye la administración de una primera terapia (ej., un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo, seguido por la administración de una segunda terapia (ej., un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo y repetir esta administración secuencial, es decir, el ciclo, con el fin de reducir el desarrollo de resistencia a una de las terapias (por ejemplo, agentes) para evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias (por ejemplo, agentes), y/o para mejorar, la eficacia de las terapias.

[00326] Las terapias (ej., agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación de la divulgación se pueden administrar a un sujeto simultáneamente.

[00327] El término "concurrentemente" no está limitado a la administración de terapias (ej., agentes profilácticos o terapéuticos) a exactamente el mismo tiempo, sino que más bien se entiende que una composición farmacéutica que comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos se administran a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tal que los inmunoconjugados pueden actuar junto con las otras terapías para proporcionar un beneficio aumentado que si se administra de otro modo. Por ejemplo, cada terapia se puede administrar a un sujeto al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos en el tiempo, sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben ser administrados suficientemente próximos en el tiempo a fin de proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada terapia se puede administrar a un sujeto por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada. En diversas aspectos, las terapias (por ejemplo, profiláctica o agentes terapéuticos) se administran a un sujeto en menos de 15 minutos, menos de 30 minutos, menos de 1 hora de diferencia, 1 hora de diferencia aproximadamente, entre 1 y 2 horas de diferencia aproximadamente , entre 2 y 3 horas de diferencia aproximadamente, entre 3 y 4 horas de diferencia aproximadamente, entre 4 y 5 horas de diferencia

aproximadamente, entre 5 y 6 horas de diferencia aproximadamente, entre 6 y 7 horas de diferencia aproximadamente , entre 7 y 8 horas de diferencia aproximadamente, entre 8 y 9 horas de diferencia aproximadamente, entre 9 y 10 horas de diferencia aproximadamente, entre 10 y 11 horas de diferencia aproximadamente, entra 11 y 12 horas de diferencia aproximadamente, 24 horas de diferencia, 48 horas de diferencia, 72 horas de diferencia, o 1 semana de diferencia. En otros aspectos, dos o más terapias (ej., agentes profilácticos o terapéuticos) se administran a un paciente en la misma visita.

[00328] Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación se pueden administrar a un sujeto en la misma composición farmacéutica. Alternativamente, los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación se pueden administrar concurrentemente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar a un sujeto por las mismas o diferentes vías de administración.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Identificación de anticuerpos CDH6 por la tecnología de presentación de fagos

Paneos HuCAL PLATINUM®

[00329] Los anticuerpos fueron identificados por la selección de los clones que se unían a CDH6-ECD. Como fuente de variantes de anticuerpo de una biblioteca de presentación de fagos comercialmente disponible, la biblioteca Morphosys HuCAL PLATINUM®, se utilizó. La biblioteca de fagémido se basa en el concepto de HuCAL ® (Knappik et al., . J Mol Biol. 2000: 296(1):57-86; Prassler et al., J Mol Biol. 2011: 413(1):261-78 2011) y emplea la tecnología CysDisplayTM para la visualización de los Fab en la superficie del fago (Rothe et al, J Mol Biol. 2008: 376(4):1182-200). Para el aislamiento de los anticuerpos anti-CDH6, se realizaron las estrategias de inmunoplaqueo estándar utilizando todos los enfoques de inmunoplaqueo en fase sólida y solución.

Vista general del antígeno (proteína recombinante y líneas celulares) y reactivos de anticuerpos utilizados para los paneos y cribados

[00330] Los inmunoplaqueos se realizaron en diversas formas de antígenos CDH6. Una visión general de proteínas CDH6 recombinantes y líneas celulares que expresan CDH6 utilizadas como antígenos para paneo y posterior cribado y caracterización se proporciona en la Tabla 1.

[00331] Los dominios extracelulares de CDH6 de humano, ratón y rata fueron genes sintetizados a partir de las secuencias de aminoácidos de las bases de datos de GenBank o Uniprot (véase la Tabla 1). La plantilla de ADNc CDH6 Cynomolgus fue sintetizada genéticamente con base en secuencias de aminoácidos e información de homología usando ARNm de varios tejidos de cyno (por ejemplo Laboratorios Zyagen; San Diego, CA). Todos los fragmentos de ADN sintetizados fueron clonados dentro de vectores de expresión apropiados con etiquetas de afinidad enumeradas para permitir la purificación o vectores de expresión de Zyagen Laboratories para expresión en la superficie celular de mamíferos.

[00332] Para la generación de una línea celular de CHO estable que expresa exógenamente CDH6 humana, el sistema de expresión TREX (Invitrogen, Carlsbad, CA) se utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células CHO-TREX (Invitrogen, R718-07, Carlsbad, CA) se cultivaron en medio DMEM (Invitrogen 11995-085) con 10% de FBS (Invitrogen, 10082-147, Carlsbad, CA), y Blasticidina 10 µg/ml (Invitrogen A11139-02, Carlsbad, CA). La transfección se realizó en placas de 6 pozos cuando las células alcanzan 90% de confluencia. 4 µg de ADN de plásmido CDH6 linealizado se mezcló con 100 µl de medio de DMEM (sin FBS) en un tubo Eppendorf estéril, 12 µl de Lipofectamine® 2000 (Invitrogen 11668-019, Carlsbad, CA) se mezclaron con 100 µl de medio de DMEM en otro tubo Eppendorf estéril. ADN y Lipofectamine® se mezclaron juntos, y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Los medios de cultivo de células CHO-TREX se cambió a 1 ml de medio DMEM sin FBS para cada pozo; se agregó mezcla por encima de la media de ADN/Lipofectamine® en cada pozo, se incubaron durante 2 horas. A continuación, 2 ml de medio de crecimiento (con FBS) se añadieron en cada pozo, y las células se incubaron durante la noche. Las células transfectadas se separaron de la placa de 6 pozos a un matraz T175 el día siguiente y se cultivaron en medio DMEM de selección con FBS al 10%, 10 µg/ml Blasticidina, 800-1000 µg/ml de Geneticina (Invitrogen 10131-027). La expresión de CDH6 se indujo con Tetraciclina 1 µg/ml final en medio de selección durante 20-24 horas. Las células positivas

se marcaron con 5 µg/ml de anticuerpo monoclonal primario final anti-CDH6 (MAB2715 de R&D Systems, Minneapolis, MN), y luego se marcaron con anticuerpo secundario de anti-ratón conjugado con PE (cat # 12-4010-87, eBioscience, San Diego, CA) y se ordenaron mediante FACS.

[00333] Las líneas celulares CHO estables que ofrecen expresión exógena de CDH6 de origen de ratón, rata y cynomolgus se generaron mediante transfección de células CHO-K1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con los respectivos ADNc clonados en un vector de expresión mamífera (ADNpc 6.1, Invitrogen, Carlsbad, CA). La transfección se realizó en placas de 6 pozos cuando las células alcanzaron confluencia del 90%. 4 µg de ADN plásmido CDH6 linealizado se mezcló con 100 µl de medio DMEM sin FBS en un tubo Eppendorf estéril, 12 µl de Lipofectamine® 2000 (Invitrogen 11668-019, Carlsbad, CA) se mezclaron con 100 µl de medio DMEM en otro tubo Eppendorf estéril. El ADN y la solución de Lipofectamine® se mezclaron juntos, y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. El medio de cultivo de células CHO se cambió a 1 ml de medio DMEM sin FBS para cada pozo; Se adicionó la mezcla DNA/Lipofectamine® a la parte superior de cada pozo, incubado por 2 horas. A continuación, 2 ml de medio de crecimiento (con FBS) se añadieron en cada pozo, y las células se incubaron durante la noche. Las células transfectadas se separaron de la placa de 6 pozos a un matraz T175 el día siguiente y crecio en los medios de DMEM de selección con FBS 10%, 10 µg/ml Blasticidina, 800-1000 µg/ml de Geneticina (Invitrogen 10131-027 Carlsbad, CA). La expresión de CDH6 se indujo con Tetraciclina 1 µg/ml final en medio de selección durante 20-24 horas. Las células positivas se marcaron con 5 µg/ml de anticuerpo monoclonal primario final anti-CDH6 (MAB2715 de R&D Systems, Minneapolis, MN), y luego se marcaron con anticuerpo secundario de anti-ratón conjugado con PE (cat # 12-4010-87, eBioscience, San Diego, CA) y se ordenaron mediante FACS. Un anticuerpo anti-CDH6 comercialmente disponible alternativo es el anticuerpo 2B6 (#GWB-E8FDF3 - Genway, San Diego, CA). Este anticuerpo también se utilizó para confirmar la expresión de CDH6 en las células.

Tabla 1

Información general de los reactivos del antígeno, anticuerpo y línea celular para los paneos y las selecciones

Antígeno/Anticuerpo	Acceso/Fuente	Descripción	Secuencia madura
His6-SUMO-CDH6 aa54-260-APP-Avi	NM_004932.3	Dominio variante EC ½ humano (SEC ID NO:3)	SWMWNQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATKRLDREEKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTKEVYTATVPEMSDVGTFVVQVTATDADDPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIIKTALLNMDRENREQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTVNITLTDGGGGSEFRHDSGLNDIFEAQKIEWHE
hCDH6aa54-615 APPavi	NM_004932.3	ECD humano de longitud completa (SEC ID NO:4)	SWMWNQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATKRLDREEKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTKEVYTATVPEMSDVGTFVVQVTATDADDPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIIKTALLNMDRENREQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPESSPPGTPIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVITDQETQEGIITVKKLLDFEKKKVYTLKVEASNPYVEPRFLYLGPFKDSATVRIVVEDVDEPPVFSKLAYILQIREDAQINTTIGSVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLLWHNITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQTLHAVDKDDPYSGHQFSFSLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVISDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGA
hCDH6aa54-615 APPavi-biotin	NM_004932.3	ECD humano de longitud completa biotinizado (SEC ID NO:5)	SWMWNQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATKRLDREEKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTKEVYTATVPEMSDVGTFVVQVTATDADDPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIIKTALLNMDRENREQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPESSPPGTPIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVITDQETQEGIITVKKLLDFEKKKVYTLKVEASNPYVEPRFLYLGPFKDSATVRIVVEDVDEPPVFSKLAYILQIREDAQINTTIGSVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLLWHNITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQT

			LHAVDKDDPYSGHQFSFSLAPEAASGS NFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMST YLLPVVISDNDYPVQSSTGTVTVRVCAC DHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGAGSE FRHDSGLNDIFEAQK(BIOTIN)IEWHE
hCDH6aa54-615 Fc	NM_004932.3	ECD humano de longitud completa dimerizado (SEC ID NO:6)	SWMWNQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHS DQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENT GDIQATKRLDREEKPVYILRAQAINRRTG RPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTKEVYTAT VPEMSDVGTFVVQVTATDADDPTYGNS AKVVYSILQGQPYFSVESETGIIKTALLN MDRENREQYQVVIQAKDMGGQMGGLS GTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKT PESSPPGTPIGRIKASDADVGENAEIEYS ITDGEGLDMFDVITDQETQEGIITVKKLLD FEKKKVYTLKVEASNPYVEPRFLYLGPF KDSATVRIVVEDVDEPPVFSKLAYILQIR EDAQINTTIGSVTAQDPDAARNPVKYSV DRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRET LLWHNITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLD VNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQT LHAVDKDDPYSGHQFSFSLAPEAASGS NFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMST YLLPVVISDNDYPVQSSTGTVTVRVCAC DHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGAGSD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
cynoCDH6 FL	Ver la anterior descripción sobre derivación de secuencias de cinomolgus	CDH6 Cynomolgus *(Macaca fascicularis)* de longitud completa (SEC ID NO:7)	SWMWNQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHS DQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENT GDIQATKRLDREEKPVYILRAQAINRRTG RPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTKEVYTAT VPEMSDVGTFVVQVTATDADDPTYGNS AKVVYSILQGQPYFSVESETGIIKTALLN MDRENREQYQVVIQAKDMGGQMGGLS GTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKT PESSPPGTPIGRIKASDADVGENAEIEYS ITDGEGLDMFDVITDQETQEGIITVKKLLD FEKKKVYTLKVEASNPHVEPRFLYLGPF KDSATVRIVVEDVDEPPVFSKLAYILQIR EDAQINTTIGSVTAQDPDAARNPVKYSV DRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRET

			LLWHNITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLD VNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQT LRAVDKDDPYSGHQFSFSLAPEAASGS NFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMST YLLPVVISDNDYPVQSSTGTVTVRVCAC DHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGAGSE FRHDSGLNDIFEAQKIEWHE
moCDH6 FL	NM_007666. 3	CDH6 de ratón *(Mus musculus)* de longitud completa (SEC ID NO:8)	SWMWNQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHS DQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENT GDIQATKRLDREEKPVYILRAQAVNRRT GRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTKDVYT ATVPEMADVGTFVVQVTATDADDPTYG NSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIIKTALL NMDRENREQYQVVIQAKDMGGQMGGL SGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFK TPESSPPGTPIGRIKASDADVGENAEIEY SITDGEGHEMFDVITDQETQEGIITVKKL LDFEKKKVYTLKVEASNPHVEPRFLYLG PFKDSATVRIVVDDVDEPPVFSKLAYILQI REDARINTTIGSVAAQDPDAARNPVKYS VDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRE TLLWHNITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVL DVNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQ TLRAVDKDDPYSGHQFSFSLAPEAASSS NFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMST YLLPVVISDNDYPVQSSTGTVTVRVCAC DHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGAGSE FRHDSGLNDIFEAQKIEWHE
ratCDH6 FL	NM_012927. 1	CDH6 de rata de longitud completa (*Rattus norvegicus*) (SEC ID NO:9)	SWMWNQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHS DQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENT GDIQATKRLDREEKPVYILRAQAINRRTG RPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTKDVYTAT VPEMADVGTFVVQVTATDADDPTYGNS AKVVYSILQGQPYFSVESETGIIKTALLN MDRENREQYQVVIQAKDMGGQMGGLS GTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKT PESSPPGTPIGRIKASDADVGENAEIEYS ITDGEGHDMFDVITDQETQEGIITVKKLL DFEKKRVYTLKVEASNPHIEPRFLYLGPF KDSATVRIVVDDVDEPPVFSKLAYILQIR EDAQINTTIGSVAAQDPDAARNPVKYSV DRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRET LLWHNITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLD VNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQT LHAVDKDDPYSGHQFSFSLAPEAASGS NFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMST YLLPVVISDNDYPVQSSTGTVTVRVCAC DHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGAGSE

			FRHDSGLNDIFEAQKIEWHE

Expresión y purificación de la proteína recombinante:

His6-SUMO-CDH6 aa54-260-APP-Avi

[00334] La proteína se expresó en células Rosetta® 2 De3 pLysS (Millipore, Billerica, MA) en vector pET usando 2xYT + 50 µg/ml de kanamicina y 30 µg/ml de cloranfenicol. Las células se indujeron con IPTG 0.1 mM a 30ºC. El pellet resuspendido en 400 ml de Tris-Cl 20mM, pH 8.0, NaCl 150mM, CaCl2 3mM, imidazol 20mM + tabs PI (1 por 50 ml) + 1mg/ml de lisozima fresca añadida, homogenizada para romper los grumos y se pasó a través del microfluidizador 3 veces. Después de la centrifugación a 20K x g durante 30 min se utilizó la fracción soluble del sobrenadante para la purificación a través de 2 ml de Ni-NTA (resina Qiagen SuperFlow, Qiagen, Venlo, Países Bajos). El lisado se hizo pasar sobre la columna a 2.0 ml/min, se lavó con 10 CV (volumen de columna) Tris-Cl 20 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM, CaCl2 3 mM, imidazol 20 mM y la proteína se eluyó con 4 x 3.0 ml fracciones de elución usando Tris-Cl 20 mM, pH 8.0, NaCl 500 mM, CaCl2 3 mM, imidazol 250 mM. Las fracciones se agruparon. Se añadieron 200 unidades de proteasa SUMO (Invitrogen) con ~15 ml de proteína (~20 mg) y se dializaron en 5L de Tris-Cl 20 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM, CaCl2 3 mM durante la noche a 4ºC usando Snakeskin® plisado tubo con 10K de corte (Thermo Scientific, Rockford, IL). El material dializado se recogió y se re-purificó sobre 2.0 ml de resina Ni-NTA para eliminar la proteína no escindida y la Proteasa SUMO. La proteína escindida se recogió del flujo continuo y las fracciones lavadas. Flujo concentrado y lavado a de la Ni-NTA inversa a 5 ml de volumen, adicionada a NaCl hasta una concentración final de 500 mM y se inyectó en la columna S200, buffer = Tris-Cl 20 mM , pH 8.0, NaCl 150 mM, CaCl2 3 mM.

hCDH6aa54-615 APPavi, hCDH6aa54-615 Fc, cynoCDH6 FL, moCDH6 FL, ratCDH6 FL

[00335] La proteína se expresó en líneas celulares derivadas de HEK293 HER293 (ATCC CRL-1573) previamente adaptadas al cultivo en suspensión y se cultivaron en un medio libre de suero de propiedad de Novartis. La verificación de expresión a escala pequeña se llevó a cabo en ensayos de transfección de placas de 6 pozos temporales sobre la base de lipofección. Producción de proteínas a gran escala mediante transfección transitoria se realizó a escala 10-20 L en el sistema de biorreactor Wave™

(GE Healthcare, Pittsburgh, PA). Polietilenimina ADN (Polysciences, Warrington, PA) se utilizó como un plásmido portador en una proporción de 1:3 (w:w). Los sobrenadantes de los cultivos celulares se recogieron 7-10 días después de la transfección y se concentraron por filtración de flujo cruzado y diafiltración antes de la purificación.

[00336] Para la purificación, se clarifica y se filtra el sobrenadante acondicionado desde que se aprobó la transfección transitoria sobre una columna de afinidad de 20 ml a 5 ml/min. Lavar 20 CV PBS, 1% TX100, 0.3% de buffer de tn-butilfosfato, 20CV PBS. Eluir usando citrato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM pH 3.0, la proteína recogiendo fracciones de 2 ml. Las fracciones reunidas se neutralizaron y luego se dializaron durante la noche a 4ºC con 5 L de Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4, CaCl2 3 mM. A continuación, la muestra se sometió a cromatografía de exclusión por tamaños en una columna Superdex® S200 16/60 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) equilibrada con buffer de diálisis.

[00337] Vision general de varias estrategias de paneo se indica en la Tabla 2

Tabla 2

Visión general de las estrategias de paneo

Código Pan	Subgrupo de Fagos	Blanco y condiciones
	VH1A/B/5	
1038.1	□□□	
1038.2	VH3 □□□	SP en hCDH6aa54-615 APPavi, sin CaCl2
1038.3	VH2/6 □□□	
1038.4	VH6, □	
	VH1A/B/5	SP en hCDH6aa54-615 APPavi, sin CaCl2
1038.5	□□□	
1038.6	VH3 □□□	
1038.7	VH2/6 □□□	
1038.8	VH6, □	
	VH1A/B/5	SP en His6-SUMO-CDH6 aa54-260-APP-Avi, con CaCl2 1mM
1038.9	□□□	
1038.10	VH3 □□□	

Código Pan	Subgrupo de Fagos	Blanco y condiciones
1038.11	VH2/6 □□□	
1038.12	VH6, □	
	VH1A/B/5	SP en His6-SUMO-CDH6 aa54-260-APP-Avi, sin 1mM CaCl2
1038.13	□□□	Competencia de unión usando el anticuerpo herramienta MAB2715
1038.14	VH3 □□□	
1038.15	VH2/6 □□□	
1038.16	VH6, □	
	VH1A/B/5	LP en hCDH6aa54-615 APPavi biotinilado
1038.17	□□□	
1038.18	VH3 □□□	
1038.19	VH2/6 □□□	
	VH1A/B/5	LP en hCDH6aa54-615 APPavi
1038.20	□□□	Paneo desplegado usando el anticuerpo herramienta 2B6 biotinilado
1038.21	VH3 □□□	
1038.22	VH2/6 □□□	
	VH1A/B/5	LP en hCDH6aa54-615-Fc biotinilado
1038.23	□□□	
1038.24	VH3 □□□	
1038.25	VH2/6 □□□	
	VH1A/B/5	SP en hCDH6aa54-615-Fc
1038.26	□□□	
1038.27	VH3 □□□	
1038.28	VH2/6 □□□	

Biotinilación de proteínas

[00338] Proteínas etiquetadas con Avi se biotinilaron utilizando la enzima BirA después de la fabricación (Avidity, Aurora, CO) protocolo estándar para la biotinilación de proteínas en una proteína etiquetada con Avi. Después de la biotinilación la proteína se sometió a cromatografía de exclusión por tamaños en una columna Superdex® S200 16/60 en Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4, CaCl2 3 mM.

[00339] Las proteínas no etiquetadas con Avi fueron dializadas usando EZ-enlace Sulfo-NHS-LC-biotina, 10.000 MWCO (# 69576 Thermo Scientific, Rockford, IL) dos veces durante 2 horas contra 5L de 1x PBS bajo agitación a temperatura ambiente antes de la biotinilación. EZ-enlace Sulfo-NHS-LC-biotina (# 21327 Thermo Scientific, Rockford, IL) se reconstruyó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las proteínas se incubaron con un exceso molar de 20 veces de reactivo de biotina durante 30 min a temperatura ambiente. Para eliminar el reactivo de biotina sin reaccionar, la muestra se dializó de nuevo dos veces durante 2 horas contra 5L de 1x PBS bajo agitación a temperatura ambiente. Las concentraciones de proteína se determinaron por medio del dispositivo Nanodrop® (Thermo Scientific, Rockford, IL). Las muestras se almacenaron a 4° C hasta su uso.

Paneo en fase sólida

[00340] En paneos en fase sólida los fagos que expresan el fragmento Fab se incuban con antígeno que se ha unido a un soporte de superficie mediante inmovilización directa.

[00341] Antes del proceso de selección de antígenos se llevo a cabo un ELISA para comprobar el recubrimiento para determinar la concentración óptima de recubrimiento de antígeno. Para este fin se generaron una serie de diluciones 2 veces de hCDH6aa54-615 APPavi (ver Tabla 1) que cubre desde 24 hasta 0.19 µg/ml. Las diluciones individuales se utilizaron para cubrir los pozos en una placa Maxisorp™ de 96 pozos (# 442404 Nunc, Rochester, NY) a través de inmovilización directa. Después de recubrir la placa se lavó tres veces con 300 µl de PBS y posteriormente se bloqueó con buffer de bloqueo 1x (2.5% leche, 2.5% BSA, 0.05% Tween 20) durante 2 h a temperatura ambiente.

[00342] Para detectar el antígeno fijado, se añadió un anticuerpo anti-APP (generado en-casa) a 1 µ;M, 0.18 µM o 0.04 µM. La detección secundaria se realizó utilizando anticuerpo específico IgG F(ab)2 de anti-ratón marcado con AP en una dilución de 1:5000 Ref. 115-056-006 Jackson-Immunoresearch, West Grove, PA). La concentración de antígeno a la que se observó saturación de la señal fue elegida como concentraciones de recubrimiento par paneos SP.

Códigos Pan 1038.1-8

[00343] Para paneos SP 1038.1-8 (ver Tabla 2) hCDH6aa54-615 APPavi (ver Tabla 1, SEC ID NO: 4) se recubrió sobre una placa de 96 pozos Maxisorp™ (Nunc) a través de la inmovilización directa. Dos pozos se recubrieron con 300 µl de solución de antígeno (10 µg/ml en PBS) por combinación de subgrupo de fagos. El recubrimiento se realizó a 4 °C durante la noche con (inmunoplaqueos 1038.1-4) o sin (inmunoplaqueos 1038.4-8) la presencia de CaCl2 1 mM. Los pozos se lavaron posteriormente dos veces con 400 µl de PBS y se bloquearon con 400 µl de buffer de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente a 400 rpm. Después de bloquear las células se lavaron dos veces con 400 µl de PBS.

[00344] Antes de la unión los subgrupos de fagos fueron bloqueados y agotados con 10 µg/mL de FLT2-APPavi no asociado durante 1 h a temperatura ambiente para eliminar los agentes de unión a etiqueta y no específicos 300 µl de grupos de fagos bloqueados y agotados fueron transferidos por pozo recubierto y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y 400 rpm. Los fagos fijados no específicos fueron retirados por los pasos de lavado listados abajo en la Tabla 3.

Tabla 3

Primera Ronda	Segunda Ronda	Tercera ronda (sólo códigos Pan 1038,9-16)
PBST 3x (rápida)	PBST 1x(rápida)	PBST 10x (rápida)
PBST 2x/5min	PBST 4x/5min	PBST 5x/5min
PBST 3x (rápida)	PBS 1x (rápida)	PBS 10x (rápida)
PBS 2x/5min	PBS 4x/5min	PBS 5x/5min

[00345] Los fagos fijados específicamente se eluyeron con 300 µl de buffer de elución durante 10 min a temperatura ambiente. Los fagos eluidos se utilizaron para reinfectar 14 ml de E. coli TG1F + (Stratagene/Agilent, Santa Clara, CA), a una densidad óptica de OD600 = 0.6-0.8. La mezcla de E. coli TG1+ y eluido de fago se incubó durante 45 min en un baño de agua a 37 °C durante la infección por fagos. Las bacterias infectadas se resuspendieron en medio de 2xYT, se sembraron en placas de agar LB suplementadas con 34 µg/mL cloramfenicol y se incubaron y se incubaron durante la noche a 37 °C. Las colonias se rasparon de las placas y se utilizaron para la amplificación de los fagos de los clones seleccionados, y la producción de fagos. Con fago purificado se

inició la siguiente ronda de inmunoplaqueo. La segunda ronda de paneos se realizó de acuerdo al protocolo de la primera ronda excepto para una condición de lavado más rigurosa. Se omitió un tercer paneo debido a los bajos títulos obtenidos del segundo paneo que fueron de ~104 cfu/mL.

Códigos Pan 1038.9-16

[00346] Para paneos SP 1038.9-16 (Tabla 2) His6-SUMO-CDH6 aa54-260-APP-Avi (ver Tabla 1) se revestió sobre una placa de 96 pozos de Maxisorp™ (Nunc) a través de la inmovilización directa como se describe para códigos Pan 1.038.1-8. Para paneos 1038.13-16 se añadió 300 µL de una solución 100 nM de anticuerpo herramienta MAB2715 por pozo y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente para evitar la selección de aglutinantes que reconocen el mismo epítopo que MAB2715. Además del antígeno recubierto y una tercera ronda de paneos, los paneos se realizaron como se describe para códigos Pan 1038.1-8.

Códigos Pan 1038.26-28

[00347] Para inmunoplaqueos de SP 1038.26-28 (ver Tabla 2) hCDH6aa54-615-Fc (ver Tabla 1, SEC ID NO:6) se aplicó sobre una placa de 96 pozos de Maxisorp™ (Nunc) a través de la inmovilización directa como se describe para códigos Pan 1.038, 1-8. Además del antígeno recubierto y las estringencias de lavado el inmunoplaqueo se realizó como se describe para códigos Pan 1038.1-8.

Paneo de fase líquida

[00348] Durante solución del paneo, el fago de exhibición del fragmento Fab y antigenos biotinilados se incubaron en una solución que se espera aumente la accesibilidad del antígeno mediada por el fago. La biotinilación de antígeno se realizó como se ha descrito anteriormente.

Códigos Pan 1038.17-22

[00349] Cada subgrupo de la biblioteca de fagos con un volume igual de Chemiblocker por 2h a temperatura ambiente en una rueda giratoria. Para evitar la selección de los anticuerpos contra APPavi y la etiqueta de biotina no asociada FLT3-APPavi y la msIgG anti-ciclosporina biotinilada fueron añadidas en 7.5 and 18 µg/ml el paso de bloqueo, respectivamente. Para la eliminación de partículas de fago de unión a

esferas de estreptavidina, se llevó a cabo pre-adsorción de partículas de fagos bloqueados usando esferas de estreptavidina bloqueados (# 112.06D Invitrogen, Carlsbad, CA). Fagos bloqueado y pre-adsorbidos se incubaron con hCDH6aa54-615 APPavi biotinilado (véase Tabla 1, SEC ID NO: 4) durante 1 hora a temperatura ambiente en una rueda giratoria. Los complejos fagos-antígenos se capturaron ya sea con esferas lavadas (Códigos Pan 1038,17-19) o con esferas recubiertas previamente con anticuerpo anti-CDH6 biotinilado 2B6 (Genway, San Diego, CA) para enriquecer aglutinantes para epítopos no 2B6 (Códigos Pan 1038,20-22). Las partículas de fago no específicos se eliminaron mediante varias etapas de lavado (véase más adelante). La elución de las partículas de fagos específicamente fijadas, infección y amplificación se realizaron como se describe para códigos Pan 1038.1-8.

Tabla 4

Condiciones de Lavado de Códigos Pan 1038.17-25

Primera Ronda	Segunda Ronda	Tercera ronda (sólo códigos Pan 1038,9-16)
PBST 5x (rápida)	PBST 10x (rápida)	PBST 10x (rápida)
PBST 2x/5min	3x PBST/5min	PBST 5x/5min
PBST 3x (rápida)	PBST 5x (rápida)	PBST 5x (rápida)

Códigos Pan 1038.23-25

[00350] Los inmunoplaqueos se realizaron como se describe para pancodes 1.038.1-8 pero utilizando hCDH6aa54-615-Fc biotinilado (véase Tabla 1, SEC ID NO: 6) como antígeno.

Subclonación

Conversión para la expresión FAB-FH

[00351] Para facilitar la expresión rápida de fragmentos Fab solubles, los insertos que codifican Fab de las partículas de fago HuCAL® PLATINUM seleccionadas se subclonaron a partir del vector de exposición pMORPH®30 en el vector de expresión pMORPH®11_FH. Las soluciones Stocks de glicerol que contienen E. coli que fueron infectadas con los fagos de salida de ronda de inmunoplaqueo finales se utilizaron para

inocular cultivos para la purificación de ADN pMORPH®30 usando el kit de NucleoBond® Xtra Midi Plus de acuerdo con los fabricantes manuales (# 740.412.50 Machery Nagel, Bethlehem, PA). 5 g de cada grupo de salida de ADN pMORPH®30 fueron digeridos tres veces mediante EcoRI/XbaI/BMTI (todas las enzimas de restricción se adquirieron de New England Biolabs, Ipswich, MA). El fragmento bp 1485 que codifica EcoRI/XbaI Fab resultante se purificó en gel utilizando el kit de limpieza Wizard SV Gel/PCR de acuerdo con el manual de los fabricantes (A9282, Promega, Madison, WI) y se ligó en el corte EcoRI/XbaI de la estructura del vector pMORPH®11_FH

Conversión para la expresión de IgG

[00352] Con el fin de expresar IgG de longitud completa, los fragmentos de dominio variable de VH y VL se subclonaron a partir de vectores de expresión de Fab en vectores de pMORPH®4_hIgG1f siguiendo el protocolo RapCLONE® (Morphosys, Martinsried/Planegg, Alemania). RapCLONE® es un método de clonación de dos etapas para la conversión por lotes de una gran cantidad de vectores de expresión de Fab en vectores de expresión de IgG. En una primera etapa de clonación, un casete de expresión eucariota se introdujo en los vectores de expresión pMORPH®11 a través de digestión de BsiWI/MfeI (para grupos κ) o HpaI/MfeI (para grupos λ) y ligación posterior. Esto fue seguido por una segunda etapa de clonación, en el que se digirieron las piscinas Fab que contienen el casete de expresión utilizando EcoRV/BlpI (ambos grupos κ y λ) y posteriormente se clonaron en el vector aceptor pMORPH®4_IgG1f para la expresión en células de mamífero.

Expresión y purificación de Fragmentos Fab

Transformación de E. coli TG1F

Las alicuotas de 50 µL de E. coli TG1F competentes para electroporación se descongelaron en hielo, mezclado con ADN plasmido de 50 pg/µl pMORPH®11_FH y se transfirieron a cubetas de electroporación pre-enfriadas. Las células se sometieron a electroporación (Bio-Rad Gene Pulser; ajustes: 1.75 kV, 200 Ω, y 25 µF (Bio-Rad, Hercules, CA), se transfirió a 950 µl de medio SOB pre-calentado y encubado durante 1 h a 37 ºC con agitación a 220 rpm. Un volumen apropiado de las muestras de transformación se sembraron en placas de agar LB suplementados con 34 µg/ml de cloranfenicol y se incubó durante la noche a 37 ºC para obtener colonias individuales.

Generación de placas Maestras

[00353] Clones individuales resistentes de cloranfenicol se recogieron en los pozos de una placa de microtitulación de 384 pozos estéril (Nunc) precargada con 60 µl de medio 2xYT suplementado con 34 µg/ml de cloranfenicol y 1% de glucosa y se crecieron durante la noche a 37 ºC. A la mañana siguiente, se añadieron 20 µl de medios 2xYT estéril que contienen glicerol 60% y glucosa 1% en cada pozo de las placas maestras. Las placas se sellaron con papel de aluminio y se almacenaron a -8 °C.

Generación de Lisados Bacterianos que Contienen Fab para Selección por ELISA

[00354] 5 µl de cada pozo de una placa maestra se transfirieron a una placa de microtitulación de 384 pozos estéril precargada con 40 µl de medio 2xYT por pozo suplementado con 34 µg/ml de cloranfenicol y glucosa al 0.1%. Las placas se incubaron a 37 °C a 480 rpm y 80% de humedad hasta que los cultivos fueron ligeramente turbios. Se añadieron 10 µl de medio 2xYT suplementados con 34 µg/ml de cloranfenicol y 5 mM de IPTG por pozo para la inducción de la expresión de fragmento Fab. Las placas se sellaron con una cinta permeable a los gases y se incubaron durante la noche a 22 °C a 500 rpm y 80% de humedad. El día siguiente, se añadieron 15 µl de buffer de lisis BEL (2.5 mg/ml lisozima (# 10837059001, Roche, Nutley, NJ), EDTA 4 mM, 10 U/µl Benzonasa (Merck # 1.01654.0001, White House Station, NJ) a cada pozo y las placas se incubaron durante 1h a 500 rpm y 80% de humedad. Los lisados Fab resultantes fueron bloqueados por la adición de 15 µl de Quimiobloqueador 2x por pozo seguido de incubación durante 30 min a 22° C, 500 rpm y 80% de humedad.

Generación de Lisados Bacterianos que Contienen Fab para FACS de Selección

[00355] 5 µl de cada pozo de una placa de compresión se transfirieron a una placa de microtitulación de fondo redondo de 96 pozos estéril precargada con 100 µl de medio 2xYT por pozo suplementado con 34 µg/ml de cloranfenicol. Las placas se incubaron a 37° C a 500 rpm y 80% de humedad hasta que los cultivos fueron ligeramente turbios. Se añadieron 10 µl de medio 2xYT suplementados con 34 µg/ml de cloranfenicol y 5 mM de IPTG por pozo para la inducción de la expresión de fragmento Fab. Las placas se sellaron con una cinta permeable a los gases y se incubaron durante la noche a 22 °C a 500 rpm y 80% de humedad. Al día siguiente, la placa se centrifugó durante 10 min a 1200rpm y el sobrenadante se descartó. Los sedimentos bacterianos se congelaron durante la noche a

-20 °C para facilitar la etapa de lisis. Los pellets descongeladas se resuspendieron en 200 µl de buffer de lisis BEL (véase más arriba) y se incubaron durante 1 h a 22 °C y 250 rpm. Los lisados de Fab resultantes fueron centrifugados para eliminar los restos celulares durante 10 min a 1200 g. El Fab que contiene los sobrenadantes se utilizó para fines de selección.

Expresión y Purificación de Fragmentos etiquetados con His6 en E. coli

[00356] E. coli Transformantes de TG1F que contienen ADN pMORPH®11 Fab FH fueron aislados en 2xYT suplementado con 34 µg/ml de cloranfenicol y glucosa 1%. Los clones individuales se recogieron y se transfirieron a 3 ml de cultivos sembrados en 2xYT suplementado con 34 µg/ml de cloranfenicol y glucosa 1% y se incubaron a 37 °C, 220 rpm durante 4 h. El cultivo de siembra se usó para inocular 50 ml de cultivos principales con 2xYT suplementado con 34 µg/ml de cloranfenicol y glucosa al 1% y se incubó en matraces de agitación de 250 ml a 30° C hasta que el OD600 alcanzó un valor de 0.6. La expresión de Fab fue inducida por la adición de IPTG a una concentración final de 0.75 mM y los cultivos se incubaron adicionalmente durante la noche a 25 °C y 220 rpm. El día siguiente las células se recogieron y los pellets celulares se congelaron durante la noche a -20° C. Los pellets celulares fueron alterados mediante re-suspensión e incubación en buffer de lisis ((Tris 25 mM/pH = 8, NaCl 500 mM, $MgCl_2$ 2 mM, Benzonasa 10 U/µl (# 1.01654.0001 Merck), lisozima 0.1% (# 10837059001, Roche), el inhibidor de la proteasa compite con una tableta de EDTA w/o 50 mL de buffer (#11873580001 Roche)) durante una hora a temperatura ambiente sobre un agitador de placas. Los lisados se clarificaron por centrifugación durante 30 min a 15000 rpm y filtración del sobrenadante a través de un filtro de 200 nm de tamaño del poro. Los fragmentos Fab etiquetados con His6 se aislaron por cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (esferas Ni-NTA Superflow®, #30430 Qiagen, Venlo, Países Bajos) y se eluyeron utilizando imidazol. El intercambio de buffer a PBS 1x se realizó con columnas PD-10 (# 17-0851-01 GE Healthcare, Pittsburgh, PA). Las muestras fueron esterilizadas por filtración y las concentraciones de proteína se determinaron por espectrofotometría UV. La pureza de las muestras se analizó en SDS-PAGE al 15% desnaturalizante y reductor. La identidad de las muestras se confirmó por MS.

Expresión y purificación de IgGs

La expresión de IgGs en escala de cribado

[00357] Las células HEK293c18 eucariotas (ATCC CRL-10852) fueron utilizadas en un sistema de expresión de 96 pozos para la generación de sobrenadantes de cultivo celular condicionados que contienen IgG de longitud completa para el uso posterior en los ensayos de especificidad y/o funcionales. Células HEK293 c18 eucariotas se resuspendieron en medio de transfección (D-MEM suplementado con L-glutamina al 2% (# 25030-024 Gibco, Grand Island, NY) FCS al 10% (# 3302 PAN Biotech, Aidenbach, Alemania) y penicilina/estreptomicina al 1% (#15140-122 Gibco, Grand Island, NY)) y se sembraron en placas de fondo plano de 96 pozos a una densidad de aproximadamente $4x10^4$ células en 50 µl por pozo el día anterior. Una mezcla maestra de transfección se preparó mezclando 0.6 µl de Lipofectamine® 2000 (#11668 Invitrogen, Carlsbad, CA) por pozo con 25 µl de medio Opti-MEM® I. (#31985-047 Invitrogen, Carlsbad, CA). La mezcla maestra se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. En una placa nueva, 20 µl de medio Opti MEM® I se agregó a pozos que contienen 300 ng de ADN y se mezcló suavemente. Después de eso, el ADN se combinó con Lipofectamine® 2000 pre-incubada, se mezcló suavemente y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. 100 µl de los complejos de Lipofectamine® 2000 pre-incubada/ADN se transfirieron entonces a cada pozo de las placas con las células y se mezcló suavemente. Las placas se incubaron durante 40 horas a 37 °C y 6% de CO2 para expresión transitoria. Los sobrenadantes de los cultivos fueron transferidos a placas de 96 pozos de fondo en V y depurados para su centrifugación. Los sobrenadantes resultantes que contienen IgG resultantes se ensayaron por un ELISA de captura anti-Fd para la evaluación de la concentración de proteína IgG en referencia a un estándar conocido y se almacenaron a -80° C para su uso posterior.

Chequeo de Expresión de IgG por ELISA anti-Fd

[00358] Para medir los niveles de IgG en la escala de selección derivada de los sobrenadantes, las placas Maxisorp® de 96 pozos (Nunc # 437111) se recubrieron con 50 µ/pozo de IgG de oveja anti-humano específico a fragmento Fd (# PC075 The Binding Site, San Diego, CA) diluido 1:1000 en PBS. Después del recubrimiento, las placas se lavaron dos veces con TBST y se bloquearon durante 1h con polvo de leche desnatada a 5% en TBST. Mientras tanto los sobrenadantes que contienen IgG se diluyeron 1:50 en

leche desnatada en polvo 2.5% en TBST. Después de lavar las placas de ELISA tres veces con TBST, 100 µl de los sobrenadantes diluidos fueron transferidos por pozo y las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se lavaron cinco veces con TBST y las IgG capturadas se detectaron por incubación con 50 µl de IgG de cabra anti-humano específico a F(ab')2 (#109-055-097 Dianova, Hamburgo, Alemania) (diluido 1:5000) en leche descremada en polvo 0.5% en TBST durante 1 h. Después de lavar las placas cinco veces con TBST el sustrato de fluorescencia AttoPhos (# 1484281 Roche, Nutley, NJ) se añadió de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la emisión de fluorescencia a 535 nm se registró con excitación a 430 nm con un lector de ELISA.

Expresión y purificación de IgGs en Microescala

[00359] Las células CAP-T® (CEVEC Pharmaceuticals, Cologne, Alemania) fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido de expresión de pMORPH®4-IgG en un medio de expresión FreeStyle293® (#12338 Invitrogen, Carlsbad, CA) usando 40 kDa PEI lineal ((PEI Max (#24765- 2 Polysciences Warrington, PA)) como vehículo de suministro de genes.

[00360] Un día antes de la transfección las células se diluyeron a ~0.8E+06 células/ml para asegurar el crecimiento exponencial. En el día de la transfección las células se diluyeron en 9 ml de medio Freestyle® pre-calentado (Invitrogen, Carlsbad, CA) a ~ 0.5x107 células/ml y se transfirió a un matraz de agitación de 125ml. 30 µg de ADN se diluyeron en 500 µl de OptiMEM. 1200 µg de PEI Max (# 24765-2 Polysciences Warrington, PA) se diluyeron en 8.80 ml de medio OptiMEM. La solución de ADN se añadió por goteo a las células y se mezcló suavemente. Después de eso, se añadieron 500 µl de solución PEI Max a las células y se mezcló suavemente.

[00361] Las células se incubaron a 37 °C, CO^2 6%, 85% de humedad con agitación a 100 rpm. Después de 4 h se agregó 10 ml de PEM pre-calentado suplementado con L-glutamina 4 mM y blasticidina 5µg/ml (# R21001 Invitrogen, Carlsbad, CA). Simultáneamente, se añadieron 400 µl de ácido valproico (#P4543-25G Sigma Aldrich, St. Louis, MO) a una concentración final de 4 mM. Las células se incubaron durante 6 días a 37 °C, CO^2 6%, 85% de humedad con agitación a 100 rpm.

[00362] Después de la centrifugación durante 5 min a 1.200 g a 4 ° C, el sobrenadante se esterilizó por filtración (poros de 0.2 µm de tamaño) y se sometió a una cromatografía de afinidad de Proteína A (MabSelect® SURE, GE Healthcare, Pittsburgh, PA) usando una estación de tratamiento de líquidos. Se realizó el intercambio de buffer a PBS 1X y las muestras fueron filtradas (0.2 µm de tamaño de poro) de manera estéril. Las concentraciones de proteína se determinaron mediante espectrofotometría UV y la pureza de la IgG se analizó bajo condiciones reductoras desnaturalizantes en SDS-PAGE.

Clasificación de los Lisados bacterianos crudos que contienen Fab

Clasificación por ELISA

[00363] Usando la clasificación por ELISA, se identificaron los clones Fab individuales a partir de los resultados del inmunoplaqueo para la unión a los antígenos diana. Los Fabs se probaron usando los lisados de E. coli crudos que contienen Fab.

Clasificación de ELISA en antígenos directamente recubiertos

[00364] Las placas de 384 pozos Maxisorp® (#442404 Nunc, Rochester, NY) se revistieron durante la noche a 4 °C con proteínas huCDH6 a una concentración de 3 µg/ml en PBS. Después de lavar las placas se bloquearon durante 2 h con leche desnatada 5% en 1xPBST. Fab que contiene lisados de E. coli se añadieron y la unión se dejo durante 1 h a temperatura ambiente.

[00365] Para detectar placas de fragmentos de Fab unidos se lavaron 5x con TBST y se agregó F(ab')2 de IgG anti-humana AP (#109-055-097 Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) en una dilución 1/2500. Después de 1 h a temperatura ambiente, las placas se lavaron 5x con TBST y se añadió sustrato AttoPhos de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las placas se leyeron en un lector de ELISA 5 minutos después de añadir el sustrato.

Clasificación de ELISA sobre Antígeno Biotinilado utilizando Placas NeutrAvidin®

[00366] Las placas de 384 pozos Maxisorp® (#442404 Nunc, Rochester, NY) se revistieron durante la noche a 4 °C con NeutrAvidin® (#31000 Thermo Scientific, Rockford, IL) a una concentración de 10 µg/ml en PBS. Después de lavar las placas se bloquearon durante 2 h con 1x Chemibloquer. Lisado de E. coli que que contienen Fab se dispensaron en una placa de microtitulación de 384 pozos fresca y se agregaron

antígenos CDH6 biotinilados a una concentración de 2.5 µg/ml. Los complejos Fab-antígeno se transfirieron entonces a las placas recubiertas con NeutrAvidin® y su captura se permitió durante 1 hora a temperatura ambiente y se detectó como se describió anteriormente.

Clasificación por FACS

[00367] En la clasificación por FACS, se identificaron los fragmentos de Fab que se unen a los antígenos expresados en la superficie celular a partir de los resultados del imunoplaqueo. $1x10^5$ células/pozo se transfirieron a placas de 96 pozos de fondo en U y se mezclaron con 40 µl/pozo de los lisados bacterianos que contienen Fab. Las placas se incubaron con agitación a 4 ºC durante 1 h. Después de la incubación, se añadió 100 µl/pozo de buffer de FACS enfriado con hielo (3% FCS, 0.02% NaN3, EDTA 2 mM en PBS), las células se centrifugaron a 4 °C durante 5 min a 250 g y se lavaron dos veces con 180 µl/pozo de buffer de FACS enfriado con hielo. Después de cada etapa de lavado, las células se centrifugaron y se resuspendieron cuidadosamente. Después de la ultima etapa de lavado, las células se resuspendieron en 50 µl de anticuerpo de detección secundario diluido 1/200 (IgG de cabra anti humano conjugado con PE (#109-116-088, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). Después de la incubación de 1 hora a 4 °C, las células se lavaron de nuevo dos veces en buffer de FACS 180 µl/pozo enfriado con hielo. Finalmente, los pellets celulares se resuspendieron en 120 µl/pozo de buffer FACS con paraformaldehído 0.4% y se analizaron en un FACSCalibur® (BD Biosciences, San Jose, CA) equipado con un lector de placas HTS.

Secuenciación de Clones

Secuenciación de clones Fab

[00368] Los Fab cuya unión a la célula fue confirmada fueron sometidos a secuenciamiento de sus VL y VH 1.2 ml de 2xYT suplementado con 34 µg/ml de cloranfenicol y glucosa 1% se inocularon con 5 µl de una solución Stock de glicerol bacteriano derivada de las placas de compresión y se cultivaron en placas de microtitulación de pozo profundo de 96 pozos durante la noche a 37 °C y 500 rpm. Al día siguiente, las bacterias fueron cosechadas y los plásmidos pMORPH®11 FH se purificaron usando un kit de purificación de ADN de 96 pozos (Kit de Purificación de Plásmido Nucleospin® 96 #740.625,24, Machery Nagel, Bethlehem, PA) según el

protocolo de los fabricantes. Para secuenciar los cebadores VL y VH M13rev (5 'CAGGAAACAGCTATGAC 3' (SEC ID NO: 10) y HuCAL_VH_for ((5 'GATAAGCATGCGTAGGAGAAA 3 (SEC ID NO: 11)) se utilizaron, respectivamente.

Secuenciación de clones IgG

[00369] Los clones Fab de unión celular única fueron convertidos en el formato de IgG1 de una manera policlonal y después se recuperó por secuenciación de VL y VH. 1.5 ml de medio 2xYT suplementado con Amp 100 µg/ml y glucosa 1% se inocularon con clones individuales y se cultivaron en placas de microtitulación de pozo profundo 96 pozos durante la noche a 37 °C, 450 rpm y 80% de humedad. Al día siguiente, las bacterias fueron cosechadas y los plásmidos pMORPH®4 que codifican IgG se purificaron usando un kit de purificación de ADN de 96 pozos según el protocolo del fabricante (Kit de Purificación de Plásmido Nucleospin® 96 #740.625.24, Machery Nagel, Bethlehem, PA). Para secuenciar los cebadores VL y VH ((T7 5’ TAATACGACTCACTATAGGG 3’ (SEC ID NO:12) and CMV HC for (5’ CTCTAGCGCCACCATGAAACA 3’ (SEC ID NO:13)) se utilizaron, respectivamente.

[00370] **Ensayos *In vitro***

Evaluación de afinidad utilizando Octet® QK

[00371] Evaluaciones de afinidad por determinar los parámetros cinéticos se realizaron a través de la tecnología de Interferometría Bio-Layer. Todas las muestras de Fab se midieron usando inmersión en Estreptadivina y biosensores de lectura (#18-0009 ForteBio, Menlo Park, CA). La placa se colocó en un instrumento Octet® QK (ForteBio, Menlo Park, CA) y se dejó equilibrar a 27 °C en la cámara. La ejecución se inició mediante la colocación de los sensores en los pozos que contienen 150 nM de proteína CDH6 biotinilada durante 300s. Después de eso, los sensores se colocaron en los pozos que contienen muestra de Fab 250 nM. La asociación y disociación de Fab se registró cada una durante 600s midiendo el cambio en el espesor de capa (en nanómetros, nm) con el tiempo, todo bajo control por computador. Los datos se procesan automáticamente utilizando la versión 3.0 del programa Octet®.

Evaluación de propensidad de internalización celular de anticuerpo

[00372] La internalización celular de IgG por endocitosis mediada por diana fue evaluada por microscopía usando un lector de VTI ArrayScan® HC (ThermoFischer, Waltham, MA) como se describe a continuación. El protocolo de análisis subyacente era el algoritmo Spot Detector V4 (ThermoScientific Cellomics®, Thermo Scientific, Rockford, IL). En pocas palabras, este protocolo de análisis proporciona un análisis rápido y genérico del punto que identifica los objetos puntuados, tales como IgG que contienen vesículas lisosomales después de la tinción de inmunofluorescencia. La intensidad total fluorescente puntuada puede entonces ser promediada sobre el número de células analizadas.

[00373] Las células OVCAR3 (ATCC HTB-161) se cultivaron en matraces de cultivo de tejidos T150 a aproximadamente 90% de confluencia. El medio se desechó y las células se lavaron con 10 ml de PBS. Las células se separaron por incubación con 4 ml de buffer de disociación celular durante 5 min a 37 °C. Las células separadas se resuspendieron cuidadosamente en medio de crecimiento y se transfirieron a un tubo de 50 mL. Después de contar las células en un analizador de Vi-Cell® (Beckman Coulter, Brea, CA) la suspensión se ajustó a 105 células/ml en medio de crecimiento. 100 µl de suspensión de células se sembraron por pozo de una placa de microtitulación de 96 pozos con fondo transparente. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C en CO2 5% para permitir que las células se adhieran y se expandan.

[00374] Los sobrenadantes de cultivo celular que contiene IgG se generaron como se describe y se diluyeron en PBS en una serie de dilución de cuatro veces cubriendo diluciones que van entree 1:4 y 1:128. 100 µl de cada dilución de la muestra se dispensaron por pozo de la placa de microtitulación que contiene células y se incubaron durante 2 horas a 37 °C para permitir la internalización de IgG. Posteriormente, las células se fijaron mediante la adición de 100 µl de reactivo 1x CellFix® (#340181 BD Biosciences, San Jose, CA) por pozo. Después de 10 minutos las placas se lavaron dos veces con PBS y las células se permeabilizaron luego mediante la adición de 100 µl Triton X-100 0.1% por pozo. Después de 10 min las placas se lavaron de nuevo dos veces con PBS y se bloquearon con 100 µl de buffer de bloqueo Odyssey 1x (#927-40000 LiCor, Lincoln, NE) durante 2 horas a temperatura ambiente. Para detectar IgGs interiorizadas 100 µl de una dilución 1:000 de anticuerpo secundario de IgG de cabra anti-humano Alexa Fluor® 488(#11001 Molecular Probes, Grand Island, NY) suplementado con una dilución 1:10000

de reactivo de tinción de núcleo Hoechst (# B2261 Sigma, St. Louis, Mo) se añadieron por pozo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células fueron lavadas dos veces con PBS sin aspiración final. Luego las placas se cargaron en el lector Cellomics® VTI ArrayScan HC (ThermoFischer, Waltham, MA) y se analizaron. El grado de internalización de IgG se evaluó por la media del promedio de la intensidad puntual (MSAI) por célula.

Ensayo de ADC Sustituto utilizando conjugado FAB-DM1 anti-humano

[00375] Para probar la capacidad de los anticuerpos CDH6 para internalizar después de la unión al receptor y entregar la carga útil citotóxica, se realizó un ensayo de ADC sustituto al mezclar reactivo Fab-DM1 anti-humano (Fragmento Fab IgG H+L de cabra anti-humana AffiniPure® conjugado con SMCC-DM1) con IgG purificada a una proporción fija de 1:2. El potencial citotóxico se ensayó en la línea celular de cáncer OVCAR3 (carcinoma de suero ovárico, cultivado en McCoys + FCS 20%), ya que estas células muestran una alta expresión de CDH6.

[00376] Las células en cultivo se contaron y se diluyeron en medio hasta una concentración de 1x105 células/ml. 1000 células/pozo se transfirieron a placas de 384 pozos (Corning Costar #3707, Corning, Tewksbury, MA). La solución de anticuerpo/Fab-DM1 primaria se preparó en tubos Matrix de 1.4 ml (Thermo, # 3790, Rockford, IL) mediante la combinación de 666nM Fab-DM1 con IgG humano primario 333nM diluido en medios de cultivo celular y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Una dilución en serie 1:3 de 10 puntos se preparó en una placa de pozo profundo de 384 pozos (Brandtech Scientific Inc # 701355, Essex, CT) y se transfirieron 25 µl por placa de ensayo (por triplicado) para obtener una concentración de partida más alta de FAB -DM1/ IgG humana de 66nM y 33nM, respectivamente. Para los controles, los pozos sólo con células (= 100% de control de la viabilidad) y se prepararon los pozos incubados con Fab-DM1 (para verificar si hay muerte inespecífica del reactivo secundario). Las placas se incubaron durante 120 horas a 37 °C y CO2 5%. La actividad celular de los complejos de anticuerpo/Fab-DM1 primario se determinó usando reactivo CellTiter-Glo® (#G7571 Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. La viabilidad fue normalizada únicamente a las células de control.

Resumen de clasificación de anticuerpos

[00377] La biblioteca de fagémido HuCAL® PLATINUM se utilizó para seleccionar fragmentos Fab específicos contra antígenos CDH6-ECD humanos. APPAvi humana recombinante y fusión Fc, así como proteínas de fusión APPAvi de dominio truncado fueron utilizados para los inmunoplaqueos. Las partículas de fagos-anticuerpos HuCAL® PLATINUM fueron sometidas en diferentes combinaciones de subgrupo a un total de 8 diferentes estrategias de paneo que resultaron en 28 subgrupos de paneo de salida. En resumen, seis de las ocho estrategias han sido productivas y dieron lugar a 771 pruebas ELISA positivas.

[00378] Clasificación FACS en células CHO que expresan CDH6 humano, así como células OVCAR3 resultó en 271 pruebas de unión celular confirmadas. Para consolidar estas pruebas de unión celular la secuenciación de VL y VH se realizó dando lugar a la identificación de 53 clones de anticuerpos Fab únicas.

[00379] Para permitir la caracterización funcional, los clones de anticuerpos Fab fueron convertidos en el formato IgG, produciendo 47 clones IgG únicos de los cuales 44 se expresaron con éxito a escala de clasificación. Los IgGs únicos purificadas se sometieron a una serie de ensayos de caracterización incluyendo reactividad cruzada humana/cyno/rata/ratón por FACS, clasificación de afinidad por Octet, ensayos de internalización celular, así como ensayos de ADC sustituto usando un reactivo secundario Fab-SMCC-DM1 de IgG anti-humano . Basado en estos ensayos, se seleccionaron las IgG humanos para la producción a escala, la conjugación directa posterior a enlazador de ADC/cargas útiles y pruebas como ADCs en experimentos *in vitro* e *in vivo.*

[00380] La información de la secuencia de las IgGs anti-CDH6 seleccionadas para su posterior caracterización en profundidad se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Información de secuencia de las IgG seleccionadas para la caracterización en profundidad.

NOV ID	Categoría	Valor
NOV0670	LCDR1	SGSSSNIGSQYVY

	(Kabat) (SEC ID NO:14)	
	LCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:15)	YNSERPS
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:16)	QTWDASSQSFV
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:17)	SYAIS
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:18)	GIIPIFGTANYAQKFQG
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:19)	KFPGRGPFAY
	secuencia total vH (SEC ID NO:20)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAP GQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARKFPGRGPFAYWGQGTLVTVSS
	secuencia total vL (SEC ID NO:21)	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSQYVYWYQQLPG TAPKLLIYYNSERPSGMPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEA DYYCQTWDASSQSFVFGGGTKLTVL
	secuencia de ADN vH (SEC ID NO:22)	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAAGTGAAAAAAC CGGGCAGCAGCGTGAAAGTTAGCTGCAAAGCATCCGGAG GGACGTTTTCTTCTTACGCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCC CCGGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCGGTATCATCCCG ATCTTCGGCACTGCGAACTACGCCCAGAAATTTCAGGGCC GGGTGACCATTACCGCCGATGAAAGCACCAGCACCGCCTA TATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACGGCCGTG TATTATTGCGCGCGTAAATTCCCGGGTCGTGGTCCGTTCG CTTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:23)	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGTGCA CCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGTAGCGGCAGCAGC AGCAACATTGGTTCTCAGTACGTGTACTGGTACCAGCAGCT GCCGGGCACGGCGCCGAAACTGCTGATCTACTACAACTCT GAACGCCCGAGCGGCATGCCGGATCGCTTTAGCGGATCC AAAAGCGGCACCAGCGCCAGCCTGGCGATTACCGGCCTG CAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGACTTGGG

		ACGCTTCTTCTCAGTCTTTCGTGTTTGGCGGCGGCACGAA GTTAACCGTCCTA
	secuencia completa de HC (SEC ID NO:24)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAP GQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARKFPGRGPFAYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:25)	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSQYVYWYQQLPG TAPKLLIYYNSERPSGMPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEA DYYCQTWDASSQSFVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:26)	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAAGTGAAAAAAC CGGGCAGCAGCGTGAAAGTTAGCTGCAAAGCATCCGGAG GGACGTTTTCTTCTTACGCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCC CCGGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCGGTATCATCCCG ATCTTCGGCACTGCGAACTACGCCCAGAAATTTCAGGGCC GGGTGACCATTACCGCCGATGAAAGCACCAGCACCGCCTA TATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACGGCCGTG TATTATTGCGCGCGTAAATTCCCGGGTCGTGGTCCGTTCG CTTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCAGC CTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCC TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGT GGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG

		CAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGC TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:27)	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGTGCA CCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGTAGCGGCAGCAGC AGCAACATTGGTTCTCAGTACGTGTACTGGTACCAGCAGCT GCCGGGCACGGCGCCGAAACTGCTGATCTACTACAACTCT GAACGCCCGAGCGGCATGCCGGATCGCTTTAGCGGATCC AAAAGCGGCACCAGCGCCAGCCTGGCGATTACCGGCCTG CAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGACTTGGG ACGCTTCTTCTCAGTCTTTCGTGTTTGGCGGCGGCACGAA GTTAACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTC ACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACA AGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGG AGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGT CAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGC AACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGC CTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGT CACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCC TACAGAATGTTCA
NOV0672	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:28)	TGTSSDVGAYNYVS
	LCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:29)	GVSKRPS
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:30)	QSYDHLLHVV
	HCDR1 (SEC ID NO:31)	TYGIH
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:32)	YIHYSGSSTYYADSVKG
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:33)	HAYGYMDF
	secuencia total vH (SEC ID	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYGIHWVRQAP GKGLEWVSYIHYSGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARHAYGYMDFWGQGTLVTVSS

	NO:34)	
	secuencia total vL (SEC ID NO:35)	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGAYNYVSWYQQHP GKAPKLMIYGVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCQSYDHLLHVVFGGGTKLTVL
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:36)	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAG CCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGA TTCACCTTTAACACTTACGGTATCCATTGGGTGCGCCAGGC CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCTACATCCATTAC TCTGGTTCTTCTACCTACTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCG CTTTACCATCAGCCGCGATAATTCGAAAAACACCCTGTATC TGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTA TTATTGCGCGCGTCATGCTTACGGTTACATGGATTTCTGGG GCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:37)	GATATCGCGCTGACCCAGCCGGCGAGCGTGAGCGGTAGC CCGGGCCAGAGCATTACCATTAGCTGCACCGGCACCAGCA GCGATGTGGGCGCTTACAACTACGTGTCTTGGTACCAGCA GCATCCGGGCAAGGCGCCGAAACTGATGATCTACGGTGTT TCTAAACGTCCGAGCGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGAT CCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACCATTAGCGGCCT GCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGTCTTAC GACCATCTGCTGCATGTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGT TAACCGTCCTA
	secuencia completa de HC (SEC ID NO:38)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYGIHWVRQAP GKGLEWVSYIHYSGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARHAYGYMDFWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:39)	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGAYNYVSWYQQHP GKAPKLMIYGVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCQSYDHLLHVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:40)	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAG CCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGA TTCACCTTTAACACTTACGGTATCCATTGGGTGCGCCAGGC CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCTACATCCATTAC TCTGGTTCTTCTACCTACTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCG CTTTACCATCAGCCGCGATAATTCGAAAAACACCCTGTATC

		TGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTA TTATTGCGCGCGTCATGCTTACGGTTACATGGATTTCTGGG GCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCAGCCTCCACCAA GGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAG GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCC TACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA GAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:41)	GATATCGCGCTGACCCAGCCGGCGAGCGTGAGCGGTAGC CCGGGCCAGAGCATTACCATTAGCTGCACCGGCACCAGCA GCGATGTGGGCGCTTACAACTACGTGTCTTGGTACCAGCA GCATCCGGGCAAGGCGCCGAAACTGATGATCTACGGTGTT TCTAAACGTCCGAGCGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGAT CCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACCATTAGCGGCCT GCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGTCTTAC GACCATCTGCTGCATGTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGT TAACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCAC TCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAG GCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAG CCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCA AGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAA CAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCT GAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCA CGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTA CAGAATGTTCA
NOV0674	LCDR1 (Kabat) (SEC ID	SGSSSNIGYNYVS

	NO:42)	
	LCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:43)	RDNQRPS
	LCDR3 (SEC ID NO:44)	AAWTSGSIGWV
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:45)	SYAMT
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:46)	GISGGGSNTYYADSVKG
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:47)	GGGQYFDY
	secuencia total vH (SEC ID NO:48)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAP GKGLEWVSGISGGGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGGGQYFDYWGQGTLVTVSS
	secuencia total vL (SEC ID NO:49)	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGYNYVSWYQQLPG TAPKLLIYRDNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEA DYYCAAWTSGSIGWVFGGGTKLTVL
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:50)	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAG CCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGA TTCACCTTTTCTTCTTACGCTATGACTTGGGTGCGCCAGGC CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCGGTATCTCTGGT GGTGGTTCTAACACCTACTATGCGGATAGCGTGAAAGGCC GCTTTACCATCAGCCGCGATAATTCGAAAAACACCCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGT ATTATTGCGCGCGTGGTGGTGGTCAGTACTTCGATTACTG GGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:51)	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGTGCA CCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGTAGCGGCAGCAGC AGCAACATTGGTTACAACTACGTGTCTTGGTACCAGCAGCT GCCGGGCACGGCGCCGAAACTGCTGATCTACCGTGACAA CCAGCGCCCGAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGATC CAAAAGCGGCACCAGCGCCAGCCTGGCGATTACCGGCCT GCAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCGCTGCTTGG ACTTCTGGTTCTATCGGTTGGGTGTTTGGCGGCGGCACGA AGTTAACCGTCCTA

	secuencia completa de HC (SEC ID NO:52)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAP GKGLEWVSGISGGGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGGGQYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:53)	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGYNYVSWYQQLPG TAPKLLIYRDNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEA DYYCAAWTSGSIGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSE ELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVA PTECS
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:54)	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAG CCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGA TTCACCTTTTCTTCTTACGCTATGACTTGGGTGCGCCAGGC CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCGGTATCTCTGGT GGTGGTTCTAACACCTACTATGCGGATAGCGTGAAAGGCC GCTTTACCATCAGCCGCGATAATTCGAAAAACACCCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGT ATTATTGCGCGCGTGGTGGTGGTCAGTACTTCGATTACTG GGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCAGCCTCCACC AAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGA GCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTC AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGT CCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCC CACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAG TCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCT CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTG

		GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:55)	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGTGCA CCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGTAGCGGCAGCAGC AGCAACATTGGTTACAACTACGTGTCTTGGTACCAGCAGCT GCCGGGCACGGCGCCGAAACTGCTGATCTACCGTGACAA CCAGCGCCCGAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGATC CAAAAGCGGCACCAGCGCCAGCCTGGCGATTACCGGCCT GCAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCGCTGCTTGG ACTTCTGGTTCTATCGGTTGGGTGTTTGGCGGCGGCACGA AGTTAACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGT CACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAAC AAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGG GAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCG TCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAG CAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACG CCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGG TCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCC CTACAGAATGTTCA
NOV0682	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:56)	RASQTINSYLN
	LCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:57)	RASNLQS
	LCDR3 (SEC ID NO:58)	QQGDSSWT
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:59)	SYAIS
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:60)	FIKSNADGYTTNYAAPVKG
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:61)	IRYFRNWDY
	secuencia total vH (SEC ID NO:62)	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAISWVRQAP GKGLEWVGFIKSNADGYTTNYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVYYCARIRYFRNWDYWGQGTLVTVSS
	secuencia	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTINSYLNWYQQKPGK

	total vL (SEC ID NO:63)	APKLLIYRASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQGDSSWTFGQGTKVEIK
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:64)	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGAAA CCAGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCCTCCGGA TTCACCTTTTCTTCTTACGCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGC CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTGGGCTTCATCAAATCT AACGCTGACGGTTACACTACTAACTATGCCGCCCCAGTGA AAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATGATTCGAAAAACACC CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAAGATACGG CCGTGTATTATTGCGCGCGTATCCGTTACTTCCGTAACTGG GATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:65)	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCA GCGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGCCAGCC AGACTATTAACTCTTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCG GGCAAAGCGCCGAAACTATTAATCTACCGTGCTTCTAACCT GCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGATC CGGCACCGATTTCACCCTGACCATTAGCTCTCTGCAACCG GAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGGGTGACTCTTC TTGGACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAAA
	secuencia completa de HC (SEC ID NO:66)	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAISWVRQAP GKGLEWVGFIKSNADGYTTNYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVYYCARIRYFRNWDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:67)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTINSYLNWYQQKPGK APKLLIYRASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQGDSSWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:68)	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGAAA CCAGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCCTCCGGA TTCACCTTTTCTTCTTACGCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGC CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTGGGCTTCATCAAATCT AACGCTGACGGTTACACTACTAACTATGCCGCCCCAGTGA AAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATGATTCGAAAAACACC CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAAGATACGG CCGTGTATTATTGCGCGCGTATCCGTTACTTCCGTAACTGG GATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCAG

		CCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTC CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCG TGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGC TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:69)	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCA GCGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGCCAGCC AGACTATTAACTCTTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCG GGCAAAGCGCCGAAACTATTAATCTACCGTGCTTCTAACCT GCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGATC CGGCACCGATTTCACCCTGACCATTAGCTCTCTGCAACCG GAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGGGTGACTCTTC TTGGACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAAACGTA CGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGA CGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCT GCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGG AAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAA AGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCC TGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAA GCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCT GTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTG T
NOV0685	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:70)	SGSSSNIGSYYVS
	LCDR2 (Kabat)	YNTKRPS

	(SEC ID NO:71)	
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:72)	QSWDKLGKGYV
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:73)	GNSAAWN
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:74)	IIYYRSKWYNDYAVSVKS
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:75)	SSYSGGFDY
	secuencia total vH (SEC ID NO:76)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSGNSAAWNWIRQ SPSRGLEWLGIIYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL QLNSVTPEDTAVYYCARSSYSGGFDYWGQGTLVTVSS
	secuencia total vL (SEC ID NO:77)	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSYYVSWYQQLPG TAPKLLIYYNTKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEA DYYCQSWDKLGKGYVFGGGTKLTVL
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:78)	CAGGTGCAATTGCAGCAGAGCGGTCCGGGCCTGGTGAAA CCGAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCGATTTCCGGA GATAGCGTGAGCGGTAACTCTGCTGCTTGGAACTGGATTC GTCAGAGCCCGAGCCGTGGCCTCGAGTGGCTGGGCATCA TCTACTACCGTAGCAAATGGTACAACGACTATGCCGTGAGC GTGAAAAGCCGCATTACCATTAACCCGGATACTTCGAAAAA CCAGTTTAGCCTGCAACTGAACAGCGTGACCCCGGAAGAT ACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTTCTTCTTACTCTGGTGG TTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGC TCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:79)	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGTGCA CCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGTAGCGGCAGCAGC AGCAACATTGGTTCTTACTACGTGTCTTGGTACCAGCAGCT GCCGGGCACGGCGCCGAAACTGCTGATCTACTACAACACT AAACGCCCGAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGATCC AAAAGCGGCACCAGCGCCAGCCTGGCGATTACCGGCCTG CAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGTCTTGGG ACAAACTGGGTAAAGGTTACGTGTTTGGCGGCGGCACGAA GTTAACCGTCCTA
	secuencia	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSGNSAAWNWIRQ

	completa de HC (SEC ID NO:80)	SPSRGLEWLGIIYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL QLNSVTPEDTAVYYCARSSYSGGFDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:81)	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSYYVSWYQQLPG TAPKLLIYYNTKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEA DYYCQSWDKLGKGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:82)	CAGGTGCAATTGCAGCAGAGCGGTCCGGGCCTGGTGAAA CCGAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCGATTTCCGGA GATAGCGTGAGCGGTAACTCTGCTGCTTGGAACTGGATTC GTCAGAGCCCGAGCCGTGGCCTCGAGTGGCTGGGCATCA TCTACTACCGTAGCAAATGGTACAACGACTATGCCGTGAGC GTGAAAAGCCGCATTACCATTAACCCGGATACTTCGAAAAA CCAGTTTAGCCTGCAACTGAACAGCGTGACCCCGGAAGAT ACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTTCTTCTTACTCTGGTGG TTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGC TCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC CTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGG GGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG GGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTG GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC

		GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:83)	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGTGCA CCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGTAGCGGCAGCAGC AGCAACATTGGTTCTTACTACGTGTCTTGGTACCAGCAGCT GCCGGGCACGGCGCCGAAACTGCTGATCTACTACAACACT AAACGCCCGAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGATCC AAAAGCGGCACCAGCGCCAGCCTGGCGATTACCGGCCTG CAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGTCTTGGG ACAAACTGGGTAAAGGTTACGTGTTTGGCGGCGGCACGAA GTTAACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTC ACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACA AGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGG AGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGT CAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGC AACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGC CTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGT CACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCC TACAGAATGTTCA
NOV0689	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:84)	SGSSSNIGSNFVS
	LCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:85)	DNSNRPS
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:86)	SSYDSFDHSWV
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:87)	SFAMN
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:88)	VISSSGSNTNYADSVKG
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:89)	PSYFQAMDY
	secuencia total vH (SEC ID NO:90)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMNWVRQAP GKGLEWVSVISSSGSNTNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARPSYFQAMDYWGQGTLVTVSS
	secuencia	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNFVSWYQQLPG

	total vL (SEC ID NO:91)	TAPKLLIYDNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEA DYYCSSYDSFDHSWVFGGGTKLTVL
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:92)	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAG CCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGA TTCACCTTTTCTTCTTTCGCTATGAACTGGGTGCGCCAGGC CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCGTTATCTCTTCTT CTGGTTCTAACACCAACTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCG CTTTACCATCAGCCGCGATAATTCGAAAAACACCCTGTATC TGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTA TTATTGCGCGCGTCCGTCTTACTTCCAGGCTATGGATTACT GGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:93)	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGTGCA CCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGTAGCGGCAGCAGC AGCAACATTGGTTCTAACTTCGTGTCTTGGTACCAGCAGCT GCCGGGCACGGCGCCGAAACTGCTGATCTACGACAACTCT AACCGCCCGAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGATCC AAAAGCGGCACCAGCGCCAGCCTGGCGATTACCGGCCTG CAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCTCTTCTTACGA CTCTTTCGACCATTCTTGGGTGTTTGGCGGCGGCACGAAG TTAACCGTCCTA
	secuencia completa de HC (SEC ID NO:94)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMNWVRQAP GKGLEWVSVISSSGSNTNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARPSYFQAMDYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:95)	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNFVSWYQQLPG TAPKLLIYDNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEA DYYCSSYDSFDHSWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSE ELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVA PTECS
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:96)	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAG CCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGA TTCACCTTTTCTTCTTTCGCTATGAACTGGGTGCGCCAGGC CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCGTTATCTCTTCTT CTGGTTCTAACACCAACTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCG CTTTACCATCAGCCGCGATAATTCGAAAAACACCCTGTATC TGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTA TTATTGCGCGCGTCCGTCTTACTTCCAGGCTATGGATTACT

		GGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCAGCCTCCAC CAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACT CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTG TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGC CCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:97)	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGTGCA CCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGTAGCGGCAGCAGC AGCAACATTGGTTCTAACTTCGTGTCTTGGTACCAGCAGCT GCCGGGCACGGCGCCGAAACTGCTGATCTACGACAACTCT AACCGCCCGAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGATCC AAAAGCGGCACCAGCGCCAGCCTGGCGATTACCGGCCTG CAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCTCTTCTTACGA CTCTTTCGACCATTCTTGGGTGTTTGGCGGCGGCACGAAG TTAACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCA CTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAA GGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGA GCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTC AAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCA ACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCC TGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTC ACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCT ACAGAATGTTCA
NOV0690	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:98)	SGDAIGTKFAH
	LCDR2	YDHERPS

	(Kabat) (SEC ID NO:99)	
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:100)	YSRASSNLV
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:101)	DHAID
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:102)	VIAGDGSITYYADSVKG
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:103)	DTGVYREYMDV
	secuencia total vH (SEC ID NO:104)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHAIDWVRQAP GKGLEWVSVIAGDGSITYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARDTGVYREYMDVWGQGTLVTVSS
	secuencia total vL (SEC ID NO:105)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDAIGTKFAHWYQQKPGQA PVLVIYYDHERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADY YCYSRASSNLVFGGGTKLTVL
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:106)	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAG CCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGA TTCACCTTTTCTGACCATGCTATCGACTGGGTGCGCCAGG CCCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCGTTATCGCTGG TGACGGTTCTATCACCTACTATGCGGATAGCGTGAAAGGC CGCTTTACCATCAGCCGCGATAATTCGAAAAACACCCTGTA TCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTG TATTATTGCGCGCGTGACACTGGTGTTTACCGTGAATACAT GGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:107)	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGTGAGC CCGGGCCAGACCGCGAGCATTACCTGTAGCGGCGATGCT ATCGGTACTAAATTCGCTCATTGGTACCAGCAGAAACCGG GCCAGGCGCCGGTGCTGGTGATCTACTACGACCATGAACG TCCGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCCAACAGC GGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACCCAGGCG GAAGACGAAGCGGATTATTACTGCTACTCTCGTGCTTCTTC TAACCTGGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA
	secuencia completa	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHAIDWVRQAP GKGLEWVSVIAGDGSITYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM

	de HC (SEC ID NO:108)	NSLRAEDTAVYYCARDTGVYREYMDVWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:109)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDAIGTKFAHWYQQKPGQA PVLVIYYDHERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADY YCYSRASSNLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC S
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:110)	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAG CCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGA TTCACCTTTTCTGACCATGCTATCGACTGGGTGCGCCAGG CCCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCGTTATCGCTGG TGACGGTTCTATCACCTACTATGCGGATAGCGTGAAAGGC CGCTTTACCATCAGCCGCGATAATTCGAAAAACACCCTGTA TCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTG TATTATTGCGCGCGTGACACTGGTGTTTACCGTGAATACAT GGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA GCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCT CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTC GTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACT CACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCC CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA

		CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:111)	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGTGAGC CCGGGCCAGACCGCGAGCATTACCTGTAGCGGCGATGCT ATCGGTACTAAATTCGCTCATTGGTACCAGCAGAAACCGG GCCAGGCGCCGGTGCTGGTGATCTACTACGACCATGAACG TCCGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCCAACAGC GGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACCCAGGCG GAAGACGAAGCGGATTATTACTGCTACTCTCGTGCTTCTTC TAACCTGGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGC CCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGT GTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTG GCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTG GAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACG CGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAA GTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGG AGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA
NOV0691	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:112)	TGTSSDVGRYNFVS
	LCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:113)	RVSNRPS
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO: 114)	QSWTTYSNVV
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:115)	SYALN
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:116)	RIKSKTYGGSTDYAAPVKG
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:117)	DRGGYVGFDS
	secuencia total vH (SEC ID NO:118)	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYALNWVRQAP GKGLEWVGRIKSKTYGGSTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVYYCARDRGGYVGFDSWGQGTLVTVSS
	secuencia total vL (SEC ID	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGRYNFVSWYQQHP GKAPKLMIYRVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCQSWTTYSNVVFGGGTKLTVL

	NO:119)	
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:120)	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGAAA CCAGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCCTCCGGA TTCACCTTTTCTTCTTACGCTCTGAACTGGGTGCGCCAGGC CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTGGGCCGTATCAAATCT AAAACTTACGGTGGTTCTACTGACTATGCCGCCCCAGTGAA AGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATGATTCGAAAAACACC CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAAGATACGG CCGTGTATTATTGCGCGCGTGACCGTGGTGGTTACGTTGG TTTCGATTCTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGC TCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:121)	GATATCGCGCTGACCCAGCCGGCGAGCGTGAGCGGTAGC CCGGGCCAGAGCATTACCATTAGCTGCACCGGCACCAGCA GCGATGTGGGCCGTTACAACTTCGTGTCTTGGTACCAGCA GCATCCGGGCAAGGCGCCGAAACTGATGATCTACCGTGTT TCTAACCGTCCGAGCGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGAT CCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACCATTAGCGGCCT GCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGTCTTGG ACTACTTACTCTAACGTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTT AACCGTCCTA
	secuencia completa de HC (SEC ID NO:122)	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYALNWVRQAP GKGLEWVGRIKSKTYGGSTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVYYCARDRGGYVGFDSWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:123)	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGRYNFVSWYQQHP GKAPKLMIYRVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCQSWTTYSNVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:124)	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGAAA CCAGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCCTCCGGA TTCACCTTTTCTTCTTACGCTCTGAACTGGGTGCGCCAGGC CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTGGGCCGTATCAAATCT AAAACTTACGGTGGTTCTACTGACTATGCCGCCCCAGTGAA AGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATGATTCGAAAAACACC CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAAGATACGG CCGTGTATTATTGCGCGCGTGACCGTGGTGGTTACGTTGG TTTCGATTCTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGC

		TCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC CTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGG GGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG GGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTG GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:125)	GATATCGCGCTGACCCAGCCGGCGAGCGTGAGCGGTAGC CCGGGCCAGAGCATTACCATTAGCTGCACCGGCACCAGCA GCGATGTGGGCCGTTACAACTTCGTGTCTTGGTACCAGCA GCATCCGGGCAAGGCGCCGAAACTGATGATCTACCGTGTT TCTAACCGTCCGAGCGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGAT CCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACCATTAGCGGCCT GCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGTCTTGG ACTACTTACTCTAACGTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTT AACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACT CTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGG CCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGC CGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAA GGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAAC AACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTG AGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCAC GCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTAC AGAATGTTCA
NOV0692	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:126)	SGDSIGSKYAQ
	LCDR2	YNSERPS

	(Kabat) (SEC ID NO:127)	
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:128)	QSWDGQSTIRV
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:129)	RYWMD
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:130)	RIKSKANGGITDYAAPVKG
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:131)	GMTFLGI
	secuencia total vH (SEC ID NO:132)	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMDWVRQA PGKGLEWVGRIKSKANGGITDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVYYCARGMTFLGIWGQGTLVTVSS
	secuencia total vL (SEC ID NO:133)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDSIGSKYAQWYQQKPGQA PVLVIYYNSERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADY YCQSWDGQSTIRVFGGGTKLTVL
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:134)	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGAAA CCAGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCCTCCGGA TTCACCTTTTCTCGTTACTGGATGGACTGGGTGCGCCAGG CCCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTGGGCCGTATCAAATC TAAAGCTAACGGTGGTATCACTGACTATGCCGCCCCAGTG AAAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATGATTCGAAAAACAC CCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAAGATACG GCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTATGACTTTCCTGGGTAT CTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:135)	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGTGAGC CCGGGCCAGACCGCGAGCATTACCTGTAGCGGCGATTCTA TCGGTTCTAAATACGCTCAGTGGTACCAGCAGAAACCGGG CCAGGCGCCGGTGCTGGTGATCTACTACAACTCTGAACGT CCGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCCAACAGCG GCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACCCAGGCGG AAGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGTCTTGGGACGGTCA GTCTACTATCCGTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACC GTCCTA
	secuencia	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMDWVRQA

	completa de HC (SEC ID NO:136)	PGKGLEWVGRIKSKANGGITDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVYYCARGMTFLGIWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:137)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDSIGSKYAQWYQQKPGQA PVLVIYYNSERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADY YCQSWDGQSTIRVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL QANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPT ECS
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:138)	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGAAA CCAGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCCTCCGGA TTCACCTTTTCTCGTTACTGGATGGACTGGGTGCGCCAGG CCCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTGGGCCGTATCAAATC TAAAGCTAACGGTGGTATCACTGACTATGCCGCCCCAGTG AAAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATGATTCGAAAAACAC CCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAAGATACG GCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTATGACTTTCCTGGGTAT CTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCAGCCTCC ACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCA AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAA CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGC TGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA TCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT CAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG

		CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:139)	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGTGAGC CCGGGCCAGACCGCGAGCATTACCTGTAGCGGCGATTCTA TCGGTTCTAAATACGCTCAGTGGTACCAGCAGAAACCGGG CCAGGCGCCGGTGCTGGTGATCTACTACAACTCTGAACGT CCGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCCAACAGCG GCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACCCAGGCGG AAGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGTCTTGGGACGGTCA GTCTACTATCCGTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACC GTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGT TCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCAC ACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTG ACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCG GGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACA AGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCA GTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCAT GAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAA TGTTCA
NOV0693	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:140)	RASQSISFYLA
	LCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:141)	GASTLQS
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:142)	HQYSYWLRT
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:143)	SYALH
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:144)	YIFYDSSSTYYADSVKG
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:145)	FLYSAYGVAN
	secuencia total vH (SEC ID NO:146)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYALHWVRQAP GKGLEWVSYIFYDSSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARFLYSAYGVANWGQGTLVTVSS
	secuencia	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISFYLAWYQQKPGK

	total vL (SEC ID NO:147)	APKLLIYGASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCHQYSYWLRTFGQGTKVEIK
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:148)	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAG CCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGA TTCACCTTTTCTTCTTACGCTCTGCATTGGGTGCGCCAGGC CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCTACATCTTCTAC GACTCTTCTTCTACCTACTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCG CTTTACCATCAGCCGCGATAATTCGAAAAACACCCTGTATC TGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTA TTATTGCGCGCGTTTCCTGTACTCTGCTTACGGTGTTGCTA ACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:149)	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCA GCGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGCCAGCC AGTCTATTTCTTTCTACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCG GGCAAAGCGCCGAAACTATTAATCTACGGTGCTTCTACTCT GCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGATC CGGCACCGATTTCACCCTGACCATTAGCTCTCTGCAACCG GAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCATCAGTACTCTTACTG GCTGCGTACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAAA
	secuencia completa de HC (SEC ID NO:150)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYALHWVRQAP GKGLEWVSYIFYDSSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARFLYSAYGVANWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:151)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISFYLAWYQQKPGK APKLLIYGASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCHQYSYWLRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:152)	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAG CCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGA TTCACCTTTTCTTCTTACGCTCTGCATTGGGTGCGCCAGGC CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCTACATCTTCTAC GACTCTTCTTCTACCTACTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCG CTTTACCATCAGCCGCGATAATTCGAAAAACACCCTGTATC TGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTA TTATTGCGCGCGTTTCCTGTACTCTGCTTACGGTGTTGCTA ACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCAGCCTC

		CACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCC AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACA TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG TCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCG TCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:153)	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCA GCGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGCCAGCC AGTCTATTTCTTTCTACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCG GGCAAAGCGCCGAAACTATTAATCTACGGTGCTTCTACTCT GCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGATC CGGCACCGATTTCACCCTGACCATTAGCTCTCTGCAACCG GAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCATCAGTACTCTTACTG GCTGCGTACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAAA CGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCA GCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGT GCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA GGAAAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTAC AGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTAC GAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGC GAGTGT
NOV0695	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:154)	RASQGIFTYLN
	LCDR2 (Kabat)	AASTLQS

	(SEC ID NO:155)	
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:156)	QQYYSTSLT
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:157)	SNSAAWN
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:158)	RIYYRSKWYNDYAVSVKS
	HCDR3(Kabat) (SEC ID NO:159)	ERSYRDYFDY
	secuencia total vH (SEC ID NO:160)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQ SPSRGLEWLGRIYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL QLNSVTPEDTAVYYCARERSYRDYFDYWGQGTLVTVSS
	secuencia total vL (SEC ID NO:161)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIFTYLNWYQQKPGK APKLLISAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYYSTSLTFGQGTKVEIK
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:162)	CAGGTGCAATTGCAGCAGAGCGGTCCGGGCCTGGTGAAA CCGAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCGATTTCCGGA GATAGCGTGAGCTCTAACTCTGCTGCTTGGAACTGGATTC GTCAGAGCCCGAGCCGTGGCCTCGAGTGGCTGGGCCGTA TCTACTACCGTAGCAAATGGTACAACGACTATGCCGTGAGC GTGAAAAGCCGCATTACCATTAACCCGGATACTTCGAAAAA CCAGTTTAGCCTGCAACTGAACAGCGTGACCCCGGAAGAT ACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGAACGTTCTTACCGTG ACTACTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGT TAGCTCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:163)	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCA GCGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGCCAGCC AGGGTATTTTCACTTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCG GGCAAAGCGCCGAAACTATTAATCTCTGCTGCTTCTACTCT GCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGATC CGGCACCGATTTCACCCTGACCATTAGCTCTCTGCAACCG GAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGTACTACTCTAC TTCTCTGACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAAA
	secuencia completa	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQ SPSRGLEWLGRIYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL

	de HC (SEC ID NO:164)	QLNSVTPEDTAVYYCARERSYRDYFDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:165)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIFTYLNWYQQKPGK APKLLISAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYYSTSLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:166)	CAGGTGCAATTGCAGCAGAGCGGTCCGGGCCTGGTGAAA CCGAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCGATTTCCGGA GATAGCGTGAGCTCTAACTCTGCTGCTTGGAACTGGATTC GTCAGAGCCCGAGCCGTGGCCTCGAGTGGCTGGGCCGTA TCTACTACCGTAGCAAATGGTACAACGACTATGCCGTGAGC GTGAAAAGCCGCATTACCATTAACCCGGATACTTCGAAAAA CCAGTTTAGCCTGCAACTGAACAGCGTGACCCCGGAAGAT ACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGAACGTTCTTACCGTG ACTACTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGT TAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTG GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA CGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA CAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTC CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCA AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG CCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACC TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG

		CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:167)	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCA GCGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGCCAGCC AGGGTATTTTCACTTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCG GGCAAAGCGCCGAAACTATTAATCTCTGCTGCTTCTACTCT GCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGATC CGGCACCGATTTCACCCTGACCATTAGCTCTCTGCAACCG GAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGTACTACTCTAC TTCTCTGACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAAAC GTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAG CGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG GAAAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACA GCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACG AGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCG AGTGT
NOV0699	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:168)	SGDNIRKYVVH
	LCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:169)	RDNNRPS
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:170)	QSWDSFLAVV
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:171)	SYAMH
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:172)	FISSLGSYTYYADSVKG
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:173)	ETAGYGYAFDP
	secuencia total vH (SEC ID NO:174)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAP GKGLEWVSFISSLGSYTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARETAGYGYAFDPWGQGTLVTVSS
	secuencia	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIRKYVVHWYQQKPGQA

	total vL (SEC ID NO:175)	PVLVIYRDNNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADY YCQSWDSFLAVVFGGGTKLTVL
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:176)	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAG CCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGA TTCACCTTTTCTTCTTACGCTATGCATTGGGTGCGCCAGGC CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCTTCATCTCTTCTC TGGGTTCTTACACCTACTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCG CTTTACCATCAGCCGCGATAATTCGAAAAACACCCTGTATC TGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTA TTATTGCGCGCGTGAAACTGCTGGTTACGGTTACGCTTTCG ATCCGTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:177)	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGTGAGC CCGGGCCAGACCGCGAGCATTACCTGTAGCGGCGATAACA TCCGTAAATACGTTGTTCATTGGTACCAGCAGAAACCGGGC CAGGCGCCGGTGCTGGTGATCTACCGTGACAACAACCGTC CGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCCAACAGCGG CAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACCCAGGCGGA AGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGTCTTGGGACTCTTTCC TGGCTGTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCT A
	secuencia completa de HC (SEC ID NO:178)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAP GKGLEWVSFISSLGSYTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARETAGYGYAFDPWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:179)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIRKYVVHWYQQKPGQA PVLVIYRDNNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADY YCQSWDSFLAVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE CS
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:180)	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAG CCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGA TTCACCTTTTCTTCTTACGCTATGCATTGGGTGCGCCAGGC CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCTTCATCTCTTCTC TGGGTTCTTACACCTACTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCG CTTTACCATCAGCCGCGATAATTCGAAAAACACCCTGTATC TGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTA TTATTGCGCGCGTGAAACTGCTGGTTACGGTTACGCTTTCG

		ATCCGTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCAGC CTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCC TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGT GGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGC TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:181)	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGTGAGC CCGGGCCAGACCGCGAGCATTACCTGTAGCGGCGATAACA TCCGTAAATACGTTGTTCATTGGTACCAGCAGAAACCGGGC CAGGCGCCGGTGCTGGTGATCTACCGTGACAACAACCGTC CGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCCAACAGCGG CAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACCCAGGCGGA AGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGTCTTGGGACTCTTTCC TGGCTGTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCT AGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCG CCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGG TGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGT GGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGT GGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTAC GCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGG AAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAG GGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTC A
NOV0705	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:182)	SGSSSNIGLDYVN
	LCDR2	RNKQRPS

	(Kabat) (SEC ID NO:183)	
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:184)	QAWAGRTNYVV
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:185)	NYWIG
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:186)	FIDPGVSYTRYSPSFQG
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:187)	VLAHSTEYNWPAF
	secuencia total vH (SEC ID NO:188)	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIGWVRQMPGKGLEWMGFIDPGVSYTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVLAHSTEYNWPAFWGQGTLVTVSS
	secuencia total vL (SEC ID NO:189)	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGLDYVNWYQQLPGTAPKLLIYRNKQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQAWAGRTNYVVFGGGTKLTVL
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:190)	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGAAAGCCTGAAAATTAGCTGCAAAGGCTCCGGATATAGCTTCACTAACTACTGGATCGGTTGGGTGCGCCAGATGCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGATGGGCTTCATCGACCCGGGTGTTAGCTACACCCGTTATAGCCCGAGCTTTCAGGGCCAGGTGACCATTAGCGCGGATAAAAGCATCAGCACCGCGTATCTGCAATGGAGCAGCCTGAAAGCGAGCGATACCGCGATGTATTATTGCGCGCGTGTTCTGGCTCATTCTACTGAATACAACTGGCCGGCTTTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:191)	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGTGCACCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTCTGGACTACGTGAACTGGTACCAGCAGCTGCCGGGCACGGCGCCGAAACTGCTGATCTACCGTAACAAACAGCGCCCGAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGCCAGCCTGGCGATTACCGGCCTGCAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGGCTTGGGCTGGTCGTACTAACTACGTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA
	secuencia	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIGWVRQMP

	completa de HC (SEC ID NO:192)	GKGLEWMGFIDPGVSYTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQW SSLKASDTAMYYCARVLAHSTEYNWPAFWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:193)	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGLDYVNWYQQLPG TAPKLLIYRNKQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEA DYYCQAWAGRTNYVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:194)	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCGGAAGTGAAAAAAC CGGGCGAAAGCCTGAAAATTAGCTGCAAAGGCTCCGGATA TAGCTTCACTAACTACTGGATCGGTTGGGTGCGCCAGATG CCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGATGGGCTTCATCGACCCG GGTGTTAGCTACACCCGTTATAGCCCGAGCTTTCAGGGCC AGGTGACCATTAGCGCGGATAAAAGCATCAGCACCGCGTA TCTGCAATGGAGCAGCCTGAAAGCGAGCGATACCGCGATG TATTATTGCGCGCGTGTTCTGGCTCATTCTACTGAATACAA CTGGCCGGCTTTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTT AGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGG CACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCC TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA CACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA CAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTC CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCA AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG CCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACC TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA

		GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:195)	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGTGCA CCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGTAGCGGCAGCAGC AGCAACATTGGTCTGGACTACGTGAACTGGTACCAGCAGC TGCCGGGCACGGCGCCGAAACTGCTGATCTACCGTAACAA ACAGCGCCCGAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGATC CAAAAGCGGCACCAGCGCCAGCCTGGCGATTACCGGCCT GCAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGGCTTGG GCTGGTCGTACTAACTACGTTGTGTTTGGCGGCGGCACGA AGTTAACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGT CACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAAC AAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGG GAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCG TCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAG CAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACG CCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGG TCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCC CTACAGAATGTTCA
NOV0709	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:196)	TGTSSDVGSYNYVS
	LCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:197)	YVSNRPS
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:198)	ASYTHQGSWV
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:199)	TYYMH
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:200)	VISSDGSFTFYADSVKG
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:201)	HGYGAFDY
	secuencia total vH (SEC ID NO:202)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYYMHWVRQAP GKGLEWVSVISSDGSFTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARHGYGAFDYWGQGTLVTVSS

	secuencia total vL (SEC ID NO:203)	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVSWYQQHP GKAPKLMIYYVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCASYTHQGSWVFGGGTKLTVL
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:204)	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAG CCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGA TTCACCTTTTCTACTTACTACATGCATTGGGTGCGCCAGGC CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCGTTATCTCTTCT GACGGTTCTTTCACCTTCTATGCGGATAGCGTGAAAGGCC GCTTTACCATCAGCCGCGATAATTCGAAAAACACCCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGT ATTATTGCGCGCGTCATGGTTACGGTGCTTTCGATTACTGG GGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:205)	GATATCGCGCTGACCCAGCCGGCGAGCGTGAGCGGTAGC CCGGGCCAGAGCATTACCATTAGCTGCACCGGCACCAGCA GCGATGTGGGCTCTTACAACTACGTGTCTTGGTACCAGCA GCATCCGGGCAAGGCGCCGAAACTGATGATCTACTACGTT TCTAACCGTCCGAGCGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGAT CCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACCATTAGCGGCCT GCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCGCTTCTTAC ACTCATCAGGGTTCTTGGGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGT TAACCGTCCTA
	secuencia completa de HC (SEC ID NO:206)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYYMHWVRQAP GKGLEWVSVISSDGSFTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARHGYGAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:207)	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNYVSWYQQHP GKAPKLMIYYVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCASYTHQGSWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPS SEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:208)	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAG CCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGA TTCACCTTTTCTACTTACTACATGCATTGGGTGCGCCAGGC CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCGTTATCTCTTCT GACGGTTCTTTCACCTTCTATGCGGATAGCGTGAAAGGCC GCTTTACCATCAGCCGCGATAATTCGAAAAACACCCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGT

		ATTATTGCGCGCGTCATGGTTACGGTGCTTTCGATTACTGG GGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCAGCCTCCACCA AGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCA GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTC CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT CTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTC ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:209)	GATATCGCGCTGACCCAGCCGGCGAGCGTGAGCGGTAGC CCGGGCCAGAGCATTACCATTAGCTGCACCGGCACCAGCA GCGATGTGGGCTCTTACAACTACGTGTCTTGGTACCAGCA GCATCCGGGCAAGGCGCCGAAACTGATGATCTACTACGTT TCTAACCGTCCGAGCGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGAT CCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACCATTAGCGGCCT GCAAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCGCTTCTTAC ACTCATCAGGGTTCTTGGGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGT TAACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCAC TCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAG GCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAG CCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCA AGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAA CAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCT GAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCA CGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTA CAGAATGTTCA
NOV0710	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:210)	RASQSISLWLN

	LCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:211)	AASTLQS
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:212)	QQYYTSPYT
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:213)	SYAMS
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:214)	VIRSSGSSTYYADSVKG
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:215)	GGGYFDY
	secuencia total vH (SEC ID NO:216)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSVIRSSGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGGGYFDYWGQGTLVTVSS
	secuencia total vL (SEC ID NO:217)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISLWLNWYQQKPGK APKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYYTSPYTFGQGTKVEIK
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:218)	CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAA CCTGGCGGATCCCTGAGGCTGAGCTGCGCTGCTAGTGGC TTCACCTTCTCTAGCTACGCTATGAGCTGGGTCCGCCAGG CCCCTGGTAAAGGCCTCGAGTGGGTGTCAGTGATTAGATC TAGCGGCTCTAGCACCTACTACGCCGATAGCGTGAAGGGC CGGTTCACTATCTCTAGGGATAACTCTAAGAACACCCTGTA CCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGT CTACTACTGCGCTAGAGGCGGAGGCTACTTCGACTACTGG GGTCAAGGCACCCTGGTCACCGTGTCTAGC
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:219)	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAG TGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCTCTCAG TCTATTAGCCTGTGGCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GTAAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCTACCCT GCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGT GGCACCGACTTCACCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCG AGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGTACTACACTAGC CCCTACACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAG
	secuencia	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP

	completa de HC (SEC ID NO:220)	GKGLEWVSVIRSSGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGGGYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:221)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISLWLNWYQQKPGK APKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYYTSPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:222)	CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAA CCTGGCGGATCCCTGAGGCTGAGCTGCGCTGCTAGTGGC TTCACCTTCTCTAGCTACGCTATGAGCTGGGTCCGCCAGG CCCCTGGTAAAGGCCTCGAGTGGGTGTCAGTGATTAGATC TAGCGGCTCTAGCACCTACTACGCCGATAGCGTGAAGGGC CGGTTCACTATCTCTAGGGATAACTCTAAGAACACCCTGTA CCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGT CTACTACTGCGCTAGAGGCGGAGGCTACTTCGACTACTGG GGTCAAGGCACCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTA AGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTC TACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAG GACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAACTCTG GGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCT GCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGAC AGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGC AACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA GAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCC CCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGT GTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATC AGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG TCCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAG AGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCT GACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATAC AAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCG AAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC CCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTT CTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTG GACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCG TGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTG

		CAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:223)	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAG TGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCTCTCAG TCTATTAGCCTGTGGCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GTAAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCTACCCT GCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGT GGCACCGACTTCACCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCG AGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGTACTACACTAGC CCCTACACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAGC GTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAG CGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG GAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACA GCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACG AGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCG AGTGC
NOV0712	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:224)	RASQSISSYLN
	LCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:225)	AVSTLQS
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:226)	QQSGTFPPTT
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:227)	SHGMH
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:228)	VISGSGSNTGYADSVKG
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:229)	QWGSYAFDS
	secuencia total vH (SEC ID NO:230)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHGMHWVRQA PGKGLEWVSVISGSGSNTGYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARQWGSYAFDSWGQGTLVTVSS
	secuencia	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGK

	total vL (SEC ID NO:231)	APKLLIYAVSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSGTFPPTTFGQGTKVEIK
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:232)	CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAG CCTGGCGGATCCCTGAGGCTGAGCTGCGCTGCTAGTGGC TTCACCTTTAGCTCTCACGGAATGCACTGGGTCCGCCAGG CCCCTGGTAAAGGCCTCGAGTGGGTGTCAGTGATTAGCGG TAGCGGCTCTAACACCGGCTACGCCGATAGCGTGAAGGGC CGGTTCACTATCTCTAGGGATAACTCTAAGAACACCCTGTA CCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGT CTACTACTGCGCTAGACAGTGGGGCTCCTACGCCTTCGAT AGCTGGGGTCAAGGCACCCTGGTCACCGTGTCTAGC
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:233)	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAG TGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCTCTCAG TCTATCTCTAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGG TAAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGTGTCTACCCTG CAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTG GCACCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAGCCCGA GGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGTCAGGCACCTTC CCCCCTACTACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTA AG
	secuencia completa de HC (SEC ID NO:234)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHGMHWVRQA PGKGLEWVSVISGSGSNTGYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARQWGSYAFDSWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:235)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGK APKLLIYAVSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSGTFPPTTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:236)	CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAG CCTGGCGGATCCCTGAGGCTGAGCTGCGCTGCTAGTGGC TTCACCTTTAGCTCTCACGGAATGCACTGGGTCCGCCAGG CCCCTGGTAAAGGCCTCGAGTGGGTGTCAGTGATTAGCGG TAGCGGCTCTAACACCGGCTACGCCGATAGCGTGAAGGGC CGGTTCACTATCTCTAGGGATAACTCTAAGAACACCCTGTA CCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGT CTACTACTGCGCTAGACAGTGGGGCTCCTACGCCTTCGAT

		AGCTGGGGTCAAGGCACCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTA GCACTAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAG CAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTG GTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGA ACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGC CGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGT GGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTAT ATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACAC CTGCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCC TTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTG ATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTG GACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGC CCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTC CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAA GAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCC CAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACG GGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGT GCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:237)	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAG TGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCTCTCAG TCTATCTCTAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGG TAAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGTGTCTACCCTG CAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTG GCACCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAGCCCGA GGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGTCAGGCACCTTC CCCCCTACTACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTA AGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCC CAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGT GTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTG CAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGC CAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACC TACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACT ACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGG CGAGTGC
NOV0713	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:238)	SGDNLRSYYVH
	LCDR2	GNNKRPS

	(Kabat) (SEC ID NO:239)	
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:240)	GVYTLSSVV
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:241)	SNSAAWN
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:242)	RIYYRSKWYNDYAVSVKS
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:243)	GLVGRYGQPYHFDV
	secuencia total vH (SEC ID NO:244)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRIYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGLVGRYGQPYHFDVWGQGTLVTVSS
	secuencia total vL (SEC ID NO:245)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLRSYYVHWYQQKPGQAPVLVIYGNNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCGVYTLSSVVFGGGTKLTVL
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:246)	CAGGTGCAATTGCAGCAGAGCGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCGATTTCCGGAGATAGCGTGAGCTCTAACTCTGCTGCTTGGAACTGGATTCGTCAGAGCCCGAGCCGTGGCCTCGAGTGGCTGGGCCGTATCTACTACCGTAGCAAATGGTACAACGACTATGCCGTGAGCGTGAAAAGCCGCATTACCATTAACCCGGATACTTCGAAAAACCAGTTTAGCCTGCAACTGAACAGCGTGACCCCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTCTGGTTGGTCGTTACGGTCAGCCGTACCATTTCGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:247)	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGTGAGCCCGGGCCAGACCGCGAGCATTACCTGTAGCGGCGATAACCTGCGTTCTTACTACGTTCATTGGTACCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGGTGCTGGTGATCTACGGTAACAACAAACGTCCGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACCCAGGCGGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCGGTGTTTACACTCTGTCTTCTGTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA

	secuencia completa de HC (SEC ID NO:248)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQ SPSRGLEWLGRIYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL QLNSVTPEDTAVYYCARGLVGRYGQPYHFDVWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:249)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLRSYYVHWYQQKPGQA PVLVIYGNNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADY YCGVYTLSSVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC S
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:250)	CAGGTGCAATTGCAGCAGAGCGGTCCGGGCCTGGTGAAA CCGAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCGATTTCCGGA GATAGCGTGAGCTCTAACTCTGCTGCTTGGAACTGGATTC GTCAGAGCCCGAGCCGTGGCCTCGAGTGGCTGGGCCGTA TCTACTACCGTAGCAAATGGTACAACGACTATGCCGTGAGC GTGAAAAGCCGCATTACCATTAACCCGGATACTTCGAAAAA CCAGTTTAGCCTGCAACTGAACAGCGTGACCCCGGAAGAT ACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTCTGGTTGGTCGTT ACGGTCAGCCGTACCATTTCGATGTTTGGGGCCAAGGCAC CCTGGTGACTGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGAC CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCC AAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC

		TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG TCTCCGGGTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:251)	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGTGAGC CCGGGCCAGACCGCGAGCATTACCTGTAGCGGCGATAAC CTGCGTTCTTACTACGTTCATTGGTACCAGCAGAAACCGGG CCAGGCGCCGGTGCTGGTGATCTACGGTAACAACAAACGT CCGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCCAACAGCG GCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACCCAGGCGG AAGACGAAGCGGATTATTACTGCGGTGTTTACACTCTGTCT TCTGTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTAG GTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCC CTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTG TGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGG CCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGG AGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGC GGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAA GTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGG AGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA
NOV0718	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:252)	SGDKIPTYTVH
	LCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:253)	DDNKRPS
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:254)	QSTASGTVV
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:255)	SYALH
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:256)	RIKSKTNGGTTDYAAPVKG
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:257)	VDATYSYSGYYYPMDY
	secuencia total vH (SEC ID NO:258)	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFNSYALHWVRQAP GKGLEWVGRIKSKTNGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVYYCARVDATYSYSGYYYPMDYWGQGTLVT VSS

	secuencia total vL (SEC ID NO:259)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKIPTYTVHWYQQKPGQA PVLVIYDDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADY YCQSTASGTVVFGGGTKLTVL
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:260)	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGAAA CCAGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCCTCCGGA TTCACCTTTAACTCTTACGCTCTGCATTGGGTGCGCCAGGC CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTGGGCCGTATCAAATCT AAAACTAACGGTGGTACTACTGACTATGCCGCCCCAGTGA AAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATGATTCGAAAAACACC CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAAGATACGG CCGTGTATTATTGCGCGCGTGTTGACGCTACTTACTCTTAC TCTGGTTACTACTACCCGATGGATTACTGGGGCCAAGGCA CCCTGGTGACTGTTAGCTCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:261)	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGTGAGC CCGGGCCAGACCGCGAGCATTACCTGTAGCGGCGATAAAA TCCCGACTTACACTGTTCATTGGTACCAGCAGAAACCGGG CCAGGCGCCGGTGCTGGTGATCTACGACGACAACAAACGT CCGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCCAACAGCG GCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACCCAGGCGG AAGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGTCTACTGCTTCTGGT ACTGTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA
	secuencia completa de HC (SEC ID NO:262)	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFNSYALHWVRQAP GKGLEWVGRIKSKTNGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVYYCARVDATYSYSGYYYPMDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:263)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKIPTYTVHWYQQKPGQA PVLVIYDDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADY YCQSTASGTVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC S
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:264)	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGAAA CCAGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCCTCCGGA TTCACCTTTAACTCTTACGCTCTGCATTGGGTGCGCCAGGC CCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTGGGCCGTATCAAATCT AAAACTAACGGTGGTACTACTGACTATGCCGCCCCAGTGA AAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATGATTCGAAAAACACC

		CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAAGATACGG CCGTGTATTATTGCGCGCGTGTTGACGCTACTTACTCTTAC TCTGGTTACTACTACCCGATGGATTACTGGGGCCAAGGCA CCCTGGTGACTGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATC GGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC CCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGC CCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCA GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC TGTCTCCGGGTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:265)	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGTGAGC CCGGGCCAGACCGCGAGCATTACCTGTAGCGGCGATAAAA TCCCGACTTACACTGTTCATTGGTACCAGCAGAAACCGGG CCAGGCGCCGGTGCTGGTGATCTACGACGACAACAAACGT CCGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCCAACAGCG GCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACCCAGGCGG AAGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGTCTACTGCTTCTGGT ACTGTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTAG GTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCC CTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTG TGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGG CCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGG AGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGC GGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAA GTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGG AGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA
NOV0719	LCDR1 (Kabat) (SEC ID	RASQSIVSYLN

	NO:266)	
	LCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:267)	DASSLQS
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:268)	QQSGSHSIT
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:269)	SHWVH
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:270)	VISYMGSSTYYADSVKG
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:271)	GSYDMAFDV
	secuencia total vH (SEC ID NO:272)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWVHWVRQA PGKGLEWVSVISYMGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGSYDMAFDVWGQGTLVTVSS
	secuencia total vL (SEC ID NO:273)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIVSYLNWYQQKPGK APKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSGSHSITFGQGTKVEIK
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:274)	CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAG CCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCT TCACCTTTAGCTCTCACTGGGTGCACTGGGTCAGACAGGC CCCTGGTAAAGGCCTGGAGTGGGTGTCAGTGATTAGCTAT ATGGGCTCTAGCACCTACTACGCCGATAGCGTGAAGGGCC GGTTCACTATCTCTAGGGATAACTCTAAGAACACCCTGTAC CTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTCT ACTACTGCGCTAGAGGCTCCTACGATATGGCCTTCGACGT GTGGGGTCAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCTAGC
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:275)	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAG TGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCTCTCAG TCTATCGTCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GTAAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGACGCCTCTAGCCT GCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGT GGCACCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAGCCCG AGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGTCAGGCTCTCAC TCTATCACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAG

	secuencia completa de HC (SEC ID NO:276)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWVHWVRQA PGKGLEWVSVISYMGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGSYDMAFDVWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:277)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIVSYLNWYQQKPGK APKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSGSHSITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:278)	CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAG CCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCT TCACCTTTAGCTCTCACTGGGTGCACTGGGTCAGACAGGC CCCTGGTAAAGGCCTGGAGTGGGTGTCAGTGATTAGCTAT ATGGGCTCTAGCACCTACTACGCCGATAGCGTGAAGGGCC GGTTCACTATCTCTAGGGATAACTCTAAGAACACCCTGTAC CTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTCT ACTACTGCGCTAGAGGCTCCTACGATATGGCCTTCGACGT GTGGGGTCAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAG CACTAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGC AAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGG TGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAA CTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCC GTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTG GTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATA TCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACAC CTGCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCC TTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTG ATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTG GACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGC CCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTC CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAA GAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCC CAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACG GGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGT GCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTG

		ACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:279)	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAG TGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCTCTCAG TCTATCGTCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GTAAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGACGCCTCTAGCCT GCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGT GGCACCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAGCCCG AGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGTCAGGCTCTCAC TCTATCACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAGC GTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAG CGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG GAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACA GCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACG AGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCG AGTGC
NOV0720	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:280)	SGDNIGSMTAH
	LCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:281)	DKNERPS
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:282)	QSWDDSYNSVV
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:283)	SNSAGWN
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:284)	RIYYRSKWYNDYAVSVKS
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:285)	EKYTVSFYDFFDY
	secuencia completa de vH (SEC ID	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAGWNWIRQ SPSRGLEWLGRIYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL QLNSVTPEDTAVYYCAREKYTVSFYDFFDYWGQGTLVTVSS

	NO:286)	
	secuencia total vL (SEC ID NO:287)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGSMTAHWYQQKPGQA PVLVIYDKNERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADY YCQSWDDSYNSVVFGGGTKLTVL
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:288)	CAGGTGCAATTGCAGCAGAGCGGTCCGGGCCTGGTGAAA CCGAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCGATTTCCGGA GATAGCGTGAGCTCTAACTCTGCTGGTTGGAACTGGATTC GTCAGAGCCCGAGCCGTGGCCTCGAGTGGCTGGGCCGTA TCTACTACCGTAGCAAATGGTACAACGACTATGCCGTGAGC GTGAAAAGCCGCATTACCATTAACCCGGATACTTCGAAAAA CCAGTTTAGCCTGCAACTGAACAGCGTGACCCCGGAAGAT ACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGAAAAATACACTGTTTC TTTCTACGACTTCTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGG TGACTGTTAGCTCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:289)	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGTGAGC CCGGGCCAGACCGCGAGCATTACCTGTAGCGGCGATAACA TCGGTTCTATGACTGCTCATTGGTACCAGCAGAAACCGGG CCAGGCGCCGGTGCTGGTGATCTACGACAAAAACGAACGT CCGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCCAACAGCG GCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACCCAGGCGG AAGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGTCTTGGGACGACTC TTACAACTCTGTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACC GTCCTA
	secuencia completa de HC (SEC ID NO:290)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAGWNWIRQ SPSRGLEWLGRIYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL QLNSVTPEDTAVYYCAREKYTVSFYDFFDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:291)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGSMTAHWYQQKPGQA PVLVIYDKNERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADY YCQSWDDSYNSVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL QANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPT ECS
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:292)	CAGGTGCAATTGCAGCAGAGCGGTCCGGGCCTGGTGAAA CCGAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCGATTTCCGGA GATAGCGTGAGCTCTAACTCTGCTGGTTGGAACTGGATTC GTCAGAGCCCGAGCCGTGGCCTCGAGTGGCTGGGCCGTA TCTACTACCGTAGCAAATGGTACAACGACTATGCCGTGAGC

		GTGAAAAGCCGCATTACCATTAACCCGGATACTTCGAAAAA CCAGTTTAGCCTGCAACTGAACAGCGTGACCCCGGAAGAT ACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGAAAAATACACTGTTTC TTTCTACGACTTCTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGG TGACTGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTT CCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC CGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACT CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATC TTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA CGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:293)	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGTGAGC CCGGGCCAGACCGCGAGCATTACCTGTAGCGGCGATAACA TCGGTTCTATGACTGCTCATTGGTACCAGCAGAAACCGGG CCAGGCGCCGGTGCTGGTGATCTACGACAAAAACGAACGT CCGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCCAACAGCG GCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACCCAGGCGG AAGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGTCTTGGGACGACTC TTACAACTCTGTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACC GTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGT TCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCAC ACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTG ACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCG GGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACA AGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCA GTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCAT GAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAA TGTTCA

Ejemplo 2: Diseño de anticuerpos mediante mutagénesis dirigida al sitio

[00381] La mutagénesis dirigida al sitio para la eliminación de los sitios potenciales para las modificaciones posteriores a la traducción y germinación de la línea celular se realizó para un subconjunto de anticuerpos anti-CDH6 utilizando el Kit de mutagénesis dirigida a sitio QuikChange® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). La secuencia NOV690 se cambió D53S y VL (3-J-línea germinal) que resulta en anticuerpo NOV1126. La secuencia NOV695 se cambió N31Q y $S^{49}Y$ que resulta en anticuerpo NOV1127. La secuencia NOV720 se cambió N31Q, N95Q y VL (3-J-línea germinal) que resulta en anticuerpo NOV1126. La secuencia de la información para los anticuerpos modificados se describe en la Tabla 6.

Tabla 6

Información de secuencia de anticuerpos manipulados

NOV1126	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:294)	SGDAIGTKFAH
	LCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:295)	YDHERPS
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:296)	YSRASSNLV
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:297)	DHAID
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:298)	VIAGSGSITYYADSVKG
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:299)	DTGVYREYMDV

	secuencia total vH (SEC ID NO:300)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHAIDWVRQAP GKGLEWVSVIAGSGSITYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDTGVYREYMDVWGQGTLVTVSS
	secuencia total vL (SEC ID NO:301)	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDAIGTKFAHWYQQKPGQA PVLVIYYDHERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADY YCYSRASSNLVFGGGTKLTVL
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:302)	GAAGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAG CCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGA TTCACCTTTTCTGACCATGCTATCGACTGGGTGCGCCAGG CCCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCGTTATCGCTGG TAGCGGTTCTATCACCTACTATGCGGATAGCGTGAAAGGC CGCTTTACCATCAGCCGCGATAATTCGAAAAACACCCTGTA TCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTG TATTATTGCGCGCGTGACACTGGTGTTTACCGTGAATACAT GGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:303)	AGCTATGAACTGACCCAGCCGCTGAGCGTGAGCGTGGCG CTGGGCCAGACCGCGCGCATTACCTGTAGCGGCGATGCTA TCGGTACTAAATTCGCTCATTGGTACCAGCAGAAACCGGG CCAGGCGCCGGTGCTGGTGATCTACTACGACCATGAACGT CCGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCCAACAGCG GCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCCGCGCGCAGGCGG GCGACGAAGCGGATTATTACTGCTACTCTCGTGCTTCTTCT AACCTGGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA
	secuencia completa de HC (SEC ID NO:304)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHAIDWVRQAP GKGLEWVSVIAGSGSITYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDTGVYREYMDVWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:305)	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDAIGTKFAHWYQQKPGQA PVLVIYYDHERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADY YCYSRASSNLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC S
	secuencia de ADN HC (SEC ID	GAAGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAG CCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGA TTCACCTTTTCTGACCATGCTATCGACTGGGTGCGCCAGG CCCCGGGCAAAGGTCTCGAGTGGGTTTCCGTTATCGCTGG

	NO:306)	TAGCGGTTCTATCACCTACTATGCGGATAGCGTGAAAGGC CGCTTTACCATCAGCCGCGATAATTCGAAAAACACCCTGTA TCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTG TATTATTGCGCGCGTGACACTGGTGTTTACCGTGAATACAT GGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA GCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCT CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTC GTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACT CACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCC CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:307)	AGCTATGAACTGACCCAGCCGCTGAGCGTGAGCGTGGCG CTGGGCCAGACCGCGCGCATTACCTGTAGCGGCGATGCTA TCGGTACTAAATTCGCTCATTGGTACCAGCAGAAACCGGG CCAGGCGCCGGTGCTGGTGATCTACTACGACCATGAACGT CCGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCCAACAGCG GCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCCGCGCGCAGGCGG GCGACGAAGCGGATTATTACTGCTACTCTCGTGCTTCTTCT AACCTGGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTAG GTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCC CTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTG TGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGG CCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGG AGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGC GGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAA GTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGG AGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA
NOV1127	LCDR1 (Kabat)	RASQGIFTYLN

	(SEC ID NO:308)	
	LCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:309)	AASTLQS
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:310)	QQYYSTSLT
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:311)	SQSAAWN
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:312)	RIYYRSKWYNDYAVSVKS
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:313)	ERSYRDYFDY
	secuencia total vH (SEC ID NO:314)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSQSAAWNWIRQ SPSRGLEWLGRIYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL QLNSVTPEDTAVYYCARERSYRDYFDYWGQGTLVTVSS
	secuencia total vL (SEC ID NO:315)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIFTYLNWYQQKPGK APKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYYSTSLTFGQGTKVEIK
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:316)	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGCCCTGGCCTGGTCAAG CCTAGTCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCTATTAGCGGCG ATAGTGTGTCTAGTCAGTCAGCCGCCTGGAACTGGATTAG ACAGTCACCCTCTAGGGGCCTGGAGTGGCTGGGTAGAATC TACTATAGGTCTAAGTGGTATAACGACTACGCCGTCAGCGT GAAGTCTAGGATCACTATTAACCCCGACACCTCTAAGAATC AGTTTAGCCTGCAGCTGAATAGCGTGACCCCCGAGGACAC CGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGCGGTCCTATAGAGAC TACTTCGACTACTGGGGTCAGGGCACCCTGGTCACCGTGT CTAGC
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:317)	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAG TGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCTCTCAG GGAATCTTCACCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GTAAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCTACCCT GCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGT GGCACCGACTTCACCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCG AGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGTACTACTCTACT

		AGCCTGACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAG
	secuencia completa de HC (SEC ID NO:318)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSQSAAWNWIRQ SPSRGLEWLGRIYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL QLNSVTPEDTAVYYCARERSYRDYFDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:319)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIFTYLNWYQQKPGK APKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYYSTSLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
	secuencia de ADN HC (SEC ID NO:320)	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGCCCTGGCCTGGTCAAG CCTAGTCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCTATTAGCGGCG ATAGTGTGTCTAGTCAGTCAGCCGCCTGGAACTGGATTAG ACAGTCACCCTCTAGGGGCCTGGAGTGGCTGGGTAGAATC TACTATAGGTCTAAGTGGTATAACGACTACGCCGTCAGCGT GAAGTCTAGGATCACTATTAACCCCGACACCTCTAAGAATC AGTTTAGCCTGCAGCTGAATAGCGTGACCCCCGAGGACAC CGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGCGGTCCTATAGAGAC TACTTCGACTACTGGGGTCAGGGCACCCTGGTCACCGTGT CTAGCGCTAGCACTAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGC CCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTG GGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAG TGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACAC CTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCT GAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACC CAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCT GGGAGGGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAG GACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGC GTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCA AGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCT GAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCC CTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGG GCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCA GCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCT GTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGA

		GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGAC CACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTG TACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAG GGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCG GCAAG
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:321)	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAG TGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCTCTCAG GGAATCTTCACCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GTAAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCTACCCT GCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGT GGCACCGACTTCACCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCG AGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGTACTACTCTACT AGCCTGACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAGC GTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAG CGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG GAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACA GCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACG AGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCG AGTGC
NOV1132	LCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:322)	SGDNIGSMTAH
	LCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:323)	DKNERPS
	LCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:324)	QSWDDSYTSVV
	HCDR1 (Kabat) (SEC ID NO:325)	SQSAGWN
	HCDR2 (Kabat) (SEC ID NO:326)	RIYYRSKWYNDYAVSVKS
	HCDR3 (Kabat) (SEC ID NO:327)	EKYTVSFYDFFDY
	secuencia	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSQSAGWNWIRQ

	completa de vH (SEC ID NO:328)	SPSRGLEWLGRIYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREKYTVSFYDFFDYWGQGTLVTVSS
	secuencia completa de vL (SEC ID NO:329)	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSMTAHWYQQKPGQAPVLVIYDKNERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQSWDDSYTSVVFGGGTKLTVL
	Secuencia de ADN vH (SEC ID NO:330)	CAGGTGCAATTGCAGCAGAGCGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCGATTTCCGGAGATAGCGTGAGCTCTCAGTCTGCTGGTTGGAACTGGATTCGTCAGAGCCCGAGCCGTGGCCTCGAGTGGCTGGGCCGTATCTACTACCGTAGCAAATGGTACAACGACTATGCCGTGAGCGTGAAAAGCCGCATTACCATTAACCCGGATACTTCGAAAAACCAGTTTAGCCTGCAACTGAACAGCGTGACCCCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGAAAAATACACTGTTTCTTTCTACGACTTCTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
	secuencia de ADN vL (SEC ID NO:331)	AGCTATGAACTGACCCAGCCGCTGAGCGTGAGCGTGGCGCTGGGCCAGACCGCGCGCATTACCTGTAGCGGCGATAACATCGGTTCTATGACTGCTCATTGGTACCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGGTGCTGGTGATCTACGACAAAAACGAACGTCCGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCCGCGCGCAGGCGGGCGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGTCTTGGGACGACTCTTACACCTCTGTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA
	secuencia completa de HC (SEC ID NO:332)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSQSAGWNWIRQSPSRGLEWLGRIYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREKYTVSFYDFFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	secuencia completa de LC (SEC ID NO:333)	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSMTAHWYQQKPGQAPVLVIYDKNERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQSWDDSYTSVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
	secuencia	CAGGTGCAATTGCAGCAGAGCGGTCCGGGCCTGGTGAAA

	de ADN HC (SEC ID NO:334)	CCGAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCGATTTCCGGA GATAGCGTGAGCTCTCAGTCTGCTGGTTGGAACTGGATTC GTCAGAGCCCGAGCCGTGGCCTCGAGTGGCTGGGCCGTA TCTACTACCGTAGCAAATGGTACAACGACTATGCCGTGAGC GTGAAAAGCCGCATTACCATTAACCCGGATACTTCGAAAAA CCAGTTTAGCCTGCAACTGAACAGCGTGACCCCGGAAGAT ACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGAAAAATACACTGTTTC TTTCTACGACTTCTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGG TGACTGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTT CCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC CGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACT CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATC TTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA CGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAA
	secuencia de ADN LC (SEC ID NO:335)	AGCTATGAACTGACCCAGCCGCTGAGCGTGAGCGTGGCG CTGGGCCAGACCGCGCGCATTACCTGTAGCGGCGATAACA TCGGTTCTATGACTGCTCATTGGTACCAGCAGAAACCGGG CCAGGCGCCGGTGCTGGTGATCTACGACAAAAACGAACGT CCGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCCAACAGCG GCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCCGCGCGCAGGCGG GCGACGAAGCGGATTATTACTGCCAGTCTTGGGACGACTC TTACACCTCTGTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACC GTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGT TCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCAC ACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTG ACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCG GGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACA AGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCA

		GTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

Ejemplo 3: Determinación de unión de IgG anti-CDH6 a las células que ofrecen expresión de CDH6 de origen humano, cynomolgus, de rata y de ratón

[00382] Para determinar la unión anti-CDH6 a células que ofrecen expresión de CDH6 de diferentes especies, el análisis FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia) se realizó en células OVCAR3, que expresan endógenamente CDH6, así como en células CHO diseñadas para expresar CDH6 de origen humano, cynomolgus, de rata y de ratón.

[00383] OVCAR3 (carcinoma seroso de ovario, se obtuvieron de ATCC (# HTB-161). La generación de las líneas celulares CHO que ofrecen expresión de CDH6 se describe en el Ejemplo 1 anterior.

[00384] Una suspensión de células se preparó mediante el tratamiento de células en cultivo con Reactivo de Disociación de Células Accutase® (#A1110501 Gibco, Grand Island, NY) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, seguido por lavado de las células en buffer FACS (PBS/BSA 1%, Gibco). Las células se resuspendieron en buffer FACS a $1x10^6$ células/ml y se tomaron alícuotas en una placa de fondo redondo de 96 pozos (Corning # CLS3360 a 100µl/pozo. Una dilución serial 1:5 de 8 puntos de los anticuerpos primarios se preparó para proporcionar una concentración de partida final más alta de 10 µg/ml y 100 µl/pozo se añadieron a la suspensión celular. Se utilizó IgG de control de isotipo humano como anticuerpo de control negativo (sistemas R&D #1-001-A Minneapolis, MN) se utilizó. Las células se incubaron con las soluciones de anticuerpo primario durante 30 minutos en hielo, seguido por tres lavadas en 200µl de buffer FACS frío. Las células se resuspendieron en 100 µl de Fc humano anti-humano conjugado con PE utilizado en la dilución 1/500 (Jackson Immuno Research #109-116-098 West Grove, PA) y las células se incubaron durante 30 minutos en hielo. Después de tres lavadas en 200µl de buffer FACS frío, las células se analizaron en un BD FACS Canto II® (BD Biosciences, San Jose, CA). La media geométrica de señal por muestra se determinó usando software FlowJo® y EC50 se determinaron trazando la media geométrica de la

señal vs concentración y la curva de regresión no lineal se ajustó usando Tibco Spotfire® (Tibco, Boston, MA). Todos los 20 anticuerpos anti-CDH6 analizados mostraron la unión dependiente de la dosis, específica a la diana en las células OVCAR3 (Figura 1) y las células CHO que expresan CDH6. No se observó reactividad en células CHO de tipo silvestre, que no expresan CDH6. Los valores de CE50 se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7

Afinidad de unión celular (CE50 [nM]) de CDH6 IgG en células OVCAR3 y células CHO negativas para la expresión de CDH6 (CHO-TREX) o diseñadas para expresar CDH6 humano, cynomolgus, de rata o de ratón.

Anticuerpo	OVCAR3	CHO-cyCDH6	CHO-huCDH6	CHO-moCDH6	CHO-ratCDH6	CHO-TREX
hIgG	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
NOV0670	4.092	0.281	0.205	0.312	0.521	n.a.
NOV0672	7.524	0.294	0.339	0.525	0.53	n.a.
NOV0674	13.398	0.32	0.494	0.527	0.537	n.a.
NOV0682	17.028	0.624	0.556	0.758	0.558	n.a.
NOV0685	5.214	0.178	0.179	0.23	0.321	n.a.
NOV0689	0.396	0.116	0.257	0.177	0.12	n.a.
NOV0690	0.924	0.777	0.136	3.041	16.595	n.a.
NOV0691	1.056	0.042	0.493	0.104	0.102	n.a.
NOV0692	1.056	0.08	0.107	0.221	0.155	n.a.
NOV0693	4.686	0.528	0.556	0.66	0.55	n.a.
NOV0695	2.64	0.306	0.267	0.427	0.659	n.a.
NOV0699	1.188	1.254	0.972	1.554	1.43	n.a.
NOV0705	0.858	0.005	0.511	0.018	0.646	n.a.
NOV0709	1.518	0.53	n.a.	0.669	0.531	n.a.
NOV0710	0.858	0.15	0.151	0.22	0.152	n.a.
NOV0712	1.122	0.202	0.21	0.537	0.523	n.a.
NOV0713	11.22	4.779	3.115	7.034	8.369	n.a.
NOV0718	0.66	0.313	0.187	0.52	0.322	n.a.
NOV0719	1.914	0.171	0.248	0.527	0.222	n.a.
NOV0720	0.66	0.543	0.428	0.338	0.493	n.a.

Ejemplo 4: Determinación de la afinidad de unión y la reactividad cruzada a CDH6 recombinante a partir de humano, cynomolgus, rata y ratón mediante la medición Biacore

[00385] Se determinó la afinidad de los anticuerpos a proteina CDH6 recombiante de origen humano, cynomolgus, de rata y de ratón utilizando tecnología SPR usando un instrumento Biacore ® T100 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) y con chips sensores CM5.

[00386] Brevemente, se utilizó HBS-P (HEPES 0.01 M, pH 7.4, NaCl 0.15 M, 0.005% tensioactivo P20) suplementado con 0.5% Fracción de Albumina Bovina V (solución 7.5%) (Gibco 15260-037) como el buffer de ejecución para todos los experimentos. El nivel de inmovilización y las interacciones del analito se midieron por unidad de respuesta (RU). Se realizaron experimentos piloto para probar y confirmar la viabilidad de la inmovilización del anticuerpo Fc anti-humano (Jackson ImmunoResearch 109-006-098 West Grove, PA) y la captura de los anticuerpos de prueba.

[00387] Para las mediciones cinéticas, se realizaron los experimentos en los que se capturaron los anticuerpos a la superficie del chip sensor mediante el anticuerpo anti-Fc humana inmovilizada y se determinó la capacidad de las proteínas para unirse a CDH6 en solución libre. Brevemente, 30 µg/ml de anticuerpo anti-Fc humana a un pH de 5 se inmovilizó sobre un chip sensor CM5 a través del acoplamiento de amina a un caudal de 12 µl/minuto en todos los cuatro flujos de células para llegar a 7500 RUs. 5-10µg/ml de anticuerpos de prueba fueron inyectadas en 10 µl/min durante 12 segundos al flujo de célula 2, 3 y 4 Posteriormente, 0,78 -50 nM de dominios extracelulares de los receptores de CDH6 (ECD) se diluyeron en una serie de 2 veces y se inyecta a un caudal de 80 µl/min durante 100 segundos sobre los flujos de células de referencia (celda de fuljo 1) y de prueba 2, 3 y 4. La tabla de ECD de prueba se encuentra a continuación. La disociación de la unión fue seguida durante 10 minutos. Después de cada ciclo de inyección, la superficie del chip se regeneró con 10 mM de Glicina en 60 µl/min durante 30 s. Todos los experimentos se realizaron a 25 °C y los datos de la respuesta global fueron equipados con un modelo simple de interacción 1:1 utilizando software de evaluación

Biacore® T100 versión 2.0.3 para obtener las estimaciones sobre la tasa de (ka), de disociación (k_d) y afinidad (K_D). Los resultados sugieren que la mayoría de los anticuerpos CDH6 ensayados en este panel son de reacción cruzada a humano, cynomolgus, rata y ratón (Tabla 8).

Tabla 8

Afinidad de la unión de IgGs anti-CDH6 a CDH6 recombinante a partir de humano, cynomolgus, rata y ratón mediante la medición Biacore

Anticuerpo	KD [M] CDH6 humana	KD [M] CDH6 cynomolgus	KD [M] CDH6 de rata	KD [M] CDH6 de ratón
NOV0670	9.329E-09	7.378E-09	7.232E-09	1.903E-08
NOV0672	2.463E-09	4.589E-09	3.291E-09	4.283E-09
NOV0674	1.954E-09	6.995E-09	2.829E-09	4.77E-09
NOV0682	6.188E-09	1.273E-08	5.554E-09	1.776E-07
NOV0685	4.551E-09	4.115E-09	4.636E-09	5.321E-09
NOV0689	5.648E-09	6.402E-09	6.083E-09	8.854E-09
NOV0690	6.969E-09	n/a	n/a	1.111E-09
NOV0691	8.343E-09	9.797E-09	4.332E-09	n/a
NOV0692	5.082E-09	5.554E-09	2.502E-09	2.494E-09
NOV0693	1.184E-09	1.966E-09	1.078E-09	1.843E-09
NOV0695	3.023E-12	n/a	n/a	1.67E-11
NOV0705	2.479E-09	n/a	2.334E-09	4.926E-11
NOV0709	8.174E-10	1.983E-09	6.977E-10	2.139E-09
NOV0710	2.065E-09	3.84E-09	2.385E-09	4.009E-09
NOV0712	2.904E-09	3.784E-09	5.719E-09	4.835E-09
NOV0713	1.419E-08	9.049E-09	7.147E-09	2.006E-08
NOV0718	5.455E-09	6.903E-09	6.608E-09	5.941E-09
NOV0719	1.899E-09	4.944E-09	8.789E-09	5.172E-09
NOV0720	2.47E-09	3.335E-09	1.406E-09	2.268E-09

Ejemplo 5: Categorización de los epítopes por Biacore

[00388] El mapeo de epítopos de anticuerpos CDH6 se determinó usando la tecnología de Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) en un instrumento Biacore® A-100 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) con un chip sensor CM5 (s). Brevemente, se utilizó buffer HBS-EP+ (HEPES 10 M, pH 7.4, NaCl 150 mM, tensioactivo P20 al 0.005%

suplementado con BSA 0.25% y calcio 10 mM) como el buffer de corrida para todos los experimentos. El nivel de inmovilización y las interacciones del analito se midieron por unidad de respuesta (RU). Se realizaron experimentos piloto para probar y confirmar la viabilidad de la inmovilización del anticuerpo Fc anti-humano (número de catálogo Jackson ImmunoResearch 109-006-098 West Grove, PA) y la captura de los anticuerpos de prueba.

[00389] Para el mapeo de epítopos, el anticuerpo Fc anti-humano se inmovilizó en el punto 1,2 y 4,5 de los cuatro flujos de células a 10,000RU. El punto 5 fue utilizado como referencia. Cada una de los anticuerpos CDH6 de prueba primarios fue capturado luego a través de Fc anti-humano inmovilizado en el chip biosensor en un nivel de respuesta mayor que 300 RU, seguido de la inyección de la proteína CDH6 en el punto 1 y 5 en los niveles de unión por encima de 20 RU. Los puntos 2 y 4 fueron utilizados como superficie de referencia adicional. Los cinco puntos de cada flujo de célula se bloquearon con dos inyecciones de IgG humana en 1 mg/ml para bloquear sitios de unión libres de Fc anti-humano. Cada uno de los anticuerpos de prueba secundarios se inyectó luego sobre los puntos 1,2 o 4,5 para evaluar el grado de unión al complejo de anticuerpo de pruebas primarias y proteína CDH6. El control de isotipo de IgG humana se utilizó como anticuerpo de control negativo de pruebas primarias y secundarias. Los anticuerpos se ensayaron en paralelo en todos los cuatro flujos de células hasta que se hayan evaluado todas las posibles combinaciones de pares de anticuerpos. La regeneración de todas las superficies del flujo de célula después de cada ciclo de unión de anticuerpo primario y secundario se realizó con la inyección de glicina 10 mM pH 2.0.

[00390] Los resultados se evaluaron utilizando el módulo de mapeo de epítopos en el software de evaluación Biacore® 4000 y se presento como una matriz, con anticuerpos primarios en filas y secundarios en columnas (Figura 2). Unión adicional del anticuerpo de prueba secundario al complejo del anticuerpo de prueba primario y proteína CDH6 se indica por los valores de respuesta positivos. Los pares negativos están marcados y se comparan con el control de isotipo de IgG humana. La matriz se utiliza entonces para mapear que anticuerpos reconocen que epítopos en base a la forma en que se pueden formar pares con otros anticuerpos. Anticuerpo NOV0710 y NOV0712 compiten entre sí lo que indica que reconocen un epítopo de superposición en el antígeno. EL Anticuerpo NOV1127 mostró unión positiva cuando se utilizó como anticuerpo de unión primaria y

secundaria, lo que sugiere que puede unirse a múltiples sitios en CDH6 o que la unión inicial altera la conformación y abre los sitios de unión adicionales. NOV0719, NOV0692, NOV1126 y NOV1132 todos parecen unirse a epítopos distintos en base a este análisis.

Ejemplo 6: Mapeo de epítopos por intercambio de hidrógeno-deuterio/espectrometría de masas

[00391] Intercambio de hidrógeno-deuterio (HDx) en combinación con espectrometría de masas (MS) (Woods et al., J. Cell Biochem. 2001 S37: 89-98)) se utilizó para mapear el sitio de unión de anticuerpos NOV1127, NOV0719, NOV0710 y NOV0712 en el dominio extracelular de larga duración (ECD) de hCDH6 de longitud completa (aa54-615), que incluye los dominios de cadherina (EC) 1 a 5 (Tabla 9). Además, HDx también se realizó en un ECD truncado que consta de EC 1 a 3 utilizando anticuerpos NOV0710 y NOV0712 (Tabla 10). En HDx, los hidrógenos de amida intercambiables de proteínas son sustituidos por deuterio. Este proceso es sensible a la estructura/dinámica de proteínas y la accesibilidad del disolvente y, por tanto, puede reportarse en sitios que experimentan una disminución en la absorción de deuterio tras la unión del ligando. El objetivo de estos experimentos es identificar los epítopos potenciales y entender la dinámica de hCDH6 cuando se une a nuestros anticuerpos terapéuticos. Es importante tener en cuenta que los cambios en la absorción de deuterio son sensibles a ambos eventos de unión directa y alostérica; con el fin de determinar con precisión el epítopo HDx tiene que ser combinado con tecnologías ortogonales (por ejemplo, cristalografía de rayos X).

[00392] Experimentos de HDx/MS automatizados se realizaron utilizando métodos similares a los descritos en la literatura (Chalmers et al., Anal Chem. 2006: 78(4):1005-14). Los experimentos se realizaron en una plataforma Waters HDx/MS®, que incluye un automuestredor LEAP, Sistema nanoACQUITY UPLC, y espectrómetro de masas SYNAPT G2 (Waters Corp, Milford MA). El buffer de deuterio utilizado para etiquetar el esqueleto de la proteína hCDH6(54-615) de longitud completa con deuterio fue D-Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4 + 3 CaCl2 3mM; el porcentaje general de deuterio en la solución fue 89.5%. Para los experimentos de etiquetado de deuterio hCDH6(54-615) en la ausencia del anticuerpo hCDH6, se diluyó 600 pmol de hCDH6 (54-615), volumen de 5 µl, utilizando 45 µl del buffer de deuterio en un tubo frio e incubado durante 25 minutos en

una cintrifuga a 4° C. Luego, la reacción de etiquetado se inactivó con 75 µl de buffer de inactivación frio en hielo durante tres minutos, seguido por la inyección en el sistema de LC-MS para la digestión automatizada de pepsina y el análisis peptídico. Para los experimentos de etiquetado de deuterio hCDH6(54-615) en la presencia de anticuerpo hCDH6 unido, 600 pmol del anticuerpo hCDH6 se inmovilizó primero en esferas Thermo de Proteína G Plus y se entrucruzó utilizando disuccinimidilsuberato (DSS). Para realizar los experimentos de etiquetado, las esferas de anticuerpo (que contienen 600 pmol de anticuerpo) se incubaron con 600 pmol de hCDH6(54-615) durante 30 minutos a 4° C. Después de 30 minutos las esferas se lavaron con 200 µl de buffer Tris (Tris 50mM, NaCl 150 mM pH 7.4 + CaCl2 3 mM). Luego, se agregaron 200 µl de buffer de deuterio frío (deuterio al 80,6%) y el complejo se incubó durante 25 minutos a 4° C. Después de 25 minutos, la reacción de etiquetado se inactivó con 125 µl de buffer frío refrigerados en hielo durante 2.5 minutos. Después de centrifugar la muestra durante 30 segundos en una centrífuga, la solución inactivada se inyectó en el sistema LC-MS para la digestión de pepsina automatizada y el análisis de péptidos. Experimentos similares también se realizaron en un constructo hCDH6 (267-615) que contiene sólo EC 3 a 5. En estos experimentos, el buffer era 25 mM HEPES pH = 7.4, NaCl 150 mM, CaCl2 3 mM y una versión de deuterio del buffer que contiene deuterio al 94.2%.

[00393] Todas las mediciones se llevaron a cabo utilizando un mínimo de tres triplicados analíticos. Todos los experimentos de intercambio de deuterio se inactivaron utilizando 0,5 M de TCEP y 3 M de urea (pH = 2,5). Después de la inactivación, el antígeno intercambiado se sometió a digestión con pepsina en línea utilizando una columna de Pepsina inmovilizada con Poroszima® (2,1 x 30 mm) a 12° C seguido por la captura en una columna de captura de Waters Vanguard® (Waters Corp. Milford MA) HSS T3. Los péptidos se eluyeron a partir de la columna de retención y se separaron en una columna Waters CSH C18 1 x 100 mm (mantenida a 1° C) a una tasa de flujo de 40 µl/min utilizando un gradiente binario de ocho minutos de 2 a 35% de B (la fase móvil A era 99,9% de agua y 0,1% de ácido fórmico; la fase móvil B era 99,9% de acetonitrilo y 0,1% de ácido fórmico).

[00394] Para la proteína hCDH6 (54-615) se controló 73% de la secuencia mediante los experimentos de intercambio de deuterio; una lista completa de estos péptidos aparece en la Tabla 9. La Figura 3 proporciona un resumen de las

características de intercambio de la proteína hCDH6 (54-615). Las regiones que tienen una mayor recaptación en deuterio, tales como EC3, están bien sea más expuestas al disolvente o tienen una red de enlaces de hidrógeno más débiles que presentan menos recaptación de deuterio, tales regiones como EC4 y EC5. En general, se observa que EC1 a través de los dominios EC3 tiene un mayor intercambio de deuterio que los dominios EC4 o EC5 Por ejemplo, el péptido EC2 181-199 VTATDADDPTYGNSAKVVY (SEQ ID NO: 336) se refiere a que la recaptación de deuterio es 3,61 Da; en contraste el péptido EC5 506-525 IQTLHAVDKDDPYSGHQFSF (SEQ ID NO: 337) se refiere a que la recaptación de deuterio es solamente 1,18 Da. La recaptación limitada de deuterio puede hacer la determinación de las regiones de protección, aquellas que tengan un cambio de -0.5Da o menos una vez se dé la unión al anticuerpo, más desafiante debido a limitaciones en el rango dinámico.

[00395] Para EC1 (54 a 159) los únicos péptidos que exhiben una disminución en la recaptación de deuterio tras la unión de todos los cuatro anticuerpos es 61-70 FLLEEYTGSD (SEQ ID NO: 338). En EC1 los anticuerpos NOV1127 y NOV0719 demuestran desestabilización significante en la estructura con cambios en la recaptación de deuterio mayores o iguales a 0,5 Da. La unión de NOV0710 y NOV0712 no altera significativamente el comportamiento de intercambio de deuterio del antígeno en el dominio EC1.

[00396] Para EC2 (160 a 268) la región 195-202 AKVVYSIL (SEQ ID NO: 339) tiene una disminución en el límite de la recaptación de deuterio por todos los anticuerpos De manera interesante, la región 203-221 QGQPYFSVESETGIIKTAL (SEQ ID NO: 340) se desestabiliza sustancialmente (es decir, se somete a un aumento en la recaptación de deuterio) mediante NOV0719 y un poco menos mediante NOV0712. Ni NOV1127 ni NOV0710 desestabilizan esta región con un cambio en la incorporación de deuterio de +0,5 Da o mayor. Por último, la región de 225-237 DRENREQYQVVIQ (SEQ ID NO: 341) solamente se desestabiliza tras la unión de NOV0719 al antígeno hCDH6.

[00397] Para EC3 (269-383) la región 275-302 FKTPESSPPGTPIGRIKASDADVGENAE (SEQ ID NO: 342) se desestabiliza mediante NOV0719. La región 303-315 IEYSITDGEGLDM (SEQ ID NO: 343) presenta una disminución en la recaptación de deuterio por todos los anticuerpos, pero la disminución

es más marcada por NOV0710 y NOV0712 con relación a los otros dos anticuerpos. La región 316-330 FDVITDQETQEGIIT (SEQ ID NO: 344) presenta una disminución en la recaptación de deuterio para todos los anticuerpos, pero la disminución es menor por NOV0719. En contraste, la región 331-336 VKKLLD (SEQ ID NO: 345) se desestabiliza por NOV0719 y en menor medida por NOV0712. La región 337-358 FEKKKVYTLKVEASNPYVEPRF (SEQ ID NO: 346) presenta una disminución en la recaptación de deuterio con todos los anticuerpos, excepto NOV0719; en contraste NOV0719 es el único anticuerpo que desestabiliza la región 337-345 FEKKKVYTL (SEQ ID NO: 347). Por último, se observó que NOV0719 también desestabiliza la región 370-376 VRIVVED (SEQ ID NO: 348).

[00398] Para EC4 (384-486) y EC5 (487-608) el intercambio de deuterio del antígeno (Figura 3) fue en general inferior al detectar las disminuciones en la recaptación de deuterio desafiante. Para EC4 la región 407-427 AQDPDAARNPVKYSVDRHTDM (SEQ ID NO: 349) presenta una disminución en el límite en la recaptación de deuterio con NOV0710. No hay otras regiones en EC4 que disminuyan en la recaptación de deuterio tras la unión con cualquiera de los cuatro anticuerpos. En general, estas observaciones sugieren fuertemente que EC4 no está involucrado en el epítopo. En contraste, 459-488 IATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEF (SEC ID Nº: 350) exhibe diversos grados de desestabilización con NOV0719, NOV1127, NOV0712 y NOV0710 (enumerados en orden decreciente de desestabilización).

[00399] Para EC5 sólo la región 564-586 YLLPVVISDNDYPVQSSTGTVTV (SEQ ID NO: 351) exhibe una disminución en el limite en la recaptación de deuterio cuando hCDH6 se acompleja ya sea con NOV0710 o NOV0712. Cabe señalar que de los cinco dominios extracelulares sólo EC5 no presenta ninguna región de desestabilización cuando hCDH6 interactúa con cualquiera de los cuatro anticuerpos estudiados.

[00400] Los experimentos HDx también se realizaron en el constructo hCDH6 que consiste en solamente EC3-EC5, hCDH6 (267-615). En estos experimentos se estudiaron los anticuerpos NOV0710 y NOV0712. Este constructo es el mismo constructo que se utilizó en los experimentos de cristalografía. La cobertura de secuencia en estos experimentos fue 86%. La Tabla 10 proporciona una lista completa de todos los péptidos.

[00401] Con este constructo, en EC3 se observa una disminución en la recaptación de deuterio en la región 295-315 ADVGENAE IEYSITDGEGLDM (SEQ ID NO: 352), tanto para NOV0710 como para NOV0712; este es un comportamiento muy similar al antígeno de longitud completa donde la región 303-315 IEYSITDGEGLDM (SEQ ID NO: 343) presenta una disminución en la recaptación de deuterio por todos los anticuerpos, pero más aún por NOV0712 y NOV0710. Curiosamente, hay regiones en EC3 que exhiben un comportamiento diferencial entre los dos constructos. Por ejemplo, en la hCDH6 (54-615) NOV0719 causó una desestabilización significante en muchas regiones, mientras que los otros anticuerpos no lo hicieron. En contraste, con la proteína hCDH6 (267-615) tanto NOV0710 como NOV0712 también exhiben desestabilización significante en regiones que son muy similares a las regiones observadas para ser desestabilizadas por NOV0719 en la proteína hCDH6 (54-615) de longitud completa.

[00402] En EC4 se observa una tendencia similar para desestabilización. En la hCDH6 (54-615) NOV0719 causó la desestabilización más significante en el lado C-terminal de este dominio y NOV0710 y NOV0712 tuvieron poco efecto. En contraste, cuando se utiliza el constructo hCDH6 (267-615) tanto NOV0710 como NOV712 desestabilizan significativamente el lado C-terminal de EC4. Los orígenes de las diferencias en el comportamiento de desestabilización no se conocen bien. Es importante señalar que en el dominio EC4 ni el constructo tenía disminución sustancial en la recaptación de deuterio con NOV0710 o NOV0712 lo que sugiere que esta región no está involucrada en la unión de NOV0710 o NOV0712.

[00403] En EC5 se observó el comportamiento de intercambio de deuterio más consistente entre los constructos hCDH6 (54-615) y hCDH6 (267-615). Ni los constructos mostraron desestabilización significante con NOV0712 o NOV0710. Por otra parte, la disminución ligera y a menudo insignificante en la recaptación de deuterio (no menos de -0,5 Da) con la hCD6 (54 a 615) se hace más marcada en hCDH6 (267-615). En el EC5 de las regiones de hCDH6 (267-615) que exhiben la disminución más significante en la recaptación de deuterio tras la unión de ya sea NOV0710 o NOV0712 se incluyen las regiones 492-505 YETFVCEKAKADQL (SEQ ID NO: 353), 551-563 TRKNGYNRHEMST (SEQ ID NO: 354), y 572-586 DNDYPVQSSTGTVTV (SEQ ID NO: 355). La protección sustancial de 572-586 DNDYPVQSSTGTVTV (SEC ID Nº: 355) está en excelente acuerdo con los datos del epítopo de la cristalografía de rayos X para ambos NOV0710 y

NOV0712. Los aminoácidos N573, D574, y Y575 exhiben una gran área de superficie accesible y tras la formación de un complejo con cualquiera de los tres anticuerpos están sustancialmente descartados. V577 también se descartó en ambas estructuras lo que indica mayor acuerdo. Los datos de cristalografía no indican que 492-505 YETFVCEKAKADQL (SEQ ID NO: 353) está descartado por lo que esta protección parece ser alostérica en la naturaleza, pero la protección de 551-563 TRKNGYNRHEMST (SEQ ID NO: 354) parece ser de importancia especialmente en el complejo NOV0712 donde R552 está sustancialmente descartado.

[00404] Por último, es importante tener en cuenta que existen otras regiones en el dominio EC5 que exhiben una disminución significante (-0,5 Da o menos) en la recaptación de deuterio tras la formación de complejos con cualquiera de los dos anticuerpos. Para NOV0710 estas regiones incluyen 510-525 YETFVCEKAKADQLHAVDKDDPYSGHQFSF (SEQ ID NO: 356), 542-550 NKDNTAGIL (SEQ ID NO: 357), y 591-604 CDHHGNMQSCHAEA (SEQ ID NO: 358). Para NOV0712 estas regiones incluyen 512-522 VDKDDPYSGHQ (SEQ ID NO: 359), 542 -550 NKDNTAGIL (SEQ ID NO: 357), y 591-604 CDHHGNMQSCHAEA (SEQ ID NO: 358).

[00405] En general, los datos HDx sugieren que la unión de CDH6 por los anticuerpos de unión a CDH6 identificados resulta en varias regiones de la proteína CDH6 que son cada vez más propensas al intercambio de deuterio, probablemente reflejando los cambios conformacionales inducidos por la unión de los anticuerpos CDH6. Las regiones identificadas como protegidas del intercambio de deuterio en la presencia de anticuerpos CDH6 son consistentes con los datos de cristalografía de rayos x para NOV0710 y NOV0712 y forman parte del epítopo de estos anticuerpos.

Tabla 9

Efecto de NOV1127, NOV0719, NOV0710, y NOV0712 sobre hCDH6 (54-615) que contiene los dominios 1-5 de cadherina.

Nombre del Péptido	Secuencia	Cambio en la incorporación de deuterio (Daltons)			
		NOV	NOV	NOV	NOV

		1127	**0719**	**0710**	**0712**
61-70	FLLEEYTGSD (SEQ ID NO:338)	-1.1	-1.2	-1.1	-1.3
63-70	LEEYTGSD (SEQ ID NO:360)	-0.1	-0.3	-0.4	-0.2
71-77	YQYVGKL (SEQ ID NO:361)	0.2	0.2	-0.1	0.1
71-88	YQYVGKLHSDQDRGDGSL (SEQ ID NO:362)	0.2	0.2	-0.1	0.1
71-100	YQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDL (SEQ ID NO:363)	1.0	0.9	-0.1	0.2
90-100	YILSGDGAGDL (SEQ ID NO:364)	0	0	0	0.1
101-112	FIINENTGDIQA (SEQ ID NO:365)	0.4	0.4	0.1	0.3
101-124	FIINENTGDIQATKRLDREEKPVY (SEQ ID NO:366)	0.4	0.6	-0.3	0
101-126	FIINENTGDIQATKRLDREEKPVYIL (SEQ ID NO:367)	0.6	0.7	-0.2	0
101-128	FIINENTGDIQATKRLDREEKPVYILRA (SEQ ID NO:368)	1.1	1.1	-0.2	0.2
102-124	IINENTGDIQATKRLDREEKPVY (SEQ ID NO:369)	0.4	0.5	-0.3	0.1
106-124	NTGDIQATKRLDREEKPVY (SEQ ID NO:370)	0.1	0.3	-0.4	0

106-126	NTGDIQATKRLDREEKPVYIL (SEQ ID NO:371)	0.6	0.6	-0.2	0
113-124	TKRLDREEKPVY (SEQ ID NO:372)	0.1	0.1	-0.2	-0.1
125-144	ILRAQAINRRTGRPVEPESE (SEQ ID NO:373)	0.3	0.4	-0.2	0.1
125-145	ILRAQAINRRTGRPVEPESEF (SEQ ID NO:374)	0.7	0.9	0	0.3
127-144	RAQAINRRTGRPVEPESE (SEQ ID NO:375)	0.3	0.4	-0.3	-0.1
127-145	RAQAINRRTGRPVEPESEF (SEC ID NO:376	0.3	0.4	0	0.2
129-144	QAINRRTGRPVEPESE (SEQ ID NO:377)	0.1	0.2	-0.3	-0.2
129-145	QAINRRTGRPVEPESEF (SEQ ID NO:378)	0.2	0.3	-0.1	0.1
145-159	FIIKIHDINDNEPIF (SEQ ID NO:379)	0.9	0.9	0.4	0.5
145-162	FIIKIHDINDNEPIFTKE (SEQ ID NO:380)	0.7	0.7	0	0.2
146-159	IIKIHDINDNEPIF (SEQ ID NO:381)	0.5	0.6	0.2	0.3
146-160	IIKIHDINDNEPIFT (SEQ ID NO:382)	0.4	0.1	0.1	0.2

146-162	IIKIHDINDNEPIFTK (SEQ ID NO:383)	0.3	0.3	0	0.1
160-176	TKEVYTATVPEMSDVGT (SEQ ID NO:384)	-0.4	0.5	-0.3	-0.2
160-177	TKEVYTATVPEMSDVGTF (SEQ ID NO:385)	-0.5	0.3	-0.6	-0.4
163-171	VYTATVPEMSDVGTF (SEQ ID NO:386)	-0.1	0.6	0.2	0.2
177-184	FVVQVTAT (SEQ ID NO:387)	0.4	0.8	0.2	0.6
178-184	VVQVTAT (SEQ ID NO:388)	0.3	0.5	0.2	0.3
178-194	VVQVTATDADDPTYGNS (SEQ ID NO:389)	-0.1	0	-0.2	-0.1
178-199	VVQVTATDADDPTYGNSAKVVY (SEQ ID NO:390)	-0.6	-0.1	-0.8	-0.5
181-199	VTATDADDPTYGNSAKVVY (SEQ ID NO:336)	-0.7	-0.3	-0.9	-0.6
185-199	DADDPTYGNSAKVVY (SEQ ID NO:391)	-0.3	-0.5	-0.4	-0.4
200-208	SILQGQPYF (SEQ ID NO:392)	-0.3	-0.1	-0.3	-0.3
203-211	QGQPYFSVE (SEQ ID NO:393)	-0.1	0.5	0	0.1

203-221	QGQPYFSVESETGIIKTAL (SEQ ID NO:340)	0.1	2.6	0.4	1.1
209-211	SVESETGIIKTAL (SEQ ID NO:394)	-0.1	2.1	0.3	0.8
212-221	SETGIIKTAL (SEQ ID NO:395)	0	1.9	0.4	0.8
214-222	TGIIKTALL (SEQ ID NO:396)	0,1	0.8	-0.1	0
222-232	LNMDRENREQY (SEQ ID NO:397)	-0.1	0	-0.1	-0.1
222-233	LNMDRENREQYQ (SEQ ID NO:398)	-0.2	0.1	-0.2	-0.1
225-233	DRENREQYQ (SEQ ID NO:399)	-0.4	-0.3	-0.4	-0.4
225-237	DRENREQYQVVIQ (SEQ ID NO:341)	-0.4	1.1	-0.1	0.2
275-294	FKTPESSPPGTPIGRIKASD (SEQ ID NO:400)	0.1	1.0	-0.1	0.2
275-300	FKTPESSPPGTPIGRIKASDADVGEN (SEQ ID NO:401)	0.1	1.3	0	0.3
275-302	FKTPESSPPGTPIGRIKASDADVGENAE (SEQ ID NO:342)	0.1	1.4	0	0.3
303-315	IEYSITDGEGLDM (SEQ ID NO:343)	-0.9	-1.1	-1.3	-1.3

305-315	YSITDGEGLDM (SEQ ID NO:402)	-0.6	-0.7	-0.8	-0.8
306-315	SITDGEGLDM (SEQ ID NO:403)	-0.2	-0.1	-0.2	-0.1
316-326	FDVITDQETQE (SEQ ID NO:404)	-1.0	-0.6	-0.9	-0.8
316-330	FDVITDQETQEGIIT (SEQ ID NO:344)	-1.2	-0.7	-1.4	-1.5
316-336	FDVITDQETQEGIITVKKLLD (SEQ ID NO:405)	-0.6	2.2	-0.8	-0.2
316-337	FDVITDQETQEGIITVKKLLDF (SEQ ID NO:406)	-0.6	2.3	-0.8	-0.2
316-345	FDVITDQETQEGIITVKKLLDFEKKKVYTL (SEQ ID NO:407)	-0.2	3.3	-1.1	-0.5
317-336	DVITDQETQEGIITVKKLLD (SEQ ID NO:408)	-0.2	2.2	-0.1	0.6
317-337	DVITDQETQEGIITVKKLLDF (SEQ ID NO:409)	-0.2	2.3	-0.1	0.6
318-337	VITDQETQEGIITVKKLLDF (SEQ ID NO:410)	-0.2	2.3	-0.3	0.3
327-336	GIITVKKLLD (SEQ ID NO:411)	0.1	0.9	-0.1	0.1
327-337	GIITVKKLLDF (SEQ ID NO:412)	0.3	1.1	-0.1	0.1

331-358	VKKLLDFEKKKVYTLKVEASNPYVEPRF (SEQ ID NO:413)	-0.4	1.3	-1.0	-0.7
337-358	FEKKKVYTLKVEASNPYVEPRF (SEQ ID NO:346)	-0.9	0.5	-1.1	-0.9
338-345	EKKKVYTL (SEQ ID NO:414)	-0.1	-0.6	-0.2	-0.2
346-358	KVEASNPYVEPRF (SEQ ID NO:415)	-0.7	-0.4	-0.5	-0.4
370-376	VRIVVED (SEQ ID NO:348)	0.3	1.6	0	0.2
370-386	VRIVVEDVDEPPVFSKL (SEQ ID NO:416)	0.3	1.6	0.1	0.4
376-383	DVDEPPVF (SEQ ID NO:417)	0.2	0.3	0.1	0.1
376-386	DVDEPPVFSKL (SEQ ID NO:418)	-0.1	0	-0.2	-0.2
377-383	VDEPPVF (SEQ ID NO:419)	0.3	0.6	0	0.1
377-386	VDEPPVFSKL (SEQ ID NO:420)	-0.2	-0.1	-0.4	-0.3
407-427	AQDPDAARNPVKYSVDRHTDM (SEQ ID NO:349)	-0.3	-0.3	-0.6	-0.4
413-427	ARNPVKYSVDRHTDM (SEQ ID NO:421)	-0.2	-0.2	-0.4	-0.4

420-427	SVDRHTDM (SEQ ID NO:422)	-0.1	-0.2	-0.1	-0.1
428-441	DRIFNIDSGNGSIF (SEQ ID NO:423)	1.0	0.1	-0.3	-0.3
442-451	TSKLLDRETL (SEQ ID NO:424)	0	-0.2	-0.1	-0.1
446-452	LDRETLL (SEQ ID NO:425)	-0,2	-0.2	-0.2	-0.2
459-475	IATEINNPKQSSRVPLY (SEQ ID NO:426)	0.6	1.0	0.2	0.4
461-474	TEINNPKQSSRVPL (SEQ ID NO:427)	0.3	0.6	0.1	0.2
461-475	TEINNPKQSSRVPLY (SEQ ID NO:428)	0.6	0.9	0.2	0.4
462-474	EINNPKQSSRVPL (SEQ ID NO:429)	0.2	0.3	-0.1	0.1
462-475	EINNPKQSSRVPLY (SEQ ID NO:430)	0.6	0.9	0.3	0.5
462-488	EINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEF (SEQ ID NO:431)	1.4	2.2	0.7	1.0
463-475	INNPKQSSRVPLY (SEQ ID NO:432)	0.6	0.8	0.2	0.4
475-488	YIKVLDVNDNAPEF (SEQ ID NO:433)	0.5	0.8	0.3	0.4

476-488	IKVLDVNDNAPEF (SEQ ID NO:434)	0.5	0.7	0.2	0.4
496-505	VCEKAKADQL (SEQ ID NO:435)	-0.4	-0.4	-0.6	-0.6
506-522	IQTLHAVDKDDPYSGHQ (SEQ ID NO:436)	0.1	0	-0.1	0
506-525	IQTLHAVDKDDPYSGHQFSF (SEQ ID NO:337)	0.2	0.2	-0.1	-0.1
510-522	HAVDKDDPYSGHQ (SEQ ID NO:437)	-0.2	-0.4	-0.3	-0.3
510-524	HAVDKDDPYSGHQFS (SEQ ID NO:438)	-0.3	-0.5	-0.3	-0.3
510-525	HAVDKDDPYSGHQFSF (SEQ ID NO:356)	-0.2	-0.2	-0.3	-0.3
512-522	VDKDDPYSGHQ (SEQ ID NO:359)	-0.2	-0.4	-0.3	-0.4
512-525	VDKDDPYSGHQFSF (SEQ ID NO:439)	-0.1	-0.1	-0.3	-0.3
551-563	TRKNGYNRHEMST (SEQ ID NO:354)	-0.2	-0.1	-0.4	-0.4
587-602	RVCACDHHGNMQSCHA (SEQ ID NO:440)	-0.1	-0.3	-0.3	-0.4
591-602	CDHHGNMQSCHA (SEQ ID NO:441)	-0.2	-0.6	-0.4	-0.6

Tabla 10

Efecto de NOV0710 y NOV0712 sobre los dominios 3-5 de hCDH6 (267-615) que contienen cadherina.

Nombre del Péptido	Secuencia	Cambio en la incorporación de deuterio (Daltons)	
		NOV0710	NOV0712
274-283	QFKTPESSPP (SEQ ID NO:442)	-0.4	-0.3
275-294	FKTPESSPPGTPIGRIKASD (SEQ ID NO:443)	0.3	0.3
275-294	FKTPESSPPGTPIGRIKASD (SEQ ID NO:444)	0.3	0.4
282-294	PPGTPIGRIKASD (SEQ ID NO:445)	0.2	0.1
295-302	ADVGENAE (SEQ ID NO:446)	-0.9	-0.9
303-312	IEYSITDGEG (SEQ ID NO:447)	-0.7	-0.6
303-315	IEYSITDGEGLDM (SEQ ID NO:343)	-1.1	-1.1
306-312	SITDGEG (SEQ ID NO:448)	-0.6	-0.5
308-315	TDGEGLDM (SEQ ID NO:449)	-0.7	-0.8
316-323	FDVITDQE (SEQ ID NO:450)	0.1	0.1
316-326	FDVITDQETQE (SEQ ID NO:451)	-0.2	-0.3

316-336	FDVITDQETQEGIITVKKLLD (SEQ ID NO:452)	2.2	2.0
316-337	FDVITDQETQEGIITVKKLLDF (SEQ ID NO:453)	2.5	2.2
317-330	DVITDQETQEGIIT (SEQ ID NO:454)	-0.8	-0.8
317-336	DVITDQETQEGIITVKKLLD (SEQ ID NO:455)	2.0	1.8
318-336	VITDQETQEGIITVKKLLD (SEQ ID NO:456)	2.0	1.8
320-326	TDQETQE (SEQ ID NO:457)	-0.6	-0.6
321-336	DQETQEGIITVKKLLD (SEQ ID NO:458)	2.3	2.1
321-337	DQETQEGIITVKKLLDF (SEQ ID NO:459)	2.5	2.3
323-336	ETQEGIITVKKLLD (SEQ ID NO:460)	2.1	1.9
324-336	TQEGIITVKKLLD (SEQ ID NO:461)	1.8	1.8
327-336	GIITVKKLLD (SEQ ID NO:462)	1.3	1.2
327-337	GIITVKKLLDF (SEQ ID NO:463)	1.5	1.4
328-337	IITVKKLLDF (SEQ ID NO:464)	1.4	1.3
329-336	ITVKKLLD (SEQ ID NO:465)	1.1	1.0

329-337	ITVKKLLDF (SEQ ID NO:466)	1.3	1.2
330-336	TVKKLLD (SEQ ID NO:467)	1.1	0.9
330-337	TVKKLLDF (SEQ ID NO:468)	1.3	1.0
331-337	VKKLLDF (SEQ ID NO:469)	0.5	0.5
337-344	FEKKKVYT (SEQ ID NO:470)	-0.2	-0.1
337-345	FEKKKVYTL (SEQ ID NO:347)	0.5	0.6
338-345	EKKKVYTL (SEQ ID NO:471)	0.3	0.3
346-358	KVEASNPYVEPRF (SEQ ID NO:472)	-0.7	-0.4
348-358	EASNPYVEPRF (SEQ ID NO:473)	-0.9	-0.6
359-369	LYLGPFKDSAT (SEQ ID NO:474)	-0.5	-0.3
359-370	LYLGPFKDSATV (SEQ ID NO:475)	-0.2	-0.1
361-369	LGPFKDSAT (SEQ ID NO:476)	-0.4	-0.2
370-383	VRIVVEDVDEPPVF (SEQ ID NO:477)	1.8	1.7
370-386	VRIVVEDVDEPPVFSKL (SEQ ID NO:478)	2.0	1.9
373-383	VVEDVDEPPVF (SEQ ID NO:479)	0.5	0.5
376-383	DVDEPPVF (SEQ ID NO:480)	0.4	0.4

376-386	DVDEPPVFSKL (SEQ ID NO:481)	-0.1	0.0
376-388	DVDEPPVFSKLAY (SEQ ID NO:482)	-0.3	-0.1
377-383	VDEPPVF (SEQ ID NO:483)	0.4	0.4
377-386	VDEPPVFSKL (SEQ ID NO:484)	-0.2	-0.1
407-419	AQDPDAARNPVKY (SEQ ID NO:485)	-0.1	0.1
407-427	AQDPDAARNPVKYSVDRHTDM (SEQ ID NO:349)	-0.2	-0.1
413-427	ARNPVKYSVDRHTDM (SEQ ID NO:486)	0.1	0
421-427	VDRHTDM (SEQ ID NO:487)	-0.2	-0.3
428-441	DRIFNIDSGNGSIF (SEQ ID NO:488)	0.1	0.2
442-451	TSKLLDRETL (SEQ ID NO:489)	0	0
446-452	LDRETLL (SEQ ID NO:490)	-0.3	-0.1
459-474	IATEINNPKQSSRVPL (SEQ ID NO:491)	1.0	1.1
459-475	IATEINNPKQSSRVPLY (SEQ ID NO:492)	1.2	1.4
461-475	TEINNPKQSSRVPLY (SEQ ID NO:493)	1.0	1.0
461-478	TEINNPKQSSRVPLYIKV (SEQ ID NO:494)	2.5	2.6
462-474	EINNPKQSSRVPL (SEQ ID NO:495)	0.7	0.8

462-475	EINNPKQSSRVPLY (SEQ ID NO:496)	1.1	1.2
463-475	INNPKQSSRVPLY (SEQ ID NO:497)	1.2	1.2
464-474	NNPKQSSRVPL (SEQ ID NO:498)	1.7	1.7
464-476	NNPKQSSRVPLYI (SEQ ID NO:499)	1.2	1.2
475-488	YIKVLDVNDNAPEF (SEQ ID NO:500)	1.1	1.3
476-483	IKVLDVND (SEQ ID NO:501)	1.1	1.1
476-488	IKVLDVNDNAPEF (SEQ ID NO:502)	0.8	1.0
477-488	KVLDVNDNAPEF (SEQ ID NO:503)	0.4	0.4
479-488	LDVNDNAPEF (SEQ ID NO:504)	-0.1	0.1
492-505	YETFVCEKAKADQL (SEQ ID NO:353)	-1.1	-1.1
495-505	FVCEKAKADQL (SEQ ID NO:505)	-0.7	-0.6
496-505	VCEKAKADQL (SEQ ID NO:506)	-0.8	-0.7
499-505	KAKADQL (SEQ ID NO:507)	-0.7	-0.7
506-513	IQTLHAVD (SEQ ID NO:508)	0.3	0.4
506-522	IQTLHAVDKDDPYSGHQ (SEQ ID NO:509)	0	0.1
506-524	IQTLHAVDKDDPYSGHQFS (SEQ ID NO:510)	0.1	0.1

506-525	IQTLHAVDKDDPYSGHQFSF (SEQ ID NO:511)	-0.1	0
510-522	HAVDKDDPYSGHQ (SEQ ID NO:512)	-0.4	-0.3
510-524	HAVDKDDPYSGHQFS (SEQ ID NO:513)	-0.3	-0.2
510-525	HAVDKDDPYSGHQFSF (SEQ ID NO:356)	-0.5	-0.4
512-522	VDKDDPYSGHQ (SEQ ID NO:359)	-0.6	-0.6
512-525	VDKDDPYSGHQFSF (SEQ ID NO:514)	-0.5	-0.4
542-550	NKDNTAGIL (SEQ ID NO:357)	-0.5	-0.6
549-563	ILTRKNGYNRHEMST (SEQ ID NO:515)	-0.5	-0.4
551-563	TRKNGYNRHEMST (SEQ ID NO:354)	-0.6	-0.5
552-563	RKNGYNRHEMST (SEQ ID NO:516)	-0.7	-0.8
564-571	YLLPVVIS (SEQ ID NO:517)	-0.1	0.1
564-575	YLLPVVISDNDY (SEQ ID NO:518)	-0.5	-0.4
564-578	YLLPVVISDNDYPVQ (SEQ ID NO:519)	-1.0	-1.0
567-586	PVVISDNDYPVQSSTGTVTV (SEQ ID NO:520)	-1.5	-0.8
587-600	RVCACDHHGNMQSC (SEQ ID NO:521)	-0.5	-0.5
587-602	RVCACDHHGNMQSCHA (SEQ ID NO:522)	-0.3	-0.3

591-600	CDHHGNMQSC (SEQ ID NO:523)	-0.7	-0.7
591-602	CDHHGNMQSCHA (SEQ ID NO:524)	-0.4	-0.4
591-604	CDHHGNMQSCHAEA (SEQ ID NO:358)	-0.6	-0.8
592-602	DHHGNMQSCHA (SEQ ID NO:525)	-0.6	-0.6
605-618	LIHPTGLSTGAGSE (SEQ ID NO:526)	-0.5	-0.4
619-625	FRHDSGL (SEQ ID NO:527)	-0.3	-0.2
619-627	FRHDSGLND (SEQ ID NO:528)	-0.4	-0.4
630-637	EAQKIEWH (SEQ ID NO:529)	-0.6	-0.5
630-638	EAQKIEWHE (SEQ ID NO:530)	-0.8	-0.7

Ejemplo 7: Mapeo de epítopos por cristalografía de rayos x

[00406] Se determinaron las estructuras cristalinas de un fragmento CDH6 humano (dominio 5 extracelular, o EC5, SEQ ID NO: 443, Tabla 11) unidas al fragmento Fab de NOV0712 o NOV0710 (SEQ ID NO: 444-447, Tabla 12 y 13). Como se detalla a continuación, EC5 CDH6 es co-expresada con Fab de NOV0712 o NOV0710 en células de mamífero para producir un complejo purificado. Luego se utilizó la cristalografía de proteínas para generar datos de resolución atómica para CDH6 EC5 unida al Fab de NOV712 o NOV710 para definir los epítopos.

Producción de proteínas para el mapeo de epítopos

[00407] Las secuencias de CDH6 EC5, Fab NOV0712 y Fab NOV0710 producidas para la cristalografía se muestran en la Tabla 9 a continuación. El constructo CDH6 EC5 comprende los residuos 490 a 608 mostrados de forma subrayada en el contexto de

CDH6 humana (identificador UniProt, SEQ ID NO: 533, Tabla 11), y mostrados a continuación en la Tabla 11 como SEQ ID NO: 534. La secuencia de señal de extremo N-terminal de cadena ligera de IgG kappa de ratón se utilizó para la expresión secretada de CDH6 EC5 y se escindió durante la expresión, dejando intacto el extremo N-terminal de CDH6 EC5. El extremo C-terminal de CDH6 EC5 se fusionó con una etiqueta de purificación derivada de β amiloide (etiqueta APP, aminoácidos: EFRHDS (SEQ ID NO: 531)), precedida por un sitio de reconocimiento de proteasad PreScission® (GE Healthcare, Piscataway, NJ) (aminoácidos: LEVLFQGP (SEQ ID NO: 532)) para facilitar la escisión y eliminación de la etiqueta después de la purificación. Para los Fab de NOV0712 y NOV0710, se muestran las secuencias de cadenas pesadas y ligeras (SEQ ID NO: 535-538).

Tabla 11

Proteínas utilizadas para estudios de biología estructural

Constructo	Secuencia de aminoácidos en código de una letra	SEC ID NO:
CDH6 Humano (P55285)	MRTYRYFLLLFWVGQPYPTLSTPLSKRTSGFPAKKRALEL SGNSKNELNRSKRSWMWNQFFLLEEYTGSDYQYVGKLH SDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATKRLDR EEKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTK EVYTATVPEMSDVGTFVVQVTATDADDPTYGNSAKVVYS ILQGQPYFSVESETGIIKTALLNMDRENREQYQVVIQAKD MGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPE SSPPGTPIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVIT DQETQEGIITVKKLLDFEKKKVYTLKVEASNPYVEPRFLYL GPFKDSATVRIVVEDVDEPPVFSKLAYILQIREDAQINTTIG SVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTS KLLDRETLLWHNITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDN APEFAEFYETFVCEKAKADQLIQTLHAVDKDDPYSGHQFS FSLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTY LLPVVISDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSCHAE ALIHPTGLSTGALVAILLCIVILLVTVVLFAALRRQRKKEPLII	(SEC ID NO:533)

	SKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDIGTLRNPEAIEDNK LRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRLKENDTDP TAPPYDSLATYAYEGTGSVADSLSSLESVTTDADQDYDY LSDWGPRFKKLADMYGGVDSDKDS	
Constructo CDH6 EC5	EFYETFVCEKAKADQLIQTLHAVDKDDPYSGHQFSFSLAP EAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVV ISDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSCHAEALIHP	(SEC ID NO:534)
Cadena pesada NOV712 Fab	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHGMHWVR QAPGKGLEWVSVISGSGSNTGYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQWGSYAFDSWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH	(SEC ID NO:535)
Cadena ligera del Fab NOV0712	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAVSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQSGTFPPTTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	(SEC ID NO:536)
Cadena pesada del Fab NOV0710	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSVIRSSGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGGYFDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH	(SEC ID NO:537)
Cadena ligera del Fab NOV0712	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISLWLNWYQQK PGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQYYTSPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	(SEC ID NO:538)
CDH6-D574A	MRTYRYFLLLFWVGQPYPTLSTPLSKRTSGFPAKKRALEL	(SEQ ID

	SGNSKNELNRSKRSWMWNQFFLLEEYTGSDYQYVGKLH SDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATKRLDR EEKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTK EVYTATVPEMSDVGTFVVQVTATDADDPTYGNSAKVVYS ILQGQPYFSVESETGIIKTALLNMDRENREQYQVVIQAKD MGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPE SSPPGTPIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVIT DQETQEGIITVKKLLDFEKKKVYTLKVEASNPYVEPRFLYL GPFKDSATVRIVVEDVDEPPVFSKLAYILQIREDAQINTTIG SVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTS KLLDRETLLWHNITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDN APEFAEFYETFVCEKAKADQLIQTLHAVDKDDPYSGHQFS FSLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTY LLPVVISDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSCHAE ALIHPTGLSTGALVAILLCIVILLVTVVLFAALRRQRKKEPLII SKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDIGTLRNPEAIEDNK LRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRLKENDTDP TAPPYDSLATYAYEGTGSVADSLSSLESVTTDADQDYDY LSDWGPRFKKLADMYGGVDSDKDS	NO:539
CDH6-Y575A	MRTYRYFLLLFWVGQPYPTLSTPLSKRTSGFPAKKRALEL SGNSKNELNRSKRSWMWNQFFLLEEYTGSDYQYVGKLH SDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATKRLDR EEKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTK EVYTATVPEMSDVGTFVVQVTATDADDPTYGNSAKVVYS ILQGQPYFSVESETGIIKTALLNMDRENREQYQVVIQAKD MGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPE SSPPGTPIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVIT DQETQEGIITVKKLLDFEKKKVYTLKVEASNPYVEPRFLYL GPFKDSATVRIVVEDVDEPPVFSKLAYILQIREDAQINTTIG SVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTS KLLDRETLLWHNITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDN APEFAEFYETFVCEKAKADQLIQTLHAVDKDDPYSGHQFS	(SEC ID NO:540)

	FSLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTY LLPVVISDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSCHAE ALIHPTGLSTGALVAILLCIVILLVTVVLFAALRRQRKKEPLII SKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDIGTLRNPEAIEDNK LRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRLKENDTDP TAPPYDSLATYAYEGTGSVADSLSSLESVTTDADQDYDY LSDWGPRFKKLADMYGGVDSDKDS	
CDH6-N573A	MRTYRYFLLLFWVGQPYPTLSTPLSKRTSGFPAKKRALEL SGNSKNELNRSKRSWMWNQFFLLEEYTGSDYQYVGKLH SDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATKRLDR EEKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTK EVYTATVPEMSDVGTFVVQVTATDADDPTYGNSAKVVYS ILQGQPYFSVESETGIIKTALLNMDRENREQYQVVIQAKD MGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPE SSPPGTPIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVIT DQETQEGIITVKKLLDFEKKKVYTLKVEASNPYVEPRFLYL GPFKDSATVRIVVEDVDEPPVFSKLAYILQIREDAQINTTIG SVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTS KLLDRETLLWHNITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDN APEFAEFYETFVCEKAKADQLIQTLHAVDKDDPYSGHQFS FSLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTY LLPVVISDNDYPVQSSTGTVTVRVCACDHHGNMQSCHAE ALIHPTGLSTGALVAILLCIVILLVTVVLFAALRRQRKKEPLII SKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDIGTLRNPEAIEDNK LRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRLKENDTDP TAPPYDSLATYAYEGTGSVADSLSSLESVTTDADQDYDY LSDWGPRFKKLADMYGGVDSDKDS	(SEQ ID NO:541

[00408] CDH6 EC5 es co-expresada con un Fab NOV0712 o NOV0710 en células Expi293® para producir un complejo para cristalografía. En detalle, 0,5 mg de plásmido que codifica CDH6 EC5 se mezcló con 0,5 mg de plásmido de Fab NOV0712 o NOV0710, diluido en 50 ml de medio OptiMEM I (Life Technologies, Grand Island, NY), y se incubó

con 2,5 mg de PEI (Polysciences, Warrington , PA) en 50 ml del mismo medio durante 30 minutos. Luego, la mezcla se agregó a un 1L de células Expi293® que crecen en suspensión en medio de Expresión Expi293® (Life Technologies Grand Island, NY) a 1 millón de células/ml a 37° C con 8% de CO2 para transfección. Después de 72 horas, el medio que contiene el complejo CDH6 Fab EC5 se recolectó por centrifugación, y se suplementó con CaCl2 a 3 mM. 10 ml de esferas 4B Sepharose® (GE Healthcare Pittsburgh, PA) conjugadas con una IgG de etiqueta anti-APP (generada internamente), se agregaron en el medio y se mantuvieron en agitación a 4° C durante la noche. Al día siguiente, las esferas se empacaron en una columna de gravedad y se lavaron con 25 mM de Hepes pH 7,4 + NaCl (HBS) 150 mM, y CaCl2 3mM. El complejo diana se eluyó con 3 volúmenes de columna (CV) de glicina 100 mM pH 2,5, NaCl 150 mM, CaCl2 3 mM, en 1/10 (v/v) de Tris 1 M pH 8,5. El complejo se incubó con 1/100 (w/w) de proteasa PreScission® de etiqueta GST (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) a 4° C durante la noche para escindir la etiqueta APP. El día siguiente, la proteasa PreScission® se eliminó mediante el pasó de la mezcla a través de una columna HP GSTrap® de 1 ml (GE Healthcare, Pittsburgh, PA). El flujo pasante se incubo posteriormente con 1/10 (w/w) de PNGaseF (purificado en las instalaciones propias) a 37° C durante la noche para eliminar la glicosilación unida a N. Después de la desglicosilación, la mezcla se concentró y se cargó en HiLoad 16/600 Superdex® 200 pg (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) equilibrada en HBS más CaCl2 3 mM. Los picos de las fracciones que contienen al complejo CDH6-Fab purificado fueron analizados mediante SDS-PAGE y LCMS agrupados y concentrados para su cristalización.

Cristalización y determinación de la estructura

[00409] Los complejos CDH6 EC5/NOV0712 y CDH6 EC5/NOV0710 se concentraron a 9,3 mg/ml y 14,7 mg/ml, respectivamente, se centrifugaron a 20.000 g durante 5 min, y se cribaron para cristalización. Los cristales para la recolección de datos se hicieron crecer mediante goteo por difusión de vapor a 20° C. Los cristales del complejo CDH6 EC5/NOV0712 se hicieron crecer mediante la mezcla de 1.2 µl del complejo con 1 µl de la solución del reservorio que contiene PEG3350 al 20% (v/v) y citrato de di-amonio hidrógeno 0.2M, y equilibrando la gota frente a 450 µl de la misma solución del reservorio junto con 50 µl de agua. Los cristales del complejo CDH6 EC5/NOV0710 se cultivaron mediante la mezcla de 0,8 µl del complejo con 1µl de la

solución del reservorio que contiene 0,7 M de citrato de tri-sodio y 0,1 M Tris • HCl pH 8,5, y equiilibrando la gota frente a 425 µl de la misma solución del reservorio más 75 µl de agua. Antes de la recolección de datos, los cristales se transfirieron a 75% de soluciones de reservorio más 25% de glicerol y se enfriaron rápidamente en nitrógeno líquido.

[00410] Los datos de difracción se recogieron en la línea de luz 17-DNI en la Fuente Avanzada de Fotones (Laboratorio Nacional de Argonne, EE.UU.). Los datos se procesan y escalan utilizando Autoproc (Global Phasing, LTD). Los datos de CDH6 EC5/NOV0712 se procesaron a 2,3 Å en el grupo espacial P212121 con dimensiones celulares a = 78,83 Å, b = 88,86 Å, c = 186,73 Å, alfa = 90°, beta = 90°, gamma = 90°. Los datos del complejo CDH6 EC5/NOV071o se procesaron a 3,5 Å en el grupo espacial P43212 con dimensiones celulares a = 101,48 Å, b = 101,48 Å, c = 240,96 Å, alfa = 90°, beta = 90°, gamma = 90°. Las estructuras de los complejos se elucidaron mediante reemplazo molecular usando Phaser (McCoy, (2007) J. Appl. Cryst. 40: 658-674) con las estructuras Fab internas como modelos de búsqueda. La estructura de CDH6 EC5 fue construida desde cero utilizando Buccaneer (K. Cowtan (2006) Acta Cryst. D62: 1002-1011) en el paquete del programa CCP4 (Winn, (2011). Acta. Cryst. D67:235-242). Los modelos finales se construyeron en COOT (Emsley y Cowtan (2004) Acta Cryst. D60:2126-2132) y se refinaron con Buster (Global Phasing, LTD, Cambridge, UK). Para el complejo CDH6 EC5/NOV0712, los valores Rwork y Rfree fueron 21.2% y 25.2%, respectivamente; y los valores de desviación de raíz cuadrada media (rms) de longitudes de enlace y ángulos de enlace son 0.010Å y 1,24°, respectivamente. Para el complejo CDH6 EC5/NOV0710, los valores Rwork y Rfree fueron 18.2% y 24.6%, respectivamente; y los valores de desviación de raíz cuadrada media (rms) de longitudes de enlace y ángulos de enlace son 0.010Å y 1,28°, respectivamente.

[00411] Los residuos de CDH6 EC5 que están en contacto con el Fab NOV0712 o NOV0710, los tipos de interacciones, y las áreas superficiales ocluidas están identificadas por PISA (Krissinel, (2007) J. Mol Biol. 372: 774-97) y están enumeradas en las Tablas 12 y 13. Para las estructuras que contienen más de una copia de complejo en la unidad asimétrica (la unica unidad más pequeña en el cristal), sólo los residuos que hacen contacto con el anticuerpo que son comunes en todas las copias se listan como residuos de epítopo.

Epítopos de NOV0712 y NOV0710 en CDH6

Estructuras generales

[00412] No hay ninguna estructura cristalina reportada de CDH6 EC5 en este momento. El plegamiento general de la EC5 de CDH6 es similar al de la Ec5 de CDH-2 (N-caderina), ambas se componen por una lámina β de tres hebras que está enfrentada a una lámina β de 4 hebras. La superposición de las dos estructuras resulta en una distancia de raíz cuadrada media (RMSD) de 2.4A y la orientación similar de los extremos N- y C-terminal. Por lo tanto una puede superponer la estructura del complejo CDH6 EC5/Fab sobre la estructura ECD de longitud completa de CDH2 con base en la superposición de dominios EC5, con el fin de estimar las orientaciones y Fab de NOV0712 y NOV0710. Como se muestra en la Figura 4, NOV0712 y NOV0710 se unen el mismo lado de CDH6 EC5, y comparten un epítopo significativamente superpuesto. NOV0712 se une un poco más allá del enlazador EC4-EC5 comparado con NOV0710.

Epítopo de NOV0712

[00413] La estructura cristalina del complejo CDH6 EC5/NOV0712 se utiliza para identificar el epítopo NOV0712 en CDH6. La interacción de superficie en EC5 de CDH6 mediante el Fab NOV0712 se lleva a cabo mediante muchas secuencias continuas y discontinuas (por ejemplo, no-contiguas): restos denominados 503, 520-527, 529, 532-534, 538-543, 550, 552, 569, y 571-577, como se detalla en la Tabla 12. Estos residuos forman el epítopo conformacional tridimensional que es reconocido por Fab NOV0712 (Figura 5 panel superior). Este epítopo definido por cristalografía está en buen acuerdo con la estructura definida por espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio (HDx-MS), en donde los residuos 572-586 están sustancialmente protegidos mediante NOV0712. De manera interesante, in bucle potencial de unión a Ca2+ de EC5 de CDH6 (restos 571-579) tiene en su mayoría (8 de 10 restos) en contacto con NOV0712, especialmente Tyr575 y ASN573 que están casi descartados por completo por el anticuerpo (Tabla 12 y panel inferior de la figura 5). Comparado con la estructura de CDH2, este bucle de unión a Ca2+ de EC5 de CDH6 está en una conformación “exterior” inducida por la unión de NOV0712 (por ejemplo, Asp572 de CDH6 esta girado hacia afuera comparado con su resto correspondiente ASP525 en CDH2).

Tabla 12

Epítopo NOV0712 en CDH6. Todos los residuos de CDH6 que están en contacto con NOV0712 en la estructura cristalina se identifican por PISA, se enumeran y se ordenan por su área de superficie descartada por NOV0712. Los tipos de interacción también se enumeran cuando son aplicables.

Nombre de Residuo	Número de Residuo	Áerea de superficie accesible (ASA, Å^2)	Área de superficie oculta (BSA) por cadena pesada (Å^2)	BSA por cadena ligera (Å^2)	BSA total por NOV0712 (Å^2)	BSA/ASA (%)	Tipo de interacción
TYR	575	205.77	131.73	47.11	178.84	86.91	H-SC[1], H-MC[2], Hidrofóbico
ASN	573	106.72	103.67	0	103.67	97.14	H-SC, H-MC
LYS	543	147.48	65.84	37.33	103.17	69.96	Puente salino
ARG	552	148.25	0	78.9	78.9	53.22	H-SC
ASP	574	104.57	68.99	0	68.99	65.97	H-SC, H-MC
GLN	540	99.91	0	68.29	68.29	68.35	H-SC
PRO	529	122.44	0	65.25	65.25	53.29	
ALA	532	67.01	0	64.9	64.9	96.85	H-MC
SER	533	103.84	0	59.58	59.58	57.38	H-SC
VAL	577	97.82	53.24	0	53.24	54.43	H-MC
SER	526	52.04	0	47.12	47.12	90.55	
ASP	541	45.28	8.86	36.42	45.28	100.00	H-MC
GLN	522	100.04	45.14	0	45.14	45.12	
SER	524	43.52	26.98	16.54	43.52	100.00	
GLY	520	64.48	32.88	0	32.88	50.99	H-MC
ASP	503	113.22	0	32.06	32.06	28.32	
ILE	539	31.09	0	29.09	29.09	93.57	H-MC
HIS	521	104.3	23.91	0	23.91	22.92	
THR	538	39.69	0	23	23	57.95	
LEU	527	24.51	0	20.01	20.01	81.64	H-MC
PRO	576	111.16	17.57	0	17.57	15.81	
ASN	542	72.05	0	17.39	17.39	24.14	
PHE	525	15.47	0.95	14.52	15.47	100.00	
SER	571	16.16	6.96	7.1	14.06	87.00	
VAL	569	23.13	0	8.54	8.54	36.92	

LEU	550	23.71	0	7.9	7.9	33.32
GLY	534	71.3	0	5.13	5.13	7.19
PHE	523	9.81	4.5	0	4.5	45.87
ASP	572	23.71	2.26	0	2.26	9.53

[1]Enlace de hidrógeno por átomos de la cadena secundaria; [2]Enlace de hidrógeno por átomos de la cadena principal

Epítopo de NOV071O

[00414] La estructura cristalina del complejo CDH6 EC5/NOV0710 se utiliza para identificar el epítopo NOV071o en CDH6. La superficie de interacción en CDH6 EC5 mediante Fab NOV0712 está formada por varias secuencias continuas y discontinuas (es decir, no contiguas): restos denominados 520-527, 529, 541, 543, 569, y 571-579, como se detalla en la Tabla 13. Estos residuos forman el epítopo conformacional tridimensional que es reconocido por el Fab NOV0710 (Figura 6 panel superior). Este epítopo definido por cristalografía está en buen acuerdo con la estructura definida por espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno – deuterio (HDx-MS), en donde los residuos 572-586 están sustancialmente protegidos mediante NOV0710. Curiosamente, de manera similar como en la estructura del complejo CDH6 EC5/NOV0712, todos los residuos en el bucle potencial de unión a Ca2+ de CDH6 EC5 (residuos 571-579) están en contacto con NOV0710; entre los que Tyr575, Asn573 y Asp574 están casi completamente descartados por el anticuerpo (Tabla 13 y la Figura 6 panel inferior). En comparación con la estructura CDH2, este bucle de unión a Ca2+ de CDH6 EC5 está en una conformación "exterior" inducida por la unión de NOV0710 (por ejemplo, Asp572 de CDH6 está girando hacia afuera en comparación con su residuo Asp525 correspondiente en CDH2).

Tabla 13

Epítopo NOV0710 en CDH6. Todos los residuos de CDH6 que están en contacto con NOV0710 en la estructura cristalina se identifican por PISA, se enumeran y se ordenan por su área superficial ocluida por NOV0710. Los tipos de interacción también se enumeran cuando son aplicables.

Nombre de Residuo	Número de Residuo	Área de Superficie Accesible (ASA, Å2)	Área Superficial Ocluida (BSA) por	BSA por cadena ligera (Å2)	BSA total por NOV0710 (Å2)	BSA/ASA (%)	Tipo de interacción

			cadena pesada (Å2)				
TYR	575	201.38	147.28	54.1	201.38	100.00	H-MC[1], Hidrofóbico
ASN	573	128.75	116.17	4.34	120.51	93.60	H-SC[2], H-MC
ASP	574	95.9	87.31	0	87.31	91.04	Puente salino
LYS	543	145.5	0	78.92	78.92	54.24	H-SC
VAL	577	93.73	21.59	52.36	73.95	78.90	
PRO	529	133.4	0	72.75	72.75	54.54	
SER	526	58.42	0	46.58	46.58	79.73	
SER	524	40.31	17.45	22.86	40.31	100.00	H-SC
GLN	522	108.66	29.79	0	29.79	27.42	
SER	571	28.68	0.34	24.21	24.55	85.60	
PRO	576	83.21	24.36	0	24.36	29.28	H-MC
ASP	541	33.17	0	22.2	22.2	66.93	H-SC
GLY	520	74.53	17.18	0	17.18	23.05	
VAL	569	26.11	0	16.9	16.9	64.73	
SER	579	82.89	0	13.6	13.6	16.41	
GLN	578	116.86	13.18	0	13.18	11.28	
HIS	521	84.59	10.25	0	10.25	12.12	
LEU	527	41.01	0	10.07	10.07	24.55	
ASP	572	18.64	6.51	0	6.51	34.92	Puente salino
PHE	525	9.03	0	5.15	5.15	57.03	
PHE	523	15.28	0.31	0	0.31	2.03	

[1] Enlace de hidrógeno por átomos de la cadena principal; [2] Enlace de hidrógeno por átomos de la cadena secundaria

Ejemplo 8: Ensayo ELISA para validar la estructura co-cristalina y determinar la unión de anticuerpos anti-CDH6 a proteínas tipo silvestre y mutantes.

[00415] El análisis de algunos aminoácidos resaltados en las estructuras cristalinas de la proteína CDH6/ NOV0710 o /NOV0712 (Asn573, Asp574 y Tyr575) con altos valores de superficie oculta, lo que sugiere que podrían ser importantes para mediar en la

interacción de los anticuerpos con la proteína CDH6. Hemos producido proteína CDH6 mutante recombinante, sustituyendo estos residuos por alanina (Tabla 11, SEQ ID NOs. 539, 540 y 541) y se realizó ELISA. Placas de 96 pozos Maxisorp (Nunc) se recubrieron durante la noche a 4 °C con 1 ug/ml, 100 ul/pozo de la proteína humana recombinante apropiada (CDH6 wt, CDH6-N573A, CDH6-D574A o CDH6-Y575A). Luego todos los pozos se lavaron tres veces con PBS/Tween-20 al 0.1%, se bloquearon durante una hora con PBS/BSA al 1% /Tween-20 al 0.1% y se lavó tres veces con PBS/ Tween-20 al 0.1%. Se añadió una dilución en serie de anticuerpos anti-CDH6 a los pozos relevantes (concentración de partida 100 nM; dilución en serie de 5 veces) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas. Las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween-20 al 0.1% antes de la adición de un anticuerpo de detección ligado a peroxidasa anti-humana de cabra (Pierce, # 31412, Thermo, Rockford, IL). diluido 1/10000 en PBS/BSA al 1%/Tween-20 al 1%. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora antes de lavar tres veces con PBS/Tween-20 al 0.1%. 100 µl de solución de sustrato TMB (3,3', 5,5' tetrametil bencidina) (BioFX) se añadió a todos los pozos de 6 minutos antes de detener la reacción con 50 µl de H2SO4 al 2.5%. El grado de unión de anticuerpo de CDH6 a cada proteína recombinante se determinó midiendo la OD450 utilizando un lector de placas SpectraMax (Molecular Devices). Las curvas de respuesta a dosis se analizaron utilizando GraphPad Prism.

[00416] Como se muestra en la Figura 7, la mutación de D574A anuló la unión de ambos NOV0710 y NOV712, confirmar este residuo es un componente esencial de un epítopo compartido de los dos anticuerpos. Curiosamente, el mutante N573A retiene la unión a NOV712 pero no NOV0710, mientras que el mutante Y575A retiene la unión a NOV0710 pero no a NOV0712. Es de destacar que ninguna de estas mutaciones impactaron la unión del anticuerpo anti-CDH6 NOV0720, que se une a un epítopo distinto (NOV0720 es la versión de que no fue germinada NOV1132 en la Figura 2) - indicando que los mutantes no alteran la arquitectura general de las proteínas. Estos datos validan aún más las estructuras co-cristalinas y confirman que los dos anticuerpos tienen epítopos superpuestos, aunque distintos.

Ejemplo 9: Preparación de conjugados de fármaco con anticuerpo:

Preparación de conjugados DM4 mediante un proceso de una etapa

[00417] Un anticuerpo anti-CDH6, por ejemplo NOV7012, en una concentración de 10,0 mg/mL aproximadamente, se mezcló con DM4 (6,8 veces de exceso molar relativo a la cantidad de anticuerpo) y luego con sulfo-SPDB (alrededor de 5,2 veces en exceso respecto a la cantidad de anticuerpo). La reacción se realizó a 20º C en 20 mM de EPPS [ácido 4 - (2-hidroxietil)-1-piperazinepropanesulfonic] buffer (pH 8,1) que contiene DMA al 10% durante aproximadamente 16 horas. La reacción se inactivó mediante la adición de ácido acético 1 M para ajustar el pH a 5,0. Después de ajuste del pH, la mezcla de reacción se filtró a través de un filtro multi-capa de PVDF (0.45/0.22 µm) y se purificó y se sometió a diafiltración en un buffer de succinato 10 mM (pH 4,5) utilizando una Filtración de Flujo Tangencial. Un ejemplo de los parámetros de los instrumentos para la Filtración de Flujo Tangencial se listan en la Tabla 14 a continuación.

Tabla 14

Parámetros de instrumentos para la Filtración de Flujo Tangencial

Parámetro TFF	Punto de Ajuste de TFF
Concentración a granel (Cb-g/L)	20
TMP (psi)	12-18
Tasa de flujo de alimentación (LMH)	324
Carga de membrana (g/m2)	50-150
Diavolúmenes	16
Buffer de Diafiltración	Succinato 20 mM, pH 4.5
Temperatura (°C)	temperatura ambiente (20 - 25)

[00418] Los conjugados obtenidos a partir del procedimiento descrito anteriormente se analizaron mediante: espectroscopia de UV para la carga de agente citotóxico (maitansinoide al anticuerpo de relación, MAR); SEC-HPLC para la determinación del

monómero conjugado, y HPLC de fase inversa o fase hidrófoba blindado (HISEP)-HPLC para el porcentaje de maitansinoide libre.

Preparación de ADCs con el enlazador SPDB o sulfo-SPDB y agente citotóxico DM4

[00419] Los anticuerpos anti-CDH6, por ejemplo, el anticuerpo de NOV0712, se combinaron con DM4 (6,8 y un exceso molar de 10,2 veces) en 50 mM de buffer EPPS (pH 8,1) que contiene ~ 10% de DMA a 25o C. A esta mezcla se agregó 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB, 4,0 y un exceso molar de 6,0 veces, respectivamente) de manera que la concentración de anticuerpo final fue 4 mg/mL y el contenido final de DMA fue del 10%. La reacción se dejó proceder durante ~16 horas a 25° C en buffer 50 EPPS (pH 8,1). La mezcla de reacción de conjugación se purificó utilizando una columna de SEPHADEX ™ G25 equilibrada y se eluyó con succinato 10 mM, glicina 250 mM, 0,5% de sacarosa, 0,01% de Tween 20, pH 5,5. Procedimientos similares se utilizaron para generar conjugados anti-CDH6-sulfo-SPDB-DM4

[00420] Cualquiera de los métodos anteriores es útil en la conjugación de anticuerpos con SPDB-DM4 o sulfo-SPDB-DM4. La tabla 15 a continuación proporciona un ejemplo de ADCs CDH6.

Tabla 15

Propiedades de los anticuerpos DM4 conjugados

Ab	MAR	Monómero (%)	Rendimiento (%)	DM libre (%)
NOV0709	3.8	97	84	1.6
NOV0691	3.6	96	97	1.5
NOV0690	3.2	97	74	4.0
NOV0689	3.3	99	96	2.0
NOV0670	3.1	98	100	1.5
NOV0720	3.3	99	78	2.0
NOV0712	3.2	99	78	3.1
NOV0674	3.2	99	78	2.6
NOV0719	3.8	98	79	1.9

Preparación de conjugados SMCC-DM1 mediante un proceso in situ

[00421] Los anticuerpos anti-CDH6 también pueden conjugarse con SMCC-DM1 utilizando un proceso in situ de acuerdo con los siguientes procedimientos. Los anticuerpos CDH6 fueron conjugados a la DM1 usando el enlazador sulfosuccinimidil 4 -(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de etilo (sulfo-SMCC). Las soluciones madre de DM1 y del enlazador sulfo-SMCC heterobifuncional se prepararon en DMA. Sulfo-SMCC y DM1 tiol se mezclaron juntos para reaccionar durante 10 minutos a 25º C en DMA que contiene 40% v/v de buffer succinato 50 mM acuoso, EDTA 2 mM, a un pH de 5,0, en una relación de DM1 frente al enlazador de 1,3:1 equivalente molar y una concentración final de DM1 de 1,95 mM. El anticuerpo se hizo reaccionar con una alícuota del SMCC-DM1 generado anteriormente in situ para que las condiciones de conjugación finales incluyeran 2,5 mg/ml de Ab en EPPS 50mM, pH 8,0, DMA al 10% (v/v) y una proporción molar de SMCC:Ab 6,5 aproximadamente. Después de aproximadamente 18 horas a 25 º C, la mezcla de la reacción de conjugación se purificaró usando una columna de SEPHADEX ™ G25 equilibrada con succinato 10 mM, glicina 250 mM, 0,5% de sacarosa, 0,01% de Tween 20, pH 5,5.

Ejemplo 10: Validación de los anticuerpos anti-CDH6 y unión de ADC en un panel de líneas de células CHO que expresan CDH6 de origenes humanos, cinomolgus, de ratas o ratones.

[00422] Para validar el anticuerpo anti-CDH6 no conjugado y unión anti-CDH6-ADC a células que ofrecen expresión de CDH6 de diferentes especies, se realizó Análisis FACS (Clasificación por fluorescencia de células activadas) sobre células CHO modificadas para expresar CDH6 de origenes humano, cynomolgus, de rata y ratón. La generación de las líneas de células CHO que ofrecen expresión CDH6 se describe en el Ejemplo 1; los métodos FACS se describen en el Ejemplo 3.

[00423] Como se muestra en la Figura 8, el anticuerpo CDH6 no conjugado NOV0712 presenta unión celular comparable a CDH6 a partir de origen humano, cynomolgus, de rata y de ratón. El conjugado de fármaco con anticuerpo NOV0712-sulfo-SPDB-DM4 cuenta con un perfil de unión comparable a NOV0712 no conjugado. Este resultado indica que la adición de un enlazador y la carga útil no interfiere con la afinidad de unión o especificidad de los anticuerpos anti-CDH6.

Ejemplo 11: Evaluación de la expresión CDH6 y unión celular de los anticuerpos dirigidos a CDH6 y ADCs en un panel de líneas celulares de cáncer de ovario.

[00424] En preparación para la evaluación de la actividad celular de ADCs dirigidas a CDH6, los niveles de expresión de la superficie celular de CDH6 fueron evaluados en un panel de líneas celulares de cáncer de ovario por FACS. Específicamente, una suspensión celular se preparó mediante el tratamiento de células en cultivo con el reactivo de disociación celular de Accutase® (Gibco, # A1110501 Grand Island, NY) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, seguido por el lavado de las células en buffer FACS (RPMI/BSA al 1%, Gibco, Grand Island, NY). Las células fueron resuspendidas en buffer FACS a $1x10^5$ células/ml y se tomaron alícuotas en placas de 96 pozos de fondo redondo a 100µl/ pozo(Corning #CLS3360 Tewksbury, MA). Los anticuerpos primarios (anti-CDH6-PE (R & D Systems, FAB2715P Minneapolis, MN) y el conjugado IgG1 PE de ratón de control (R & D Systems, IC002P Minneapolis, MN) se diluyeron en buffer FACS a 5 µg/ml. Después de los tres lavados en 200µl de buffer FACS frio, las células se analizaron en BD FACSCanto II ® (BD Biosciences, San José,California). La geomedia de señal por muestra se determinó utilizando el software FlowJo ®.

[00425] OVCAR3 endógenamente expresa altos niveles de CDH6. Para generar una línea celular isogénica con expresión suprimida de CDH6, las OVCAR3 fueron transducidas con un vector lentiviral que entrega un ARNsh que se dirige a CDH6 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mission shRNA bacterial glycerol stock, #TRCN0000054117, Sigma, St. Louis, MO). Las células de OVCAR8 no expresan CDH6 endógenamente. Para generar una línea celular isogénica modificando la expresión de CDH6, las células OVCAR3 fueron transducidas con un constricto lentiviral que conduce a la expresión de ADNc de CDH6 humano. Específicamente, el ADNc para CDH6 se adquirió de Genecopoeia (# Z2028, Genecopoeia, Rockville, MA) y se clonó en pLenti6.3 utilizando la clonación Gateway® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA).

[00426] El análisis FACS confirmó altos niveles de expresión endógena de CDH6 en OVCAR3 tipo silvestre y la supresión de CDH6 en la línea celular OVCAR3 shRNACDH6. Se confirmaron las células OVCAR8 como negativas para CDH6, mientras

que se observaron altos niveles de expresión exógena de CDH6 en las células CDH6+ modificadas por OVCAR8 (Figura 9).

[00427] El análisis FACS confirmó además la unión específica celular de anticuerpos y ADCs generados dirigidos a CDH6. Como se muestra en la Figura 10, un anticuerpo CDH6 no conjugado (NOV0712) cuenta con patrón de unión específica a CDH6 comparable a aquel de un conjugado sulfo-SPDB-DM4 usando el mismo anticuerpo y el enlazador/carga útil sulfo-SPDB-DM4 . Un IgG o ADC no conjugado no vinculante se incluyó como control y se encontró que no resultó en unión celular como se esperaba. Una vez más, indicando que la adición de un enlazador y la carga útil no interfiere con la afinidad o especificidad de los anticuerpos anti-CDH6.

Ejemplo 12: Actividad celular in vitro de ADCs dirigida a CDH6

[00428] La actividad celular in *vitro* de conjugados SMCC-DM1 de una selección de anticuerpos anti-CDH6 se determinó en un panel de líneas celulares que comprende OVCAR3 (carcinoma seroso de ovario, cultivado en RPMI+ FCS al 20%), JHOS4 (1: 1 F12:DMEM + FBS al 10%), KNS42 (EMEM + FBS al 10%), NCIH661 (RPMI + FBS al 10%), SNU8 (RPMI + FBS al 10%) y OVCAR8 (RPMI + FBS al 10%). Las líneas celulares OVCAR3 y NCIH661 se obtuvieron a partir de ATCC (# HTB-161 y # HTB-183, ATCC Manassas, VA). JHOS4 se obtuvo a partir de RIKEN (# RCB1678, RIKEN Cell Bank, RIKEN, Tsukuba, Japón). KNS42 se obtuvo del Banco HSRRB de Recursos para la Investigación en Ciencia y Salud (#IFO50356, HSRRB, Osaka, Japón). SNU8 se obtuvo a partir del Banco de línea celular de Corea KCLB (# 00008, KCLB, Seúl, Corea). OVCAR8 se obtuvo del repositorio de tumor/línea celular NCI/DCTD (NCI, Frederick, MA).

[00429] Las células en cultivo se contaron y se diluyeron en medio hasta una concentración de 1x105 células/ml. 1000 células/pozo se transfirieron a placas de 384 pozos (Corning Costar #3707, Corning, Tewksbury, MA). La solución stock de ADC se preparó en tubos Matrix de 1,4 ml (Thermo, # 3790, Rockford, IL). Una dilución en serie 1:3 de 10 puntos, se preparó en una placa de 384 pozos de pozo profundo (Brandtech Scientific Inc # 701355, Essex, CT) y 25 µl fueron transferidos por placa de ensayo (triplicado) para obtener una concentración de partida más alta del ADC de 33nM. Para los controles, se prepararon los pozos con células únicamente (=control de 100% de viabilidad) y las células incubadas con un anticuerpo conjugado no de marcaje de SMCC-

DM1 (para verificar la actividad que no es inducida por el blanco). Las placas se incubaron durante 120 horas a 37 °C y CO2 5%. La actividad celular de los complejos anticuerpo primario/Fab-DM1 se determinó utilizando un reactivo CellTiter-Glo® (Promega # G7571, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. La viabilidad se normalizó a las células sólo control y datos se representaron usando Tibco Spotfire (Tibco Software Inc, Palo Alto, CA)

[00430] Un subconjunto de ADCs que se dirigen a CDH6 es capaz de inhibir la proliferación de células CDH6-positivas a concentraciones (1,22 nM) que son inactivas en células que carecen de expresión CDH6 (OVCAR8), lo que indica una actividad celular in vivo dependiente de diana del CDH6-ADC (Tabla 16).

Tabla 16

Actividad celular in vitro de conjugados anti-CDH6 SMCC-DM1. La Tabla muestra el porcentaje de inhibición en ADC 1.22nM.

Anticuerpo	OVCAR3	JHOS4	KNS42	NCIH661	SNU8	OVCAR8
NOV0670	-29.97	-27.88	-18.63	5.14	-15.57	-23.77
NOV0672	-16.25	-22.96	-12.26	-6.14	-10.94	-16.16
NOV0674	-10.29	-11.94	-6.82	3.9	-1.42	-8.97
NOV0682	61.75	33.92	23.75	16.44	10.83	-2.17
NOV0685	-20.65	-14.67	-14.65	2.08	-0.1	-11.51
NOV0689	7.21	3.63	-3.11	-0.53	10.27	-7.29
NOV0690	84.8	50.97	56.81	14.55	18.39	-15.8
NOV0691	-1.5	-14.37	-9.23	-10.47	-2.56	-10.48
NOV0692	88.01	62.3	57.32	14.77	15.66	-10.83
NOV0693	85.73	58.08	15.17	25.87	35.56	-7.07
NOV0695	89	66.94	66.31	18.69	21.56	-7.04
NOV0699	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
NOV0705	68.57	40.35	-13.35	-3.15	6.4	-22.58
NOV0709	46.88	4.5	-4.2	5.91	-7.7	-8.34
NOV0710	90.84	69.01	56.98	38.7	42.4	6.53
NOV0712	87.62	67.56	56.82	32.46	31.35	1.68
NOV0713	-3.55	-6.22	-17.26	-9.74	7.79	-0.08
NOV0718	-3.8	-5.03	3.5	2.51	3.35	6.64
NOV0719	76.05	27.25	40.97	-9.87	3.18	-2
NOV0720	80.72	43.52	56.97	1.94	3.56	-3.9

Ejemplo 13: Actividad celular in vitro de ADCs anti-CDH6 como conjugados SMCC-DM1 y SPDB-DM4 en líneas celulares de cáncer de ovario

[00431] La actividad celular in vitro de ADCs anti-CDH6 como conjugados SMCC-DM1 y SPDB-DM4 se evalúo sobre un panel de líneas celulares de cáncer de ovario (Figura 11 y Tabla 17) Para medir la actividad dependiente y específica del blanco de ADCs, se generaron líneas celulares pares isogénicas de las líneas celulares OVCAR3 y OVCAR8 como se describe en el Ejemplo 11.

[00432] Los ADCs dirigidos a CDH6 en ambos formatos SMCC-DM1 y SPDB-DM4 exhiben actividad celular dependiente de dosis y diana como se indica por la inhibición de la proliferación en líneas celulares que expresan CDH6 comparada con la línea isogénica par no expresiva y los ADCs isotipos de control (Figura 11 y Tabla 17). El ensayo de actividad celular se realizó y se analizó como se describe en el Ejemplo 12.

Tabla 17

Actividad celular in vitro de ADCs anti-CDH6 como conjugados SMCC-DM1 y SPDB-DM4 en líneas celulares de cáncer de ovario

Compuesto	Conector/Carga útil	OVCAR3		OVCAR3 shRNA_CDH6		OVCAR8		OVCAR8 (CDH6+ modificado)	
		IP [nM]	Amax (%)	IP [nM]	Amax (%)	IP [nM]	Amax (%)	IP [nM]	Amax (%)
me-DM1	carga útil libre	0.002	90	0.002	89	0.104	85	0.087	84
hIgG	SMCC-DM1	29,993	91	18.468	92	33	n/a	33	n/a
hIgG	SPDB-DM4	3,966	91	2.168	91	17.79	79	32.728	83
NOV0710	SMCC-DM1	1.034	101	18.52	93	33	5	0.102	94
NOV0710	SPDB-DM4	0.01	88	7.543	91	33	n/a	0.018	85
NOV0712	SMCC-DM1	0.065	88	11.249	94	33	n/a	0.015	95
NOV0712	SPDB-	0.008	88	3.785	90	33	n/a	0.012	84

	DM4								

Ejemplo 14: Actividad celular in vitro de anticuerpos dirigidos a CDH6 o IgG de control, ya sea en forma no conjugada o como un conjugado de fármaco con anticuerpo sulfo-SPDB-DM4.

[00433] Actividad celular del anticuerpo CDH6 NOV0712 ya sea como un IgG no conjugado o conjugado sulfo-SPDB-DM4 se evaluó en un panel de líneas celulares de cáncer de ovario (véase el Ejemplo 11). Se incluyó además un anticuerpo de control de isotipo no dirigido bien sea en una forma no conjugada o como un conjugado sulfo-SPDB-DM4 que también fue añadido. Como se muestra en la Figura 12, el conjugado de anticuerpo NOV0712-sulfo-SPDB-DM4 que se dirige a CDH6 mostró una actividad celular dependiente de la dosis y del blanco como se indica por la inhibición de la proliferación en líneas celulares que expresan CDH6 (OVCAR3 y OVCAR8-CDH6 +) en comparación con la línea celular que no expresa (OVCAR8). No se observó actividad celular con el anticuerpo NOV0712 no conjugado o un control de IgG no dirigido. La actividad marginal a ciertas concentraciones se entiende como el resultado de una citotoxicidad no específica que fueron vistos con un conjugado de control IgG-sulfo-SPDB-DM4. El ensayo de actividad celular se llevó a cabo y se analizó como se describe en el Ejemplo 9.

Ejemplo 15: Eficacia in vivo de anticuerpos anti-CDH6 como conjugados SMCC-DM1 en un modelo de xenoinjerto de ratón de cáncer de ovario.

[00434] La actividad anti-tumor de una selección de ADCs anti-CDH6 se evalúo en el modelo de xenoinjerto de ovario OVCAR-3. Los ratones NOD-scid-gamma hembra se implantaron subcutáneamente en el flanco derecho con células OVCAR-3 10x106 que contienen 50% de Matrigel™ (BD Biosciences) en solución de buffer de fosfato (PBS). El volumen total de inyección que contiene células en suspensión fue de 200 µl. Los ratones fueron incluidos en el estudio de la implantación 29 días después con un volumen tumoral medio de 165 mm^3. Después de ser asignados aleatoriamente uno de los siete grupos (n = 4/grupo), a los ratones se les administró una sola dosis iv de PBS (10 ml/kg), un control

de isotipo IgG1-SMCC-DM1 no diana (10 mg/kg), o uno de los cinco anti-CDH6-SMCC-DM1 (10 mg/kg). Volúmenes de los tumores y los pesos corporales se midieron dos veces por semana. Cada ADC anti-CDH6-SMCC-DM1 provocó un efecto inhibitorio tras el crecimiento tumoral seguido de una única dosis de 10 mg/kg, en comparación con los brazos de control (Figura 13).

[00435] La actividad anti-tumoral de una segunda selección de ADCs anti-CDH6 se evalúo en el modelo de xenoinjerto de ovario OVCAR-3. Los ratones NOD-scid-gamma hembra se implantaron subcutáneamente en el flanco derecho con células OVCAR-3 10x106 que contienen 50% de Matrigel ™ (BD Biosciences, San Jose, CA) en PBS. El volumen total de inyección que contiene células en suspensión fue de 200 µl. Los ratones fueron incluidos en el estudio de la implantación 35 días después con un volumen tumoral medio de 166 mm^3. Después de ser asignados aleatoriamente uno de los siete grupos (n = 4/grupo), a los ratones se les administró una sola dosis iv de PBS (10 ml/kg), un control de isotipo IgG1-SMCC-DM1 no diana (10 mg/kg), o uno de los cinco anti-CDH6-SMCC-DM1 (10 mg/kg) más NOV0712-SMCC-DM1 el cual habia sido dosificado en clasificaciones previas de OVCAR3 Volúmenes de los tumores y los pesos corporales se midieron dos veces por semana. Ninguno de los ratones mostró una disminución en el peso corporal, lo que indica que el ADC fue bien tolerado (datos no mostrados). De los cinco anti-CDH6-SMCC-DM1, solamente NOV0690 provocó una respuesta comparable a la de NOV0712-SMCC-DM1 (Figura 14).

Ejemplo 16: Eficacia in vivo de los anticuerpos anti-CDH6 como conjugados SPDB-DM4 en un modelo de xenoinjerto de ratón de cáncer de ovario

[00436] La actividad anti-tumoral de una selección de ADCs anti-CDH6 se evalúo en el modelo de xenoinjerto de ovario OVCAR-3. Los ratones NOD-scid-gamma hembra se implantaron subcutáneamente en el flanco derecho con células OVCAR-3 10x106 que contienen 50% de Matrigel ™ (BD Biosciences, San Jose, CA) en PBS. El volumen total de inyección que contiene células en suspensión fue de 200 µl. Los ratones fueron incluidos en el estudio de la implantación 21 días después con un volumen tumoral medio de 174 mm^3. Después de ser asignados aleatoriamente uno de los nueve grupos (n = 5/grupo), a los ratones se les administró una sola dosis iv de PBS (10 ml/kg), un control

de isotipo hIgG1-SPDB-DM4 no diana (5 mg/kg), un control de isotipo hIgG1-SMCC-DM1 no diana (5 mg/kg), o uno de los siete anti-CDH6-SPDB-DM4 (5 mg/kg). Los volúmenes tumorales y los pesos corporales se midieron 1-2 veces por semana. Ninguno de los ratones mostró una disminución en el peso corporal, lo que indica que el ADC fue bien tolerado a esta dosificación (datos no mostrados). De todos los agentes anti-CDH6-SPDB-DM4, NOV0712-SPDB-DM4 provocó el mayor efecto anti-tumoral con regresión 70 días después de la dosificación. NOV0710-SPDB-DM4 fue el segundo anti-CDH6-SPDB-DM4 más activo en este estudio (Figura 15).

Ejemplo 17: Eficacia in vivo de los anticuerpos anti-CDH6 como conjugados SMCC-DM1 o SPDB-DM4 en un modelo de xenoinjerto de ratón de cáncer de ovario

[00437] La actividad anti-tumor de una selección de ADC NOV0712 anti-CDH6 en diferentes formatos enlazador-carga fue evaluada en el modelo de xenoinjerto de OVCAR-3 de ovario Los ratones NOD-scid-gamma hembra se implantaron subcutáneamente en el flanco derecho con células OVCAR-3 10x106 que contienen 50% de Matrigel ™ (BD Biosciences, San Jose, CA) en PBS. El volumen total de inyección que contiene células en suspensión fue de 200 µl. Los ratones fueron incluidos en el estudio de la implantación 21 días después con un volumen tumoral medio de 174 mm^3. Después de ser asignados aleatoriamente uno de los cinco grupos (n = 5/grupo), a los ratones se les administró una sola dosis iv de PBS (10 ml/kg), un control de isotipo hIgG1-SPDB-DM4 no diana (5 mg/kg), un control de isotipo hIgG1-SMCC-DM1 no diana (5 mg/kg), NOV0712-SMCC-DM1 (5 mg/kg), o NOV0712-SPDB-DM4 (5 mg/kg). Los volúmenes tumorales y pesos corporales se midieron 1-2 veces por semana. Ninguno de los ratones mostró una disminución en el peso corporal (datos no mostrados). Ambos formatos L/P de NOV0712 provocaron un efecto antitumoral, pero el formato SPDB-DM4 era mucho más potente lo que condujo a una regresión duradera durante más de 70 días después de la dosificación (Figura 16). El muestreo farmacocinético indica que los dos agentes tienen perfiles PK similares (datos no mostrados).

Ejemplo 18: Eficacia in vivo de los ADCs anti-CDH6 con diferentes formatos enlazador/carga en un xenoinjerto de tumos derivado de un paciente de modelo de ratón o de cáncer de ovario

[00438] La actividad anti-tumoral de diferentes formatos de enlazador-carga del ADC anti-CDH6 NOV0712 se evalúo en tumores de ovario primarios xenoinjertados que expresan CDH6 (derivado de paciente) en ratones. Modelos de xenoinjertos humanos primarios fueron establecidos por implantación directa de tejido tumoral primario humano por vía subcutanea en ratones desnudos nu/nu. Los xenoinjertos resultantes se sometieron a pasajes seriales entre 4 y 10 veces antes de su uso en este estudio. Los ratones desnudos atímicos fueron implantados con fragmentos de tumor de aproximadamente 27 mm3 en tamaño, por vía subcutánea en el flanco derecho. Los ratones se involucraron en el estudio 48 días después del implante con un volumen tumoral medio de 178 mm^3. Después de ser asignados aleatoriamente en uno de ocho grupos (n = 5/grupo) a los ratones se les administró una única dosis iv cada 14 días (Q14D), de PBS (10 ml/kg), un formato de enlazador-carga de control hIgG1 de isotipo no diana (-SMCC -DM1, -SPDB-DM4, sulfo-SPDB-DM4), un formato enlazador-carga NOV0712 (-SMCC-DM1, -SPDB-DM4, sulfo-SPDB-DM4) o NOV0712 como un anticuerpo desnudo. Todos los grupos fueron dosificados a 5 mg/kg. Los volúmenes tumores y los pesos corporales se midieron 1-2 veces por semana. Ninguno de los ratones mostró una disminución en el peso corporal (datos no mostrados). NOV0712 como un anticuerpo desnudo no tuvo ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento tumoral. El tratamiento de NOV0712-SMCC-DM1 no resultó en regresión en este modelo. Cada formato escindible de NOV0712 resultó en regresiones. NOV0712-sulfo-SPDB-DM4 5mg/kg Q14D (dosis única cada 14 días) fue el tratamiento más potente con regresiones tumorales duraderas que perduraron hasta 150 días después de la primera dosis (Figura 17)

Ejemplo 19: Eficacia in vivo de ADCs anti-CDH6 con diferentes formatos enlazador/carga en un modelo de xenoinjerto de ratón con cáncer de ovario

[00439] La actividad anti-tumoral de una selección de ADCs anti-CDH6 se evalúo en el modelo de xenoinjerto de ovario OVCAR-3. Los ratones NOD-scid-gamma hembra se implantaron subcutáneamente en el flanco derecho con células OVCAR-3 10x106 que contienen 50% de Matrigel ™ (BD Biosciences, San Jose, CA) en PBS. El volumen total

de inyección que contiene células en suspensión fue de 200 µl. Los ratones fueron incluidos en el estudio de la implantación 20 días después con un volumen tumoral medio de 172 mm^3. Después de ser asignados aleatoriamente en uno de ocho grupos (n = 5/grupo), los ratones fueron administrados con una única dosis iv de PBS (10 ml/kg), un control de isotipo hIgG1-SPDB-DM4 no diana (5 mg/kg), un control de isotipo hIgG1-sulfo-SPDB-DM4 no diana (5 mg/kg), NOV0712-SPDB-DM4 (1.25, 2.5 y 5 mg/kg), o NOV0712-sulfo-SPDB-DM4 (1.25, 2.5 y 5 mg/kg). Los volúmenes tumorales y pesos corporales se midieron 1-2 veces por semana durante la duración de todo el estudio. Ninguno de los ratones mostró una disminución en el peso corporal, lo que indica que el ADC fue bien tolerado (datos no mostrados). NOV0712-sulfo-SPDB-DM4 fue más eficaz que NOV0712-SPDB tanto a niveles de dosificación 2.5 mg/kg como 5 mg/kg. Una única dosis de 2.5 mg/kg de NOV0712-sulfo-SPDB-DM4 llevó a regression. Una única dosis de 5 mg/kg de cada formato condujo a regresión, pero el efecto de la dosis de sulfo-SPDB-DM4 fue más duradero que el de la dosis de SPDB-DM4. En general, estos datos muestran que el formato sulfo–SPDB-DM4 es el formato más activo para marcar CDH6 usando ADCs distintos de los evaluados (Figura 18).

<u>Ejemplo 20: Eficacia in vivo de ADCs anti-CDH6 con diferentes formatos enlazador/carga en un modelo de xenoinjerto de tumor primario de ratón derivado del paciente con cáncer de ovario</u>

[00440] La actividad anti-tumoral de diferentes formatos de enlazador-carga del ADC anti-CDH6 NOV0712 se evalúo en tumores de ovario primarios xenoinjertados que expresan CDH6 (derivado de paciente) en ratones. Modelos de xenoinjertos humanos primarios fueron establecidos por implantación directa de tejido tumoral primario humano por vía subcutanea en ratones desnudos nu/nu. Los xenoinjertos resultantes se sometieron a pasajes seriales entre 4 y 10 veces antes de su uso en este estudio. Los ratones desnudos atímicos fueron implantados con fragmentos de tumor de aproximadamente 27 mm3 en tamaño, por vía subcutánea en el flanco derecho. Debido a las latencias variables en las cinéticas de crecimiento de los tumores primarios, los ratones ingresaron al estudio de manera rotatoria. Los tumores fueron asignados a un grupo tras llegar a un volumen apropiado, entre 147 mm3 y 244 mm3 (el tamaño medio al reclutamiento era de 180 mm^3). Los primeros 5 ratones fueron asignados a los grupos 1 a

5, los próximos 5 ratones se asignaron a los grupos 5 a 1, y así sucesivamente hasta que los 5 grupos (n = 5/grupo) se llenaron. Tras el reclutamiento cada ratón se administró con una dosis iv cada 2 semanas (Q14D), de PBS (10 ml/kg), un control de isotipo hIgG1-CCPA-DM1 no diana (5 mg/kg), NOV0712-SMCC-DM1 (5 mg/kg), un isotipo de control hIgG1-sulfo-SPDB-DM4 no diana (2,5 mg/kg) o NOV0712-sulfo-SPDB-DM4 (2,5 mg/kg). Los volúmenes tumorales y los pesos corporales se midieron dos veces por semana. Ninguno de los ratones mostró una disminución en el peso corporal, lo que indica que el ADC fue bien tolerado (datos no mostrados). NOV0712-SMCC-DM1 5 mg/kg Q14D es capaz de reducir el crecimiento tumoral en este modelo. 2.5 mg/kg Q14D de NOV0712-sulfo-SPDB-DM4 es eficaz en la detención del crecimiento tumoral en este modelo durante 42 días (Figura 19).

Ejemplo 21: Eficacia in vivo de un ADC anti-CDH6 En un panel de modelos de xenoinjerto de tumor primario en ratón derivados de paciente de cáncer de ovario.

[00441] La actividad anti-tumoral de un ADC anti-CDH6 (NOV0712-sulfo-SPDB-DM4) se evaluó en un panel de 28 modelos de xenoinjerto de tumor primario de ovario (PTX) en un diseño 1x1x1 (1PTX x 1 animal x 1 tratamiento). Modelos de xenoinjertos humanos primarios fueron establecidos por implantación directa de tejido tumoral primario humano por vía subcutanea en ratones desnudos nu/nu. Los xenoinjertos resultantes se sometieron a pasajes seriales entre 4 y 10 veces antes de su uso en este estudio. Ratones hembra desnudos se implantaron por vía subcutánea en la región axilar, con un fragmento de tumor 3 x 3 x 3 mm utilizando un trocar de calibre 12. Una vez que un tumor mide 200-250 mm3, el ratón fue inscrito en el estudio y el tratamiento comenzó. Tras inscribirse a cada ratón se le administró una dosis intravenosa cada 2 semanas (Q14D), de NOV0712-sulfo-SPDB-DM4 (5 mg/kg). Ninguno de los ratones mostró una disminución en el peso corporal, lo que indica que el ADC fue bien tolerado (datos no mostrados). Los volúmenes tumorales y los pesos corporales se midieron dos veces por semana. Para la visualización de actividad anti-tumoral, el porcentaje de cambio de volumen tumoral con el tiempo se representó usando Tibco Spotfire (Tibco Software, Palo Alto, CA).

[00442] La expresión de CDH6 en las muestras de PTX se evaluó mediante inmunohistoquímica (IHC) en muestras de tumores PTX no tratados. Específicamente, en el momento del sacrificio, los tumores fueron extirpados inmediatamente, se recolectaron

en casetes de histología y se fijaron en formalina amortiguada al 10% durante 24 horas. Los casetes se transfirieron luego a EtOH al 70% y se procesaron y se incrustaron en parafina usando procedimientos histológicos de rutina. Los bloques experimentales de FFPE se cortaron a 3,5 µm como secciones enteras en los portaobjetos. Un anticuerpo CDH6 anti-humano policlonal de conejo se obtuvo de Sigma-Aldrich (Cat # HPA007047, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) y se utilizó como anticuerpo primario de inmunohistoquímica (IHC). El anticuerpo se detectó utilizando los sistemas de detección DAB Ventana libres de biotina en la plataforma de biomarcadores Ventana DISCOVERY XT (Tucson, AZ).

[00443] El protocolo optimizado incluyó la exposición estándar al reactivo de recuperación de antígeno Ventana # 1 de Condicionamiento celular (Cat # 950-124). El anticuerpo primario se diluyó a una concentración de 1:200 en Diluyente de Anticuerpos DAKO Cytomation (Cat # S0809), se aplicó en un volumen de 100 µll y se incubó durante 60 minutos a 37 °C. Posteriormente se realizó la incubación con anticuerpo secundario anti-ratón HRP-conjugado prediluido Ventana OmniMap (Cat # 760-4311) durante 4 minutos. A continuación, se detectó el anticuerpo secundario utilizando el kit ChromoMap DAB (Cat # 760-159) y los portaobjetos se contratiñeron durante 4 minutos con hematoxilina Ventana (Cat # 760-2021), seguido por el Reactivo de Tinción Indigo (Cat # 760-2037) durante 4 minutos. Los portaobjetos se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (95-100%), a continuación en xilenos, se ponen los cubreobjetos. Las láminas cubiertas fueron evaluadas en un microscopio de luz y con un escáner de láminas ScanScope Leica/Aperio (Vista, CA). Las imagines registradas de la láminas teñidas fueron analizadas en un HALO de Indica Labs (Corrales, NM) con diferenciación de un gestor integrado Leica eSlide/ Espectro de Aperio (Vista, CA). Las imágenes digitales se observaron, anotaron y analizaron mediante el Algoritmo de Cuantificación de Área (Area Quantification v1.0) o ya sea con el módulo clasificador (CDH6 Tumor aislado 2, CDH6 Neg Tumor 2 & CDH6 Tumor & CDH6 tumor2) para la detección de tumores o sin Módulo Clasificador. Se utilizaron algoritmos de análisis de imágenes para detectar cualquier intensidad.

[00444] Como se ilustra en la Figura 20, se observó eficacia de ADC anti-CDH6 en los modelos de PTX, en particular entre los modelos de tumores que ofrecen más del veinte por ciento de área tumoral positiva de CDH6 por IHC. De especial interés, 11/28

(39%) de los modelos PTX respondieron con regresión completa del tumor que dura más de 150 días.

Ejemplo 22: Eficacia in vivo de un ADC anti-CDH6 ADC dosificado ya sea a 2.5 mg/kg iv, Q14D o 5 mg/kg iv Q14D en un modelo de ratón de xenoinjerto tumoral primario derivado del paciente de cáncer renal.

[00445] La actividad anti-tumoral de un ADC anti-CDH6 (NOV0712-sulfo-SPDB-DM4, dosificado ya sea a 5 mg/kg Q14D o 2.5 mg/kg, Q14D) se evaluó en un modelo de xenoinjerto de tumor renal primario (PTX). Modelos de xenoinjertos humanos primarios fueron establecidos por implantación directa de tejido tumoral primario humano por vía subcutanea en ratones desnudos nu/nu. Los xenoinjertos resultantes se sometieron a pasajes seriales entre 4 y 10 veces antes de su uso en este estudio. Ratones hembra desnudos se implantaron por vía subcutánea en la región axilar, con un fragmento de tumor 3 x 3 x 3 mm utilizando un trocar de calibre 12. Los animales fueron asignados al azar en grupos de tratamiento en el día 20 después del implate del fragmento de tumor, cuando el volumen tumoral medio fue de 195 mm3 (rango 115-282 mm3). Los tratamientos se iniciaron el día 20. Se determinó la actividad anti-tumoral el día 53 después del implante de células tumorales, 33 días después del inicio del tratamiento, el último día cuando todos los animales estaban en el estudio. Se incluyó un ADC no dirigido como control para determinar la actividad anti-tumoral específica a CDH6. Ninguno de los ratones mostró una disminución en el peso corporal, lo que indica que el ADC fue bien tolerado (datos no mostrados). Al igual que con los modelos de cáncer de ovario, la eficacia de ADC anti-CDH6 se observó en modelos renales PTX representando más del veinte por ciento del área tumoral CDH6 positiva por IHC. Como se muestra en la Figura 21, el tratamiento con ADC anti-CDH6 fue eficaz contra tumores humanos primarios en un modelo PTX renal.

Ejemplo 23: Eficacia in vivo de un ADC anti-CDH6 dosificado ya sea a 2.5 mg/kg iv, Q14D o 5 mg/kg iv Q14D en un modelo de ratón de xenoinjerto tumoral primario derivado del paciente de cáncer renal.

[00446] La actividad anti-tumoral de un ADC anti-CDH6 (NOV0712-sulfo-SPDB-DM4) se evaluó en un modelo de xenoinjerto de tumor renal primario (PTX). Modelos de xenoinjertos humanos primarios fueron establecidos por implantación directa de tejido

tumoral primario humano por vía subcutanea en ratones desnudos nu/nu. Los xenoinjertos resultantes se sometieron a pasajes seriales entre 4 y 10 veces antes de su uso en este estudio. Ratones hembra desnudos se implantaron por vía subcutánea en la región axilar, con un fragmento de tumor 3 x 3 x 3 mm utilizando un trocar de calibre 12. Los animales fueron asignados al azar en grupos de tratamiento en el día 14 después del implate del fragmento de tumor, cuando el volumen tumoral medio fue de 160mm3 (rango 113-245 mm3). Los tratamientos se iniciaron el día 14. Se determinó la actividad anti-tumoral el día 50 después del implante de células tumorales. Ninguno de los ratones mostró una disminución en el peso corporal, lo que indica que el ADC fue bien tolerado (datos no mostrados). Al igual que con los modelos de cáncer de ovario, la eficacia de ADC anti-CDH6 se observó en modelos renales PTX representando más del veinte por ciento del área tumoral CDH6 positiva por IHC. Como se muestra en la Figura 22, el tratamiento con ADC anti-CDH6 fue eficaz contra tumores humanos primarios en un modelo PTX renal.

Ejemplo 24: Eficacia in vivo de un ADC anti-CDH6 dosificado ya sea a 2.5 mg/kg, Q14D o 5 mg/kg Q14D en un modelo de ratón de xenoinjerto tumoral primario derivado del paciente de cáncer renal.

[00447] La actividad anti-tumoral de un ADC anti-CDH6 (NOV0712-sulfo-SPDB-DM4) se evaluó en un modelo de xenoinjerto de tumor renal primario (PTX). Modelos de xenoinjertos humanos primarios fueron establecidos por implantación directa de tejido tumoral primario humano por vía subcutanea en ratones desnudos nu/nu. Los xenoinjertos resultantes se sometieron a pasajes seriales entre 4 y 10 veces antes de su uso en este estudio. Ratones hembra desnudos se implantaron por vía subcutánea en la región axilar, con un fragmento de tumor 3 x 3 x 3 mm utilizando un trocar de calibre 12. Los animales fueron asignados al azar en grupos de tratamiento en el día 19 después del implate del fragmento de tumor, cuando el volumen tumoral medio fue de 176 mm3 (rango 123-267 mm3). Los tratamientos se iniciaron el día 19. Se determinó la actividad anti-tumoral el día 49 después del implante de células tumorales. Ninguno de los ratones mostró una disminución en el peso corporal, lo que indica que el ADC fue bien tolerado (datos no mostrados). Al igual que con los modelos de cáncer de ovario, la eficacia de ADC anti-CDH6 se observó en modelos renales PTX representando más del veinte por

ciento del área tumoral CDH6 positiva por IHC. Como se muestra en la Figura 23, el tratamiento con ADC anti-CDH6 fue eficaz contra tumores humanos primarios en un modelo PTX renal tanto a una dosificación de 5 mg/kg como 2.5 mg/kg.

Ejemplo 25: ADC anti-CDH6 en terapia de combinación

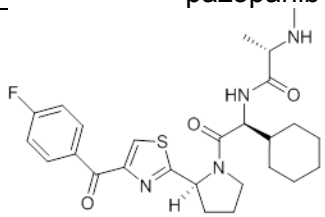
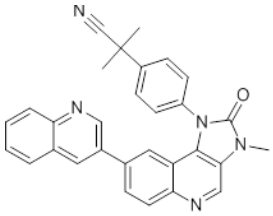
[00448] Los ADCs anti CDH6 pueden combinarse con inhibidores de moléculas pequeñas u otros anticuerpos. Utilizando uno de los siguientes métodos: software Cáliz (Zalicus, Cambridge MA) o la aplicación ComboExplorer (Novartis, Basilea CH), la respuesta de la combinación se comparó con sus agentes individuales, contra el modelo de Loewe ampliamente utilizado para aditividad de dosis para el caso de interacción del fármaco con sí mismo (Lehar y col Nat Biotechnol (2009.) 659-666; Zimmermann et al, Drug Discov Today (2007) 12: 34–42). El exceso de inhibición en comparación con la aditividad se puede representar como un gráfico de dosis completa - matriz para visualizar las concentraciones de fármaco que producen sinergias. La Tabla 18 muestra varias ADC anti-CDH6/combinaciones de compuestos.

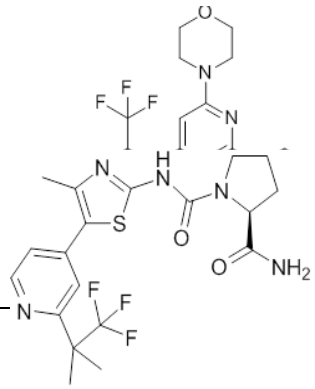
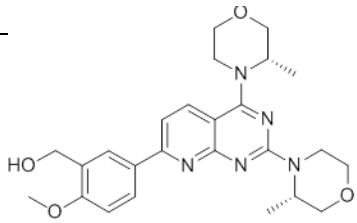
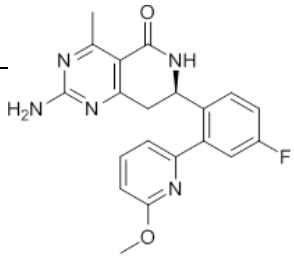
[00449] La viabilidad celular puede ser determinada mediante la medición de contenido de ATP celular mediante el ensayo de luminiscencia CellTiter Glo (Promega, Madison, WI). Un día antes de la adición del fármaco, 250-500 células se sembraron en placas de 384 pozos (Greiner, Monroe, NC) en 20 µl medios de cultivo. Luego, las células se incubaron durante 120 h con diversas concentraciones de ADC anti-CDH6 (Tabla 18), como un agente único, compuestos como agente único o ADC anti-CDH6/combinaciones de compuestos, antes de añadir reactivo CellTiter Glo® a cada pozo y la luminiscencia se grabó en un lector de placas Envision® (Perkin Elmer, Waltham MA). Se utilizaron los valores de luminiscencia para calcular la inhibición de la viabilidad celular en relación con las células tratadas con DMSO (inhibición 0%).

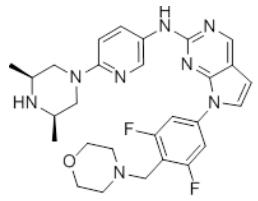
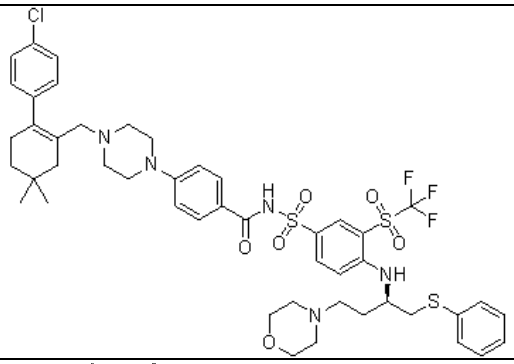
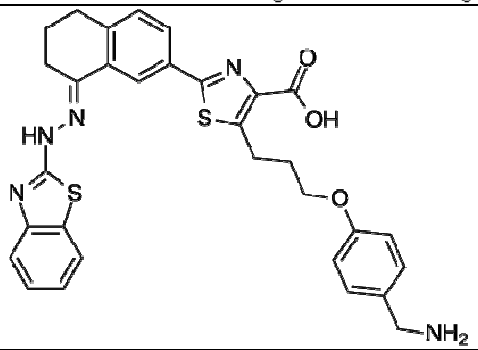
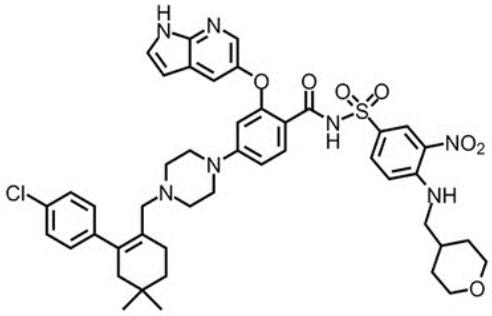
Tabla 18

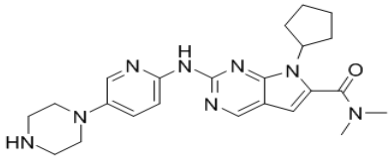
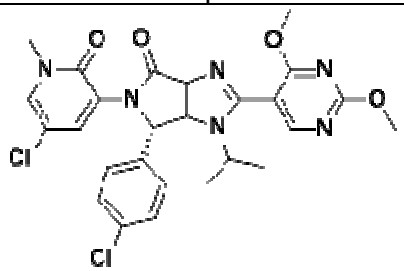
Combinaciones ADC anti-CDH6

Blanco del compuesto	ADC anti-CDH6 **en combinación con:**	**Estructura**

RTK*i*	Glivec®	Imatinib
RTK*i*	Sutent®	Sunitinib
RTKi	Votrient®	pazopanib
IAP*i*	NVP-LCL161	
PI3K fam.	NVP-BEZ235	

pan PI3K*i*	NVP-BKM120	
PI3Ki	NVP-BYL719	
mTOR*i* *(cat.)*	NVP-CCG168	
mTOR*i* *(allo.)*	Afinitor®	
HSP90*i*	NVP-HSP990	

JAK2	NVP-BVB808	
BCL2/BCL-XI	ABT263	
BCL-XI	WEHI-539	
BCL2	ABT199	
HDAC	Farydak®	panobinostat

CDH4/6	NVP-LEE011	
MEK	Mekinist®	Trametinib
RAF	Tafinlar®	Dabrafinib
Cadena Pesada de ADN	Paraplatin®	carboplatin
HDM2	NVP-HDM201	

Tubulin	Taxol®	paclitaxel
HER3	NVP-LJM716	anticuerpo anti-HER3 (Garner, Cancer Res 2013 73 (19):6024-35)

[00450] La Figura 24 es un ejemplo de ADC anti-CDH6 en combinación con inhibidores de moléculas pequeñas. Se cultivaron células de cáncer de ovario SNU-8, como se describe en el Ejemplo 12 y se trataron con titulaciones de un ADC anti-CDH6 (NOV0712-sulfo-SPDB-DM4) y cualquiera un inhibidor de Bcl2/Bcl-XL (ABT-263), un inhibidor de Bcl-Xl (WEHI-539), un inhibidor de IAP (NVP-LCL161) o un inhibidor de MEK (trametinib). Se observa sinergia potente con un ADC anti-CDH6 (NOV0712-sulfo-SPDB-DM4) en combinación con inhibidores de Bcl2/Bcl-XL, Bcl-XL, MEK y IAP. Las combinaciones de ADC, por ejemplo, (CDH6-ADC + CDH6-ADC) o auto-auto combinaciones de una molécula pequeña, por ejemplo, (NVP-LCL161 + NVP-LCL161) fueron incluidas para distinguir la aditividad de dosis de la verdadera sinergia y estos resultados se presentan en la Figura 24. Como indica en la figura 24, el CDH6-ADC más combinaciones de moléculas pequeñas representan significativamente mayores puntuaciones de Sinergia de Loewe en comparación con las auto-auto combinaciones.

[00451] Estos datos indican que la combinación de un ADC con una carga útil anti-mitótica (por ejemplo, sulfo-SPDB-DM4, SPDB-DM4, SMCC-DM1) u otras cargas útiles con un inhibidor de moléculas pequeñas pro-apoptóticas (por ejemplo, inhibidores de ABT-261, ABT-199, WEHI-539 o IAP como NVP-LCL161) o inhibidores de la vía MAPK (es decir trametinib) da lugar a una ejecución más eficaz de la apoptosis después de la detención inicial de G2/M o daño inducido por la carga útil ADC anti-mitótica/citotóxica sola.

[00452] Además, las combinaciones de CDH6-ADC pueden evaluarse adicionalmente por el tratamiento de combinación *in vivo*. CDH6-ADCs puede crear sinergia con agentes inmunomoduladores dirigidos a la vía PD/ PD-L1 como Keytruda® (pembrolizumab) o Opdivo® (nivolumab). En resumen, los ADCs anti-CDH6 descritos en este documento pueden tener efectos sinérgicos cuando se usan en combinación con otras moléculas para conducir a más opciones de tratamiento.

Ejemplo 26: Expresión de CDH6 en indicaciones tumorales

[00453] CDH6 se sobre-expresa en varias indicaciones tumorales incluyendo cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de tejidos blandos, cáncer del SNC, cáncer de tiroides y colangiocarcinoma. La expresión ARNm de CDH6 se evaluó a través de la plataforma Affymetrix GeneChip ® (Santa Clara, CA). Específicamente, una base de datos de expresión interna de ARNm de Novartis que comprende datos sobre muestras de tumores humanos y de tejido normal se consultó usando la sonda de prueba 214803_de CDH6 al final de los datos se representaron usando Tibco Spotfire (Palo Alto, CA). Cada punto en el gráfico representa un tumor individual o muestra de tejido normal. Como se ilustra en la Figura 25, CDH6 cuenta con una expresión restringida de tejido normal y se sobreexpresa significativamente en el cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer del SNC, cánceres de tejidos blandos y cáncer de tiroides y colangiocarcinoma.

[00454] La expresión de CDH6 fue evaluada adicionalmente en una colección de muestras de tumores primarios humanos mediante inmunohistoquímica utilizando el protocolo descrito en el Ejemplo 21. Como se muestra en la Figura 26, se observó expresión de la proteína CDH6 en la mayoría de muestras de cáncer de ovario y cáncer renal. La expresión de CDH6 también se detectó con frecuencia en el cáncer de endometrio, así como colangiocarcinoma. Curiosamente, la expresión de CDH6 dentro del colangiocarcinoma se enriqueció entre el subtipo intra-hepático.

[00455] Se entiende que los ejemplos y aspectos descritos en este documento son únicamente para propósitos ilustrativos y que diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos se sugerirán a los expertos en la técnica y han de incluirse dentro del espíritu y ámbito de esta solicitud y el alcance de la reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Un conjugado de fármaco de anticuerpo de la fórmula

$$Ab\text{-}(L\text{-}(D)_m)_n$$

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde
Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un epitopo de CDH6 humano;
L es un enlazador;
D es una fracción farmacológica;
m es un entero de 1 a 8; y
n es un entero de 1 a 10.

2. El conjugado de fármaco con anticuerpo de la reivindicación 1, en donde dicho n es 3 o 4.

3. El conjugado de fármaco con anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente al dominio extracelular de CDH6, que comprende la secuencia de aminoácidos (SEC ID No. 4).

4. El conjugado de fármaco con anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une específicamente a un epítopo de CDH6 humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 534.

5. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 - -4, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

(i) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 224, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 225, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 226; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO: 227, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 228, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:229;

(ii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 210, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 211, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 212; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:213, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 214, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:215;

(iii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 266, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 267, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 268; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO: 269, (e) una HCDR2 de SEQ ID NO: 270, y (f) una HCDR3 de SEC ID NO: 271;

(iv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 308, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 309, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 310; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:311, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:312, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:313;

(v) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 14, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 15, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 16; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:17, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:18, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:19;

(vi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 28, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 29, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 30; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:31, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:32, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:33;

(vii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 42, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 43, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 44; y una región variable de cadena

pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:45, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:46, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:47;

(viii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 56, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 57, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 58; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:59, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:60, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:61;

(ix) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 70, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 71, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 72; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:73, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:74, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:75;

(x) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 84, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 85, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 86; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:87, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 88, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO: 89;

(xi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 98, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 99, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 100; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:101, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:102, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:103;

(xii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 112, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 113, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 114; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:115, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:116, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:117;

(xiii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 126, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 127, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 128; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:129, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:130, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:131;

(xiv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 140, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 141, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 142; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:143, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:144, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:145;

(xv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 154, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 155, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 156; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:157, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:158, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:159;

(xvi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 168, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 169, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 170; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:171, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:172, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:173;

(xvii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 182, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 183, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 184; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:185, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:186, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:187;

(xviii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 196, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 197, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 198; y una región variable de cadena

pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:199, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:200, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:201;

(xix) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 238, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 239, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO:240; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:241, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:242, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:243;

(xx) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 252, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 253, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 254; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:255, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:256, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:257;

(xxi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 280, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 281, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 282; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:283, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:284, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:285;

(xxii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 294, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 295, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 296; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:297, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:298, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:299; o

(xxiii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 322, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 323, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 324; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:325, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:326, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:327.

6. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde al menos un aminoácido dentro de una CDR se sustituye por un residuo correspondiente de una CDR correspondiente de otro anticuerpo anti-CDH6 en la Tabla 5 o 6.

7. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde uno o dos aminoácidos dentro de una CDR han sido modificados, eliminados o sustituidos.

8. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 - -4, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

(i) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEC ID NO: 230; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 231;

(ii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 216; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 217;

(iii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 272; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 273;

(iv) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 314, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 315;

(v) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 20, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 21;

(vi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 34; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 35;

(vii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 48, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 49;

(viii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 62, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 63;

(ix) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 76, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 77;

(x) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 90, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 91;

(xi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 104, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 105;

(xii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 118; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 119;

(xiii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 132; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 133;

(xiv) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 146; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 147;

(xv) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 160, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 161;

(xvi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 174; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 175;

(xvii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 188; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 189;

(xviii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 202; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 203;

(xix) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 244; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 245;

(xx) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 258, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 259;

(xxi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 286, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 287;

(xxii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 300, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 301; o

(xxiii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 328, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 329.

9. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 - -4, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

(i) una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 234; y una región variable que comprende la SEC ID NO:235;

(i) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO: 220, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:221

(iii) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO: 276; y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:277;

(iv) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:318, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:319.

(v) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:24, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:25.

(vi) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO: 38; y una región variable que comprende la SEC ID NO:39;

(vii) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:52, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:53.

(viii) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:66, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:67;

(ix) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:80, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:81;

(x) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:94, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:95;

(xi) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:108, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:109;

(xii) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO: 122; y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:123;

(xiii) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO: 136; y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:137;

(xiv) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO: 150; y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:151;

(xv) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:164, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:165;

(xvi) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO: 178, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:179;

(xvii) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO: 192; y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:193;

(xviii) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO: 206; y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:207;

(xix) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO: 248; y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:249;

(xx) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:262, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:263.

(xxi) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:290, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:291.

(xxii) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:304, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:305; o

(xxiii) una cadena pesada que comprende la SEC ID NO:332, y una cadena ligera que comprende la SEC ID NO:333.

10. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que retiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad en ya sea la región ligera variable o la región pesada variable.

11. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano modificado, un anticuerpo humano, un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) o un fragmento de anticuerpo.

12. El conjugado de fármaco con anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que dicho enlazador (L) se selecciona del grupo que consta en un enlazador escindible, un enlazador no escindible, un enlazador hidrofílico, un enlazador procargado y un enlazador basado en ácido dicarboxílico .

13. El conjugado de fármaco con anticuerpo de la reivindicación 12, en donde el conector se deriva de un reactivo entrecruzante seleccionado del grupo que consta de: N-succinimidil-4-(2-piridilditio)2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), N-succinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato (SIAB), maleimida PEG NHS, 4-(maleimidometil) ciclohexanocarboxilato de N-succinimidilo (SMCC), 4-(maleimidometil) ciclohexanocarboxilato de N- sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) o 2,5-dioxopirrolidin-1-il 17-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5,8,11,14-tetraoxo-4,7,10,13-tetraazaheptadecan-1-oato (CX1-1).

14. El conjugado de fármaco con anticuerpo de la reivindicación 13, en donde dicho conector se deriva de N-succinimidil-4- (2-piridilditio) 2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB).

15. El conjugado de fármaco con anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que dicha fracción de fármaco (D) se selecciona a partir de un grupo que consta de: un maitansinoide, un inhibidor de la V-ATPasa, un agente pro-apoptótico, un inhibidor de Bcl2, un inhibidor MCL1, un inhibidor de la HSP90, un inhibidor de IAP, un inhibidor de mTOR, un estabilizador de microtúbulos, un desestabilizador de microtúbulos, una auristatina, una dolastatina, una MetAP (aminopeptidasa metionina), un inhibidor de la exportación nuclear de proteínas CRM1, un inhibidor de DPPIV, inhibidores del proteasoma, inhibidores de las reacciones de transferencia de fosforilo en la mitocondria, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inhibidor de cinasa, un inhibidor de CDK2, un inhibidor de CDK9, un inhibidor de la quinesina, un inhibidor de HDAC, un agente que daña el ADN, un agente alquilante de ADN, un intercalador de ADN, un enlazador del zurco menor de ADN y un inhibidor de la DHFR.

16. El conjugado de fármaco con anticuerpo de la reivindicación 15, en donde la fracción de fármaco es un maitansinoide.

17. El conjugado de fármaco con anticuerpo de acuerdo de la reivindicación 16 en donde la maitansinoide es N(2')-deacetil-N2-(4- mercapto-4-metil- 1 -oxopentil)-maitansina (DM4) o N(2')- deacetil-N(2')-(3-mercapto-l-oxopropil)-maitansina (DM1).

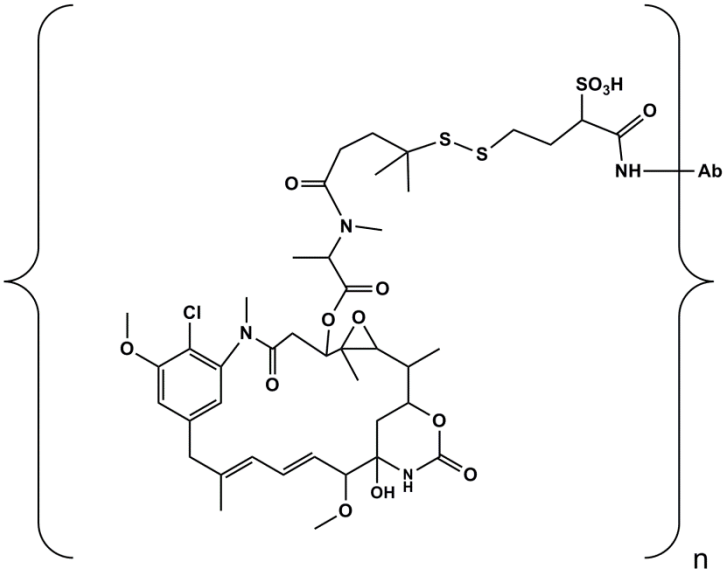
18. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en combinación con otro agente terapéutico.

19. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en combinación con un agente terapéutico listado en la Tabla 18.

20. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en combinación con un inhibidor de BCL2, un inhibidor de Bcl-XL, un inhibidor de BCL2/ BCL-XL, un inhibidor de IAP o un inhibidor de MEK.

21. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en combinación con una molécula moduladores inmune.

22. Un conjugado de fármaco de anticuerpo de la fórmula



Ab-sulfo-SPDB-DM4

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde
Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que especificamente se une a CDH6 humano, y n es un entero de 1 a 10.

23. El conjugado de fármaco con anticuerpo de la reivindicación 22, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une específicamente a un epítopo de CDH6 humana de la (SEC ID NO:4).

24. El conjugado de fármaco con anticuerpo de la reivindicación 22, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a CDH6 en (SEC ID No. 534).

25. El conjugado de fármaco con anticuerpo de la reivindicación 22, en donde dicho Ab es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende:

(i) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 224, (b) una LCDR2 de la

SEQ ID NO: 225, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 226; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO: 227, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 228, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:229;

(ii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 210, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 211, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 212; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:213, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 214, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:215;

(iii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 266, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 267, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 268; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO: 269, (e) una HCDR2 de SEQ ID NO: 270, y (f) una HCDR3 de SEC ID NO: 271;

(iv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 308, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 309, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 310; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:311, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:312, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:313;

(v) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 14, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 15, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 16; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:17, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:18, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:19;

(vi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 28, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 29, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 30; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:31, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:32, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:33;

(vii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 42, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 43, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 44; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:45, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:46, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:47;

(viii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 56, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 57, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 58; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:59, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:60, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:61;

(ix) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 70, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 71, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 72; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:73, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:74, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:75;

(x) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 84, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 85, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 86; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:87, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 88, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO: 89;

(xi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 98, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 99, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 100; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:101, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:102, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:103;

(xii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 112, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 113, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 114; y una región variable de cadena

pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:115, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:116, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:117;

(xiii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 126, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 127, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 128; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:129, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:130, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:131;

(xiv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 140, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 141, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 142; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:143, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:144, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:145;

(xv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 154, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 155, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 156; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:157, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:158, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:159;

(xvi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 168, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 169, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 170; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:171, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:172, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:173;

(xvii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 182, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 183, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 184; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:185, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:186, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:187;

(xviii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 196, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 197, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 198; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:199, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:200, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:201;

(xix) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 238, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 239, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO:240; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:241, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:242, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:243;

(xx) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 252, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 253, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 254; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:255, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:256, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:257;

(xxi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 280, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 281, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 282; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:283, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:284, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:285;

(xxii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 294, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 295, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 296; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:297, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:298, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:299; o

(xxiii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 322, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 323, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 324; y una región variable de cadena

pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:325, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:326, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:327.

26. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde al menos un aminoácido dentro de una CDR se sustituye por un residuo correspondiente de una CDR correspondiente de otro anticuerpo anti-CDH6 en la Tabla 5 o 6.

27. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde uno o dos aminoácidos dentro de una CDR han sido modificados, eliminados o sustituidos.

28. El conjugado de fármaco con anticuerpo de la reivindicación 22, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende:

(i) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 230; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 231;

(ii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 216; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 217;

(iii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 272; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 273;

(iv) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 314, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 315;

(v) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 20, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 21;

(vi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 34; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 35;

(vii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 48, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 49;

(viii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 62, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 63;

(ix) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 76, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 77;

(x) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 90, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 91;

(xi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 104, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 105;

(xii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 118; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 119;

(xiii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 132; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 133;

(xiv) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 146; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 147;

(xv) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 160, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 161;

(xvi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 174; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 175;

(xvii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 188; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 189;

(xviii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 202; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 203;

(xix) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 244; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 245;

(xx) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 258, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 259;

(xxi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 286, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 287;

(xxii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 300, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 301; o

(xxiii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 328, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 329.

29. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que retiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad en ya sea la región ligera variable o la región pesada variable.

30. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores 22-29, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano modificado, un anticuerpo humano, un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) o un fragmento de anticuerpo.

31. El conjugado de fármaco con anticerpo de cualquiera de las reivindicaciones 22-29, en donde dicho n es un entero de 2 a 8.

32. El conjugado de fármaco con anticerpo de cualquiera de las reivindicaciones 22-29, en donde dicho n es un entero de 3 a 4.

33. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 22-32 en combinación con otro agente terapéutico.

34. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 22-32 en combinación con un agente terapéutico listado en la Tabla 18.

35. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en combinación con un inhibidor de BCL2, un inhibidor de Bcl-XL, un inhibidor de BCL2/ BCL-XL, un inhibidor de IAP o un inhibidor de MEK.

36. El conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en combinación con una molécula moduladores inmune.

37. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de fármaco de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-32 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

38. La composición farmacéutica de la reivindicación 37 en el que dicha composición se prepara como un liofilizado.

39. Un método de tratamiento de un cáncer CDH6 positivo en un paciente en necesidad del mismo, que comprende administrar a dicho paciente el conjugado de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, o la composición farmacéutica de las reivindicaciones 37-38.

40. El método de la reivindicación 39, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer de tejidos blandos, cáncer del SNC, cáncer de tiroides y colangiocarcinoma.

41. El método de la reivindicación 39, en donde el conjugado de fármaco con anticuerpo o la composición farmacéutica se administra en combinación con otro agente terapéutico.

42. El método de la reivindicación 39, en donde el conjugado de fármaco con anticuerpo o la composición farmacéutica se administra en combinación con un agente terapéutico listado en la Tabla 18.

43. El método de la reivindicación 39, en donde el conjugado de fármaco con anticuerpo o la composición farmacéutica se administra en combinación con un inhibidor de BCL2, un inhibidor de Bcl-XL, un inhibidor de BCL2/BCL-XL, un inhibidor de IAP o un inhibidor de MEK.

44. El método de la reivindicación 39, en donde el conjugado de fármaco con anticuerpo o la composición farmacéutica se administra en combinación con una molécula moduladora inmune.

45. El conjugado de fármaco de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32 para su uso como un medicamento.

46. El conjugado de de fármaco con anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 37-38, para su uso en el tratamiento de un cáncer CDH6 positivo.

47. El conjugado de fármaco con anticuerpo de la reivindicación 45 administrado en combinación con otro agente terapéutico.

48. El conjugado de fármaco con anticuerpo de la reivindicación 45 administrado en combinación con un agente terapéutico listado en la Tabla 18.

49. El conjugado de fármaco con anticuerpo de la reivindicación 45 en combinación con un inhibidor de BCL2, un inhibidor de Bcl-XL, un inhibidor de BCL2/BCL-XL, un inhibidor de IAP o un inhibidor de MEK.

50. El conjugado de fármaco con anticuerpo de la reivindicación 45 en combinación con una molécula inmunomoduladora.

51. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-30.

52. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 51.

53. Una célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 52.

54. Un proceso para producir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 53 y la recuperación del anticuerpo desde el cultivo.

55. Un proceso para producir un conjugado de fármaco con anticuerpo anti-CDH6, el proceso que comprende:
(a) unir de manera química N-succinimidil-4- (2-piridilditio) 2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB) a una fracción de fármaco DM-4;
(b) conjugar dicho enlazador-fármaco con el anticuerpo recuperado del cultivo celular de la reivindicación 55; y
(c) purificar el conjugado de fármaco de anticuerpo.

56. El conjugado de fármaco con anticuerpo hecho según la reivindicación 55 que tiene una relación media de maitansinoide a anticuerpo (MAR), medida con un espectrofotómetro UV, de aproximadamente 3,5.

57. Un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende:

(i) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 224, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 225, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 226; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO: 227, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 228, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:229;

(ii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 210, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 211, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 212; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:213, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 214, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:215;

(iii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 266, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 267, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 268; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO: 269, (e) una HCDR2 de SEQ ID NO: 270, y (f) una HCDR3 de SEC ID NO: 271;

(iv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 308, (b) una LCDR2 de la

SEQ ID NO: 309, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 310; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:311, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:312, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:313;

(v) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 14, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 15, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 16; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:17, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:18, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:19;

(vi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 28, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 29, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 30; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:31, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:32, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:33;

(vii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 42, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 43, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 44; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:45, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:46, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:47;

(viii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 56, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 57, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 58; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:59, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:60, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:61;

(ix) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 70, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 71, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 72; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:73, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:74, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:75;

(x) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 84, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 85, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 86; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:87, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO: 88, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO: 89;

(xi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 98, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 99, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 100; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:101, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:102, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:103;

(xii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 112, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 113, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 114; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:115, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:116, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:117;

(xiii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 126, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 127, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 128; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:129, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:130, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:131;

(xiv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 140, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 141, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 142; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:143, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:144, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:145;

(xv) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 154, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 155, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 156; y una región variable de cadena

pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:157, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:158, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:159;

(xvi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 168, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 169, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 170; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:171, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:172, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:173;

(xvii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 182, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 183, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 184; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:185, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:186, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:187;

(xviii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 196, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 197, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 198; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:199, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:200, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:201;

(xix) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 238, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 239, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO:240; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:241, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:242, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:243;

(xx) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 252, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 253, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 254; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:255, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:256, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:257;

(xxi) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 280, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 281, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 282; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:283, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:284, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:285;

(xxii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 294, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 295, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 296; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:297, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:298, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:299; o

(xxiii) una región variable de cadena ligera que comprende (a) una LCDR1 (Región determinante de complementariedad CDR) de la SEQ ID NO: 322, (b) una LCDR2 de la SEQ ID NO: 323, (c) una LCDR3 de la SEQ ID NO : 324; y una región variable de cadena pesada que comprende: (d) una HCDR1 de la SEQ ID NO:325, (e) una HCDR2 de la SEQ ID NO:326, y (f) una HCDR3 de la SEQ ID NO:327.

58. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 57 en la que al menos un aminoácido dentro de una CDR se sustituye por un residuo correspondiente de una CDR correspondiente de otro anticuerpo anti-CDH6 en la Tabla 5 o 6.

59. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 57, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

(i) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 230; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 231;

(ii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 216; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 217;

(iii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 272; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 273;

(iv) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 314, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 315;

(v) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 20, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 21;

(vi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 34; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 35;

(vii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 48, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 49;

(viii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 62, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 63;

(ix) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 76, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 77;

(x) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 90, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 91;

(xi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 104, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 105;

(xii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 118; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 119;

(xiii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 132; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 133;

(xiv) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 146; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 147;

(xv) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 160, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 161;

(xvi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 174; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 175;

(xvii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 188; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 189;

(xviii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 202; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 203;

(xix) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 244; y una región variable de cadena ligera (vL) que comprende la SEQ ID NO: 245;

(xx) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 258, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 259;

(xxi) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 286, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 287;

(xxii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 300, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 301; o

(xxiii) una región variable de cadena pesada (vH) que comprende la SEQ ID NO: 328, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEQ ID NO: 329.

60. Un reactivo de diagnóstico que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 57 ó 59, el cual está etiquetado.

61. El reactivo de diagnóstico de la reivindicación 60, en el que el marcador se selecciona del grupo que consiste de un radiomarcador, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de formación de imágenes, y un ion metálico.

CONJUGADOS DE FÁRMACOS CON ANTICUERPOS ANTI-CDH6

RESUMEN

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-CDH6, fragmentos de anticuerpos, conjugados de fármacos con anticuerpos, y sus usos para el tratamiento del cáncer.