

CONJUGADOS DE FÁRMACOS Y ANTICUERPOS ANTI-CCR7

REFERENCIA TRANSVERSAL A SOLICITUD RELACIONADA.

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Nro. 62/454.476 presentada el 3 de febrero de 2017, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS.

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII, y que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Dicha copia ASCII, creada el 10 de enero de 2018, se denomina PAT057594-WO-PCT_SL.txt, y tiene un tamaño de 387.054 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a anticuerpos anti-CCR7, fragmentos de anticuerpos y sus inmunoconjugados, y a sus usos para el tratamiento o la prevención del cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El receptor de quimioquina CC 7 (CCR7) se identificó por primera vez en 1993 como un receptor específico de linfocitos (ver, por ejemplo, Birkenbach et al., J. Virol. 1993 Abr; 67 (4): 2209–20). Su expresión está restringida a subconjuntos de células inmunitarias, como las células T vírgenes, las células T de la memoria central (Tcm), las células T reguladoras (Treg), las células B vírgenes, las células NK (linfocitos citolíticos naturales) y las células dendríticas (DC, conforme a sus siglas en inglés) presentadoras de antígeno maduras. El CCR7 regula la orientación de las células inmunitarias hacia y dentro de los órganos linfoides y, por lo tanto, desempeña un papel clave para equilibrar la inmunidad y la tolerancia (véase, por ejemplo, Förster et al., Nat Rev Immunol. 2008 May; 8 (5): 362–71).

CCR7 es un receptor acoplado a la proteína G (GPCR, conforme a sus siglas en inglés) de tipo rodopsina, clase A, con dos ligandos, CCL21 y CCL19. La estructura de CCR7 no se ha resuelto por completo; sin embargo, se han encontrado esenciales ciertos motivos para la actividad del receptor (ver, por ejemplo, Legler et al., Int J Biochem Cell Biol. 2014, 1 de julio).

CCR7 y el cáncer.

Se sabe además que CCR7 (también conocido como EBI1, BLR2, CC-CKR-7, CMKBR7, CD197 y CDw197) está sobreexpresado en una cantidad de tumores malignos, incluidos los tumores malignos de células B (por ejemplo, CLL, MCL, linfoma de Burkitt),

tumores malignos de células T (p. ej., ATLL), HNSCC (carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, conforme a sus siglas en inglés), ESCC (carcinoma de células escamosas de esófago, conforme a sus siglas en inglés), carcinoma gástrico, NSCLC (carcinoma pulmonar de células no pequeñas conforme a sus siglas en inglés), carcinoma colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de tiroides, cáncer de mama y cáncer cervical, entre otros. La sobreexpresión de CCR7 en, por ejemplo, carcinoma colorrectal, ESCC, cáncer de páncreas, HNSCC y cáncer gástrico se asoció con estadio tumoral avanzado, metástasis en los ganglios linfáticos y pobre sobrevida (ver, por ejemplo, Malietzis et al., *Journal of Surgical Oncology* 2015; 112: 86–92; Irino et al., *BMC Cancer* 2014, 14: 291; Guo et al., *Oncology Letters* 5: 1572–1578, 2013; Xia et al., *Oral Dis.* 2015 Jan; 21 (1): 123–31; Du et al., *Gastric Cancer*. 2016, Mar 16).

Además, se ha demostrado que la expresión de CCR7 en, por ejemplo, HNSCC, desempeña un rol en la resistencia a la quimioterapia (ver, por ejemplo, Wang et al., *JNCI J Natl Cancer Inst* (2008) 100 (7): 502–512). En ciertos tipos de cáncer, como el cáncer de páncreas y el carcinoma nasofaríngeo (NPC, por sus siglas en inglés), se sabe que el CCR7 promueve la metástasis de células de tipo madre del cáncer y la formación de esferas (ver, por ejemplo, Zhang et al., *PLOS ONE* 11 (8); Lun et al., *PLOS ONE* 7 (12)). El rol de CCR7 en la migración celular, la invasividad y la EMT (transición epitelial–mesenquimatosa) se describe en diversos tipos de cáncer, como el cáncer de mama y el cáncer pancreático, *in vitro* e *in vivo* (ver, por ejemplo, Pang et al., *Oncogene* (2015), 1–13); Sperveslage et al., *Int. J. Cancer*: 131, E371 – E381 (2012)). Las vías clave que se han descrito como esenciales para la señalización de CCR7 incluyen p38/ERK1/2 mediada por b–Arrestina, y la señalización de Rho (ver, por ejemplo, Noor et al., *J Neuroinflammation* 2012, 25 de abril; 9:77).

Se sabe que numerosos procesos relacionados con el cáncer inducen la expresión de CCR7. En HNSCC, se muestra que la expresión de CCR7 es inducida por los factores de transcripción NF–kB y AP1 a través de la unión directa a los sitios en el promotor CCR7 (Mburu et al., *J. Biol. Chem.* 2012, 287: 3581–3590). En particular, la expresión de CCR7 está regulada por diversos factores en el microentorno del tumor. En este contexto, se sabe que la expresión de CCR7 se induce a través de la vía de b–Defensina 3/NF–kB en HNSCC (ver, por ejemplo, Mburu et al., *Carcinogenesis* vol. 32 nro. 2 pp. 168–174, 2010), y el receptor de endotelina A y el factor 1 inducible por la hipoxia, en células tumorales de mama (ver, por ejemplo, Wilson et al., *Cancer Res* 2006; 66: 11802–11807).

Conjugados de fármacos y anticuerpos.

Los conjugados de fármaco con anticuerpo ("ADC", conforme a sus siglas en inglés) se han utilizado para el suministro local de agentes citotóxicos en el tratamiento del cáncer (ver, por ejemplo, Lambert, Curr. Opinion In Pharmacology 5: 543–549, 2005). Los ADC permiten el suministro dirigido del resto de fármaco, donde se puede lograr la máxima eficacia con una toxicidad mínima. Los ADC incluyen un anticuerpo seleccionado por su capacidad para unirse a una célula dirigida para una intervención terapéutica, ligado a un fármaco seleccionado por su actividad citostática o citotóxica. La unión del anticuerpo a la célula objetivo, por lo tanto, entrega el medicamento al sitio donde se necesita su efecto terapéutico.

Se han descripto muchos anticuerpos que reconocen y se unen selectivamente a células objetivo, por ejemplo, células cancerosas, para el uso en ADC. A pesar del extenso trabajo sobre los ADC, la unión del anticuerpo a un objetivo particular de interés no es suficiente para predecir el éxito en las aplicaciones de ADC. Los ejemplos de factores que pueden afectar la eficacia terapéutica de los ADC (además de las características intrínsecas del objetivo) incluyen diversos aspectos que necesitan un ajuste fino personalizado, como la afinidad óptima del anticuerpo como un equilibrio entre la disposición mediada por el objetivo (TMDD, conforme a sus siglas en inglés) y la exposición que conduce a la eficacia, la evaluación de las funciones mediadas por Fc (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, ADCC, conforme a sus siglas en inglés)), el método de conjugación (específico de sitio o no), la relación de las moléculas de fármaco/carga útil que se conjugan con cada anticuerpo ("DAR" o "relación de anticuerpo y fármaco", conforme a sus siglas en inglés)), la escisión o estabilidad del enlazador, la estabilidad del ADC y la tendencia de un ADC a agregarse.

Sigue habiendo una necesidad de desarrollar anticuerpos, métodos de unión y cargas útiles citotóxicas con propiedades mejoradas para el uso como composiciones y métodos terapéuticos de ADC eficaces.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente solicitud describe un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este que se une a la proteína CCR7 humana, donde el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno tiene una función efectora significativa reducida o nula en comparación con un anticuerpo de tipo salvaje del mismo isotipo. En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este tiene un nivel significativo reducido o nulo de actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una región Fc silenciada. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una mutación en la región Fc

seleccionada de: D265A; P329A; P329G; N297A; D265A y P329A; D265A y N297A; L234 y L235A; P329A, L234A y L235A; y P329G, L234A y L235A. En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este no tiene actividad de destrucción celular significativa. En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este se une con mayor afinidad a las células que expresan niveles más altos de CCR7 que a las células que expresan niveles más bajos de CCR7. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este se une con mayor afinidad a las células cancerosas que expresan niveles más altos de CCR7 que las células normales que expresan niveles más bajos de CCR7. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este no agota significativamente las células hematopoyéticas normales que expresan CCR7.

En una forma de realización, la presente solicitud describe un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este que se une a CCR7 que comprende:

a. una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 (Región Determinante de Complementariedad de Cadena Pesada 1) de SEQ ID NO: 1, una HCDR2 (Región Determinante de Complementariedad de Cadena Pesada 2) de SEQ ID NO: 2, y una HCDR3 (Región Determinante de Complementariedad de Cadena Pesada 3) de SEQ ID NO: 3; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 (Región Determinante de Complementariedad de Cadena Ligera 1) de SEQ ID NO: 17, una LCDR2 (Región Determinante de Complementariedad de Cadena Ligera 2) de SEQ ID NO: 18, y una LCDR3 (Región Determinante de Complementariedad de Cadena Ligera 3) de SEQ ID NO: 19;

b. una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 4, una HCDR2 de SEQ ID NO: 5, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 6; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 20, una LCDR2 de SEQ ID NO: 21, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 22;

c. una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 7, una HCDR2 de SEQ ID NO: 8, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 9; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 23, una LCDR2 de SEQ ID NO: 24, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 25;

d. una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 10, una HCDR2 de SEQ ID NO: 11, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 12; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 26, una LCDR2 de SEQ ID NO: 27, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 28;

- e. una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 33, una HCDR2 de SEQ ID NO: 34, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 35; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 49, una LCDR2 de SEQ ID NO: 50, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 51;
- 5 f. una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 36, una HCDR2 de SEQ ID NO: 37, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 38; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 52, una LCDR2 de SEQ ID NO: 53, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 54;
- g. una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 39, una HCDR2 de SEQ ID NO: 40, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 41; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 55, una LCDR2 de SEQ ID NO: 56, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 57;
- 10 h. una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 42, una HCDR2 de SEQ ID NO: 43, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 44; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 58, una LCDR2 de SEQ ID NO: 59, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 60;
- i. una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 65, una HCDR2 de SEQ ID NO: 66, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 67; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 81, una LCDR2 de SEQ ID NO: 82, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 83;
- 20 j. una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 68, una HCDR2 de SEQ ID NO: 69, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 70; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 84, una LCDR2 de SEQ ID NO: 85, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 86;
- 25 k. una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 71, una HCDR2 de SEQ ID NO: 72, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 73; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR2 de SEQ ID NO: 88, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 89;
- l. una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 74, una HCDR2 de SEQ ID NO: 75, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 76; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 90, una LCDR2 de SEQ ID NO: 91, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 92;
- 30

m. una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 596, una HCDR2 de SEQ ID NO: 597, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 598; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 612, una LCDR2 de SEQ ID NO: 613, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 614;

5 n. una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 599, una HCDR2 de SEQ ID NO: 600, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 601; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 615, una LCDR2 de SEQ ID NO: 616, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 617;

10 o. una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 602, una HCDR2 de SEQ ID NO: 603, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 604; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 618, una LCDR2 de SEQ ID NO: 619, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 620; o

15 p. una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 605, una HCDR2 de SEQ ID NO: 606, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 607; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 621, una LCDR2 de SEQ ID NO: 622, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 623.

Un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno que se une a CCR7 de la presente solicitud puede comprender además:

20 a. Una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29;

b. Una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61;

25 c. Una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93; o

30 d. Una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 608, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 624.

En otra forma de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno que se une a CCR7 comprende:

a. Una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31;

b. Una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63;

5 c. Una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95; o

d. Una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 610, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 626.

10 El anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno como se describe en la presente solicitud puede comprender una o más sustituciones de cisteína. En una forma de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno comprende una o más sustituciones de cisteína seleccionadas de S152C, S375C, o ambas S152C y S375C de la cadena pesada del anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno, donde la posición es numerada de acuerdo con el sistema EU. Un anticuerpo como se divulga en el presente documento puede ser un anticuerpo
15 monoclonal.

La presente solicitud divulga un conjugado de anticuerpo y fármaco que comprende la fórmula:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; donde:

20 Ab es un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno como se divulga en el presente documento;

L es un enlazador;

D es un resto de fármaco;

m es un número entero de 1 a 8; y

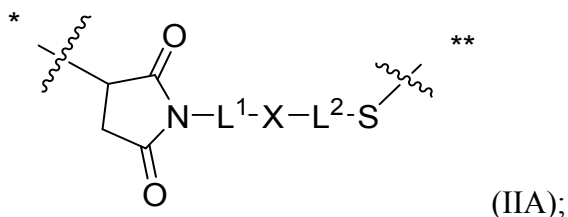
25 n es un número entero de 1 a 12.

En algunas formas de realización, m es 1. En una forma de realización, n es alrededor de 3 a alrededor de 4. En una forma de realización, el enlazador se selecciona del grupo que consiste en un enlazador escindible, un enlazador no escindible, un enlazador hidrófilo, un enlazador procargado, y un enlazador a base de ácido dicarboxílico.

30 En una forma de realización, el enlazador deriva de un reactivo de reticulación seleccionado del grupo que consiste en N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo-butanoato (sulfo-

SPDB), N-succinimidil yodoacetato (SIA), N-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato (SIAB), maleimida PEG NHS, N-succinimidil 4-(maleimidometil) ciclohexanocarboxilato (SMCC), N-sulfosuccinimidil 4-(maleimidometil) ciclohexanocarboxilato (sulfo-SMCC) y 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 otras formas de realización, el enlazador tiene la siguiente Fórmula (IIA):



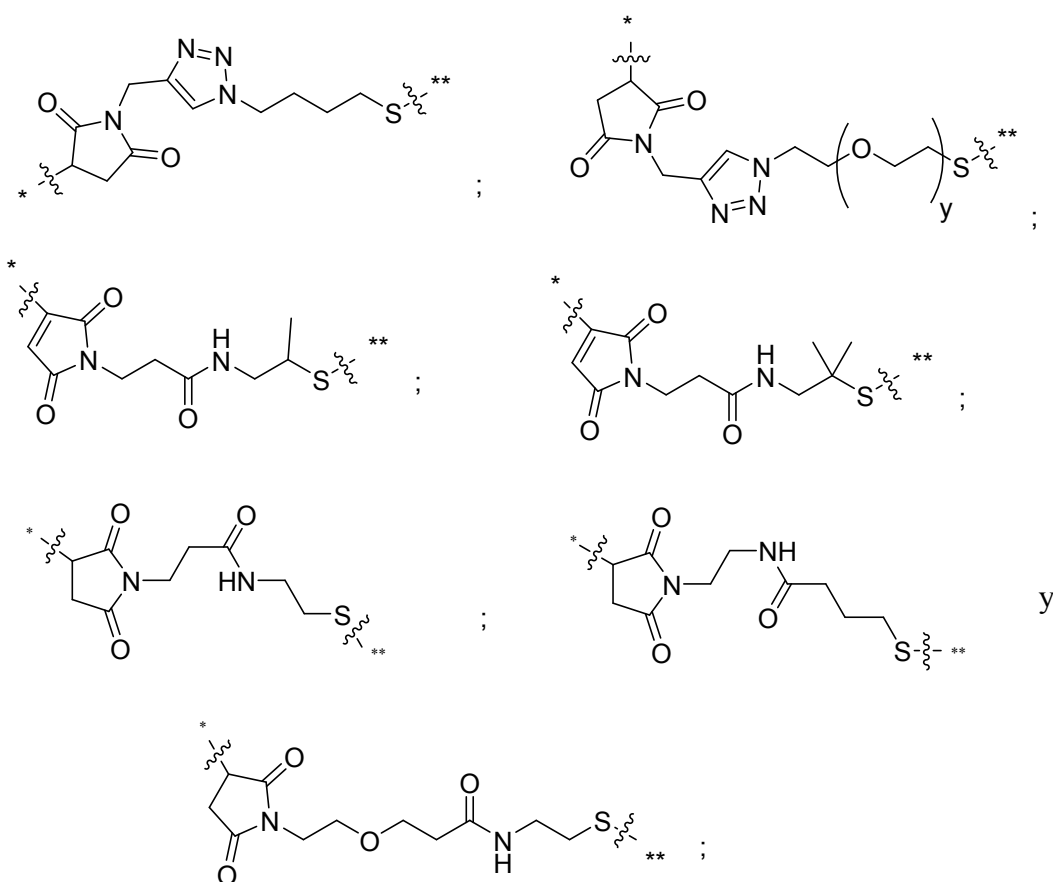
donde * está unido a la funcionalidad tiol en el anticuerpo, y ** está unido a la funcionalidad tiol de un resto de fármaco; y donde:

10 L^1 es un C_{1-6} alquileo donde uno de los grupos metileno puede estar reemplazado con oxígeno;

L^2 es un C_{1-6} alquileo o es $-(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ donde y es 1 a 11;

X es $-C(O)-NH-$, $-NHC(O)-$ o un triazol; y alquileo es lineal o ramificado.

En otra forma de realización, el enlazador tiene la siguiente Fórmula:



donde y es 1 a 11; * está unido a la funcionalidad tiol en el anticuerpo, y ** está unido a la funcionalidad tiol del resto de fármaco.

En una forma de realización, el resto de fármaco se selecciona de un grupo que consiste

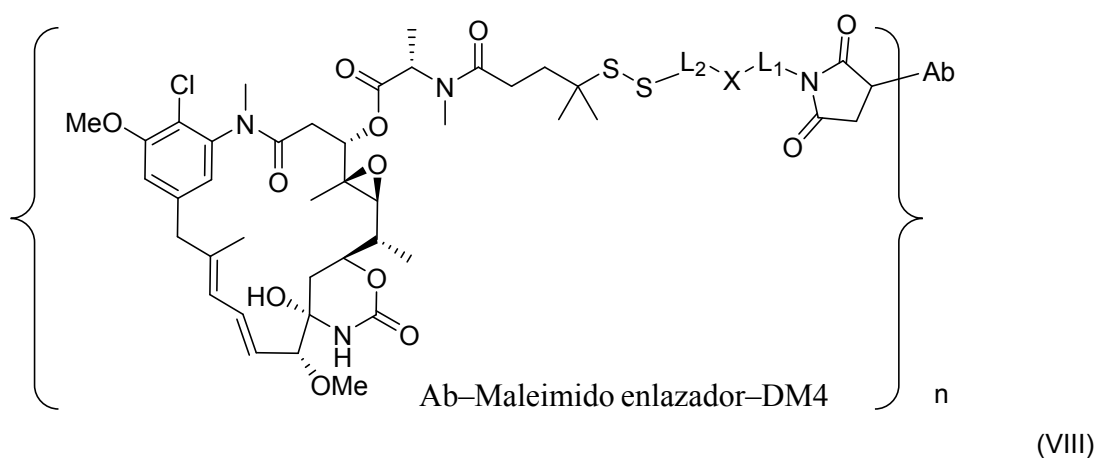
5 en un inhibidor de V-ATPasa, un agente proapoptótico, un inhibidor de Bcl2, un inhibidor de MCL1, un inhibidor de HSP90, un inhibidor IAP (inhibidor de la apoptosis), un inhibidor de mTor (diana de rapamicina en células de mamífero, conforme a sus siglas en inglés), un estabilizador de microtúbulos, un desestabilizador de microtúbulos, una auristatina, una amanitina, una pirrolobenzodiazepina, un inhibidor de la ARN polimerasa, una dolastatina, un

10 maitansinoide, una MetAP (metionina aminopeptidasa), un inhibidor de la exportación nuclear de proteínas CRM1, un inhibidor de DPPIV (dipeptidil peptidasa IV), inhibidores del proteasoma, inhibidores de las reacciones de transferencia de fosforilo en las mitocondrias, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inhibidor de la quinasa, un inhibidor de la CDK2 (quinasa dependiente de ciclina 2, conforme a sus siglas en inglés), un inhibidor de la CDK9

15 (quinasa dependiente de ciclina 9, conforme a sus siglas en inglés), un inhibidor de la quinesina, un inhibidor de HDAC (histona deacetilasa, conforme a sus siglas en inglés), un agente dañino del ADN, un agente alquilante del ADN, un intercalador del ADN, un agente de

unión del surco menor de ADN y un inhibidor de DHFR (dihidrofolato reductasa). En algunas formas de realización, el agente citotóxico es un maitansinoide, donde el maitansinoide es N(2')-deacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1), N(2')deacetil-N(2')-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (DM3), o N(2')-dedacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina (DM4).

En una forma de realización, los conjugados de fármaco y anticuerpo descritos en el presente documento comprenden la siguiente fórmula (VIII):

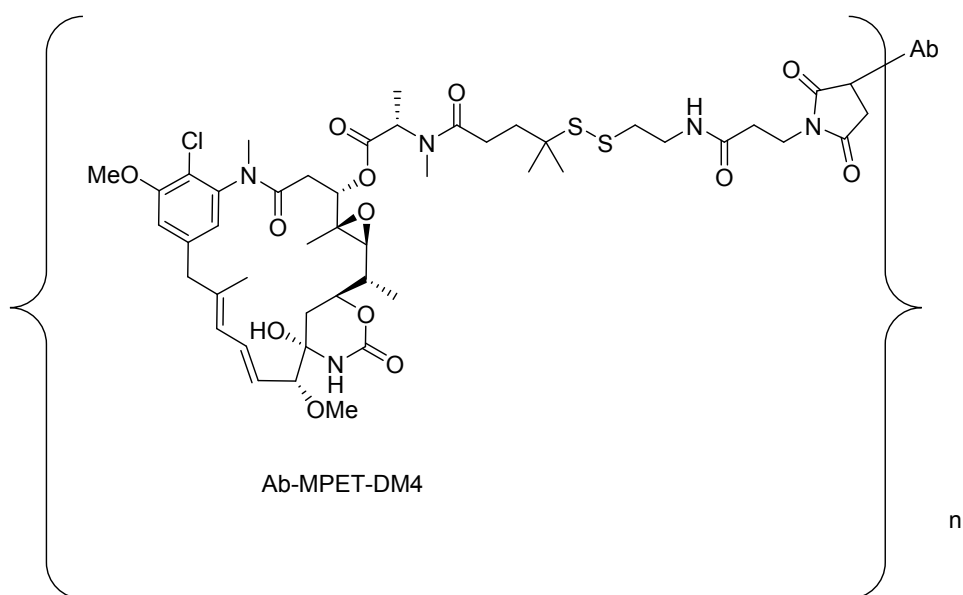


donde L^1 es un C_{1-6} alquileo donde uno de los grupos metileno puede estar reemplazado con oxígeno;

L^2 es un C_{1-6} alquileo o es $-(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ donde y es 1 a 11;

X es $-C(O)-NH-$, $-NHC(O)-$ o un triazol; y alquileo es lineal o ramificado; y donde n es alrededor de 3 a alrededor de 4; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En una forma de realización, los conjugados de anticuerpo y fármaco aquí divulgados tienen la siguiente fórmula:



donde n es alrededor de 3 a alrededor de 4, y Ab es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

La presente solicitud también describe una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de estos, descritos en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable. La presente solicitud también describe una composición farmacéutica que comprende los conjugados de fármaco y anticuerpo como se describen en el presente documento.

La presente solicitud también describe métodos para tratar o prevenir el cáncer en un paciente que lo necesita, que comprenden administrar a dicho paciente los conjugados de fármaco y anticuerpo o las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, donde el cáncer expresa CCR7.

En algunas formas de realización de los métodos de tratamiento o prevención del cáncer, el conjugado de fármaco y anticuerpo o la composición farmacéutica se administran al paciente en combinación con uno o más compuestos terapéuticos adicionales. En una forma de realización, el uno o más compuestos terapéuticos adicionales se seleccionan de un agente quimioterapéutico de estándar de atención, una molécula coestimuladora o un inhibidor del punto de control. En una forma de realización, la molécula coestimuladora se selecciona de un agonista de OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7,

NKp80, CD160, B7–H3, STING, o ligando CD83. En otra forma de realización, el inhibidor del punto de control es seleccionado de un inhibidor de PD–1, PD–L1, PD–L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y/o TGFR beta.

5 La presente solicitud también describe los conjugados de fármaco y anticuerpo o las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, para uso como un medicamento. En una forma de realización, los conjugados de fármaco y anticuerpo o las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento son para el uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer que expresa CCR7 en un paciente que lo necesita.

10 En una forma de realización, la solicitud describe el uso de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos, los conjugados de fármaco y anticuerpo, o la composición farmacéutica como se describe en el presente documento, para tratar o prevenir un cáncer que expresa CCR7 en un paciente que lo necesita.

15 En una forma de realización, la solicitud describe el uso de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos, los conjugados de fármaco y anticuerpo, o las composiciones farmacéuticas como se describe en el presente documento, en la fabricación de un medicamento.

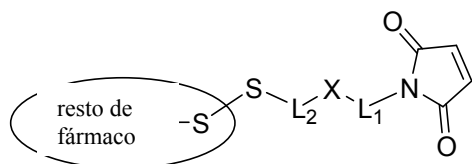
En una forma de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica (CLL, conforme a sus siglas en inglés), linfomas de células T periféricas (PTCL, conforme a sus siglas en inglés) tales como leucemia/linfoma de células T del adulto (ATLL, conforme a sus siglas en inglés) y linfoma anaplásico de células grandes (ALCL, conforme a sus siglas en inglés), linfoma no hodgkiniano (NHL, conforme a sus siglas en inglés) como el linfoma de células de manto (MCL, conforme a sus siglas en inglés), linfoma de Burkitt y linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, conforme a sus siglas en inglés), carcinoma gástrico, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células
25 pequeñas, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma nasofaríngeo (NPC, conforme a sus siglas en inglés), cáncer de esófago, carcinoma colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de células renales y cáncer de cuello uterino. En formas de realización específicas, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica (CLL), linfomas de células T periféricas (PTCL) como la leucemia/linfoma de células T del
30 adulto (ATLL) y linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), linfoma no hodgkiniano (NHL) como el linfoma de células de manto (MCL), el linfoma de Burkitt y el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas.

La presente solicitud también describe ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno como se describe en el presente documento. En una forma de realización, el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 14, 16, 30, 32, 46, 48, 62, 64, 78, 80, 94, 96, 481, 483, 497 o 499. Esta solicitud también describe vectores que comprenden los ácidos nucleicos, y células huéspedes que comprenden los vectores o ácidos nucleicos. Esta solicitud también describe un proceso para producir los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos descritos en el presente documento, que comprende cultivar la célula huésped y recuperar el anticuerpo del cultivo celular. En una forma de realización, el proceso de recuperación del anticuerpo de cultivo celular comprende los pasos de:

- a) eliminar las células y filtrar el cultivo;
- b) purificar el cultivo mediante cromatografía de afinidad;
- c) inactivar cualquier virus en el cultivo ajustando el pH a 3,4–3,6, luego reajustando el pH a 5,8–6,2 y filtrando el cultivo;
- d) purificar el cultivo mediante cromatografía de intercambio catiónico y realizar una reducción del cultivo en columna;
- e) realizar cromatografía de intercambio aniónico en el cultivo;
- f) eliminar los virus por nanofiltración;
- g) filtrar el cultivo que contiene el anticuerpo; y
- h) obtener el anticuerpo purificado.

En otra forma de realización más, en el presente documento se describe un proceso para producir un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-CCR7 que comprende:

- (a) preformar un resto de enlazador-fármaco de la siguiente fórmula:



donde:

el resto de fármaco es DM1, DM3 o DM4, y el resto de fármaco está unido a enlazador por medio de su funcionalidad tiol;

L^1 es un C_{1-6} alquileo donde uno de los grupos metileno puede estar reemplazado con oxígeno;

L^2 es un C_{1-6} alquileo o es $-(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ donde y es 1 a 11;

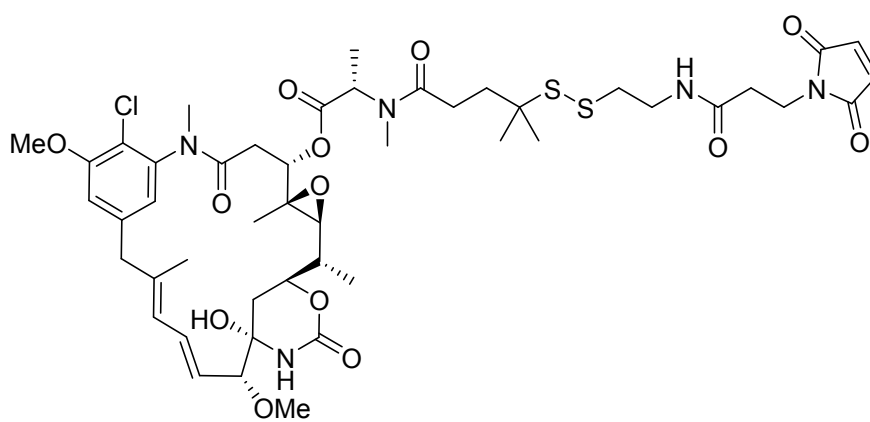
X es $-C(O)-NH-$, $-NHC(O)-$ o un triazol; y alquileo es lineal o ramificado;

(b) conjugar dicho resto de enlazador-fármaco con el anticuerpo recuperado del cultivo celular descrito en el presente documento para producir un conjugado de fármaco y anticuerpo; y

(c) purificar el conjugado de fármaco y anticuerpo.

En una forma de realización, el proceso comprende:

(a) preformar un resto enlazador-fármaco de la siguiente Fórmula:

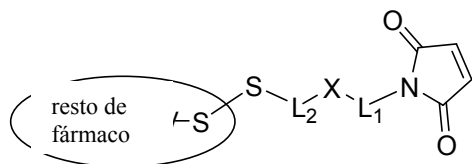


(b) conjugar dicho resto de enlazador-fármaco con el anticuerpo recuperado del cultivo celular descrito en este documento para producir un conjugado de anticuerpo y fármaco; y

(c) purificar el conjugado de anticuerpo y fármaco.

En otra forma de realización, el proceso para producir un conjugado de anticuerpo y fármaco anti-CCR7 comprende:

(a) preformar un resto de enlazador-fármaco de la siguiente Fórmula:



donde:

el resto de fármaco es DM1, DM3 o DM4, y el resto de fármaco está unido al enlazador mediante su funcionalidad tiol;

L^1 es un C_{1-6} alquileo donde uno de los grupos metileno puede estar reemplazado con oxígeno;

L^2 es un C_{1-6} alquileo o es $-(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ donde y es 1 a 11;

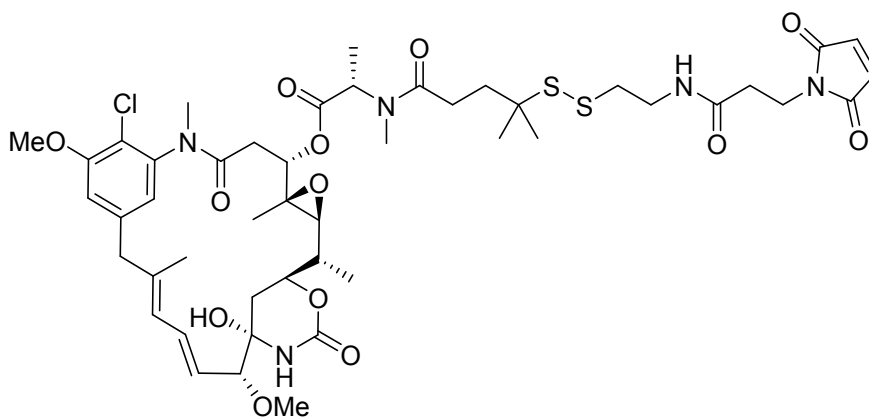
X es $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$ o un triazol; y alquileo es lineal o ramificado;

(b) conjugar dicho resto de enlazador-fármaco con un anticuerpo como se describe en este documento para producir un conjugado de anticuerpo y fármaco; y

(c) purificar el conjugado de anticuerpo y fármaco.

5 En otra forma de realización, el proceso para producir un conjugado de anticuerpo y fármaco anti-CCR7 comprende:

(a) preformar un resto de enlazador-fármaco de la siguiente Fórmula:

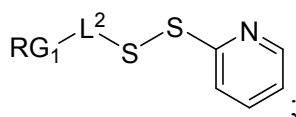


10 (b) conjugar dicho resto de enlazador-fármaco con un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno como se describe en este documento, para producir un conjugado de anticuerpo y fármaco; y

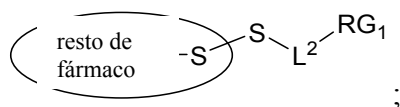
(c) purificar el conjugado de anticuerpo y fármaco.

En otra forma de realización, el paso de preformar dicho resto de enlazador-fármaco comprende:

15 a) hacer reaccionar un resto de fármaco por medio de su funcionalidad tiol con:



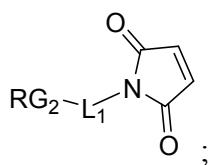
para formar:



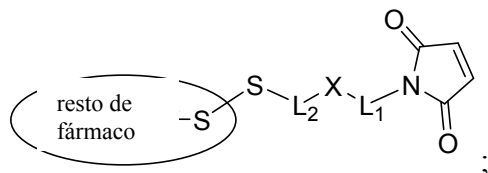
b) hacer reaccionar el producto formado



con:



para formar el resto de enlazador-fármaco:



donde:

- 5 L^1 es un C_{1-6} alquileo donde uno de los grupos metileno puede estar reemplazado con oxígeno;

L^2 es un C_{1-6} alquileo o es $-(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ donde y es 1 a 11; y

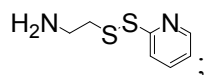
X es $-C(O)-NH-$, $-NHC(O)-$ o un triazol;

donde el alquileo es lineal o ramificado; y

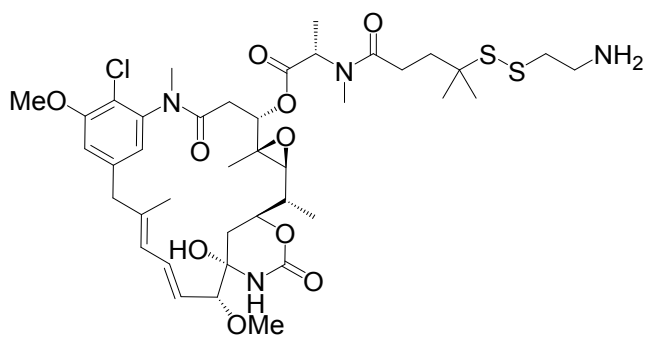
- 10 $RG1$ y $RG2$ son 2 grupos reactivos que forman el grupo X .

En otra forma de realización, el paso de preformar dicho resto de enlazador-fármaco comprende:

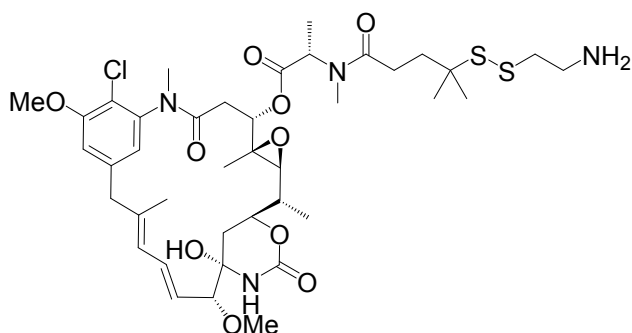
- a) Hacer reaccionar el resto de fármaco por medio de su funcionalidad tiol con:



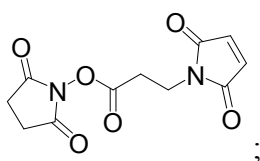
- 15 para formar:



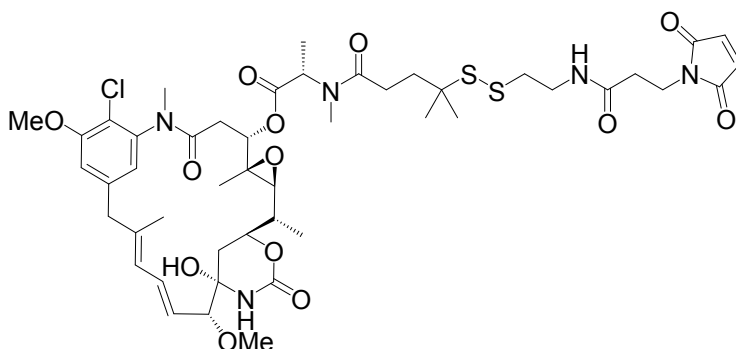
- b) hacer reaccionar el producto formado:



con:



para formar el resto de enlazador-fármaco:



5 En alguna forma de realización, un conjugado de fármaco y anticuerpo fabricado de acuerdo con los procesos anteriores tiene un DAR promedio, medido con un espectrofotómetro de UV, de aproximadamente 3 a aproximadamente 4.

En otra forma de realización, esta solicitud describe un proceso para producir un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-CCR7 que comprende:

- 10 (a) unir químicamente SMCC o MPET a un resto de fármaco DM-1 o DM-4 para formar un enlazador-fármaco;
- (b) conjugar dicho enlazador-fármaco a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este como se describe en el presente documento; y
- (c) purificar el conjugado de fármaco y anticuerpo.

15 En una forma de realización, el conjugado de anticuerpo y fármaco fabricado de acuerdo con este proceso tiene un DAR promedio, medido con un espectrofotómetro de UV, de aproximadamente 3 a aproximadamente 4.

La presente solicitud también describe un reactivo de diagnóstico que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este como se describe en el presente documento.

En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este se etiqueta con una radioetiqueta, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de formación de imágenes o un ion metálico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 La Figura 1 representa datos experimentales sobre la actividad de ADCC *in vitro* de anticuerpos anti-CCR7 no humanizados y humanizados en formato CysMab usando un ensayo reportero de ADCC sustituto.

La Figura 2 representa datos experimentales sobre la actividad de ADCC *in vitro* de las versiones mutadas de Fc de DAPA de anticuerpos anti-CCR7 no humanizados usando un
10 ensayo reportero de ADCC sustituto.

La Figura 3 representa datos experimentales sobre la unión a hCCR7 recombinante por anticuerpos anti-CCR7 en formato CysMab.DAPA usando un ensayo sobre la base de ELISA (ensayo inmunsorbente ligado a enzima, conforme a sus siglas en inglés).

Las Figuras 4A–C representan datos experimentales sobre la funcionalidad de los
15 anticuerpos anti-CCR7 parentales utilizando un ensayo de β -Arrestina en modo agonista (Figura 4A) y modo antagonista (Figura 4B, Figura 4C).

La Figura 5 representa datos experimentales sobre la competencia con el ligando CCR7 por anticuerpos anti-CCR7 en formato CysMab.DAPA usando un ensayo FACS.

La Figura 6 representa datos experimentales sobre el mapeo de epítomos de anticuerpos
20 anti-CCR7 parentales utilizando proteínas CCR7 mutadas.

Las Figuras 7A–B representan datos experimentales sobre ensayos de ADC a cuestras (*piggyback*) (pgADC) de anticuerpos parentales anti-CCR7 complejados con un fragmento de anticuerpo secundario conjugado de carga útil.

La Figura 8 representa datos experimentales sobre el ensayo de destrucción de ADC a
25 cuestras (pgADC) de los efectos citotóxicos del Ab parental 121G12 complejado con un fragmento de anticuerpo secundario conjugado con la carga útil utilizando líneas celulares negativas objetivo.

La Figura 9 muestra gráficos que ilustran el agotamiento de células T CD4+ y CD8a+ con un Ab parental 121G12 de reactividad cruzada CCR7 de ratón en un formato Fc de tipo
30 salvaje CysMab, ya sea como un anticuerpo solo o conjugado con una citotoxina de auristatina, cuyos efectos son rescatados cambiando a un formato Fc DAPA silenciado.

La Figura 10 representa un gráfico que ilustra la eficacia de la respuesta a la dosis de los conjugados de fármaco y anticuerpo 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 y 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 en un modelo de xenoinjerto de mieloma múltiple KE97.

La Figura 11 representa un gráfico que ilustra la actividad de los conjugados de fármaco y anticuerpo 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 y 121G12.sSPDB.DM4 en un modelo de mieloma múltiple KE97 con una dosis iniciada en una carga tumoral de inicio mayor que la Fig. 10.

La Figura 12 representa un gráfico que ilustra la actividad *in vivo* del conjugado 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 en un modelo de tumor de pulmón de células no pequeñas primario HLUX1934.

La Figura 13 representa un gráfico que ilustra la actividad del 684E12.SMCC.DM1 parental conjugado en un modelo de xenoinjerto de mieloma múltiple KE97.

Las Figuras 14A–B representan las imágenes de IHC de fosfohistona H3 (Figura 14A) y la señal de H3 de fosfohistona cuantificada (Figura 14B) en los tumores KE97 48 horas después del tratamiento de una dosis única de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 2, 5 o 10 mg/kg o control de isotipo IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 10 mg/kg, lo que demuestra la inducción de la detención mitótica (fosfohistona H3) después del tratamiento con ADC anti-CCR7.

La Figura 15 representa un gráfico que ilustra la eficacia de la respuesta a la dosis de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 contra el modelo de xenoinjerto OCI-LY3 ABC-DLBCL.

La Figura 16 representa un gráfico que ilustra la eficacia de la respuesta a la dosis de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 contra el modelo de xenoinjerto de Toledo GCB-DLBCL.

La Figura 17 representa un gráfico que ilustra la eficacia de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 contra el modelo de xenoinjerto DEL ALCL.

La Figura 18 representa un gráfico que ilustra la eficacia de la respuesta a la dosis de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 contra el modelo de xenoinjerto derivado de paciente de NSCLC HLUX1787.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones.

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y frases, como se usan en este documento, tienen los siguientes significados:

El término “alquilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada saturada monovalente que tiene el número especificado de átomos de carbono. Por ejemplo, alquilo C₁₋₆ se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden ser rectos o ramificados. Los grupos alquilo ramificados representativos tienen una, dos o tres ramas. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, sin limitación, metilo, etilo, propilo (n-propilo e isopropilo), butilo (n-butilo, isobutilo, sec-butilo y t-butilo), pentilo (n-pentilo, isopentilo y neopentilo) y hexilo. El término "alquileo" es la forma bivalente de "alquilo".

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido de la familia de las inmunoglobulinas que es capaz de unirse a un antígeno correspondiente de forma no covalente, 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) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (abreviada aquí como VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera se compone de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse aún más en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el término amino hasta el término carboxi 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 o factores del huésped, incluidas diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico.

El término "anticuerpo" incluye, sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos antiidiotípicos (anti-id) (incluidos, por ejemplo, anticuerpos anti-id para anticuerpos de la invención). Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo/clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2).

Los "dominios determinantes de la complementariedad" o "regiones determinantes de la complementariedad ("CDR") se refieren de manera indistinta a las regiones hipervariables de VL y VH. Las CDR son el sitio de unión a la proteína objetivo de las cadenas de anticuerpos que alberga especificidad para dicha proteína objetivo. Hay tres CDR (CDR1–3, numeradas secuencialmente desde el término N) en cada VL o VH humana, que constituyen aproximadamente el 15–20% de los dominios variables. Las CDR son estructuralmente complementarias al epítipo de la proteína objetivo y, por lo tanto, son directamente responsables de la especificidad de unión. Los tramos restantes de la VL o VH, las llamadas regiones marco, exhiben una menor variación en la secuencia de aminoácidos (Kuby, Immunology, 4ª ed., Capítulo 4. W. H. Freeman & Co., Nueva York, 2000).

Las posiciones de las CDR y las regiones de marco pueden determinarse usando diversas definiciones bien conocidas en la técnica, por ejemplo, Kabat, Chothia, la base de datos internacional ImMunoGeneTics (IMGT) (en la web en www.imgt.org/), y AbM (ver, por ejemplo, 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 et al., *J. Mol. Biol.*, 227: 799–817 (1992); Al-Lazikani et al., *J. Mol. Biol.*, 273: 927–948 (1997)). Las definiciones de los sitios de combinación de antígenos también se describen a continuación: Ruiz et al., *Nucleic Acids Res.*, 28: 219–221 (2000); y Lefranc, M. P., *Nucleic Acids Res.*, 29: 207–209 (2001); MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 262: 732–745 (1996); y Martin et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 86: 9268 – 9272 (1989); Martin et al., *Methods Enzymol.*, 203: 121–153 (1991); y Rees et al., en Sternberg M. J. E. (ed.), *Protein Structure Prediction*, Oxford University Press, Oxford, 141–172 (1996).

Tanto la cadena ligera como la pesada se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se usan funcionalmente. En este sentido, se apreciará que los dominios variables de las porciones de cadena ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad del antígeno. De manera inversa, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren importantes propiedades biológicas tales como la secreción, la movilidad transplacentaria, la unión al receptor Fc, la unión al complemento y similares. Por convención, la numeración de los dominios de región constante aumenta a medida que se vuelven más distales con respecto al sitio de unión al antígeno o al término amino del anticuerpo. El término N es una región variable, y el término C es una región constante; los dominios CH3 y CL en realidad comprenden los dominios carboxi-terminales de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

El término "fragmento de unión a antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a una o más porciones de un anticuerpo que retienen la capacidad de interactuar específicamente con (por ejemplo, mediante la unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) un epítipo de un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de unión incluyen, sin limitación, Fv de una sola cadena (scFv), anticuerpos camélidos, Fv unidos a disulfuro (sdFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab)₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región de bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward et al., *Nature* 341: 544–546, 1989), que consiste en un dominio VH; y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, u otros fragmentos de unión a epítipo de un anticuerpo.

Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite fabricarse como una cadena de proteína única en la cual las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple ("scFv")); ver, por ejemplo, Bird et al., *Science* 242: 423–426, 1988; y Huston et al., *Proc. Natl Acad. Sci.* 85: 5879–5883, 1988). Dichos anticuerpos de cadena única también deben incluirse dentro del término "fragmento de unión a antígeno". Estos fragmentos de unión a antígeno se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan por su utilidad, de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Los fragmentos de unión a antígeno también pueden incorporarse en anticuerpos de un solo dominio, maxicuerpos, minicuerpos, anticuerpos de un solo dominio, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (ver, por ejemplo, Hollinger y Hudson, *Nature Biotechnology* 23 : 1126–1136, 2005). Los fragmentos de unión a antígeno se pueden injertar en estructuras a base de polipéptidos, tales como la fibronectina tipo III (Fn3) (ver la Patente de los Estados Unidos Nro. 6.703.199, que describe monocuerpos de polipéptidos de fibronectina).

Los fragmentos de unión a antígeno pueden incorporarse en moléculas de cadena única que comprenden un par de segmentos Fv en tándem (VH–CH1–VH–CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno

(Zapata et al., Protein Eng. 8: 1057–1062, 1995; y la Patente de los Estados Unidos Nro. 5.641.870).

El término "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos, que incluyen anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno, que tienen una 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 única especificidad de unión y afinidad para un epítipo particular.

El término "anticuerpo humano", como se usa en este documento, incluye anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones de marco como las regiones de CDR se derivan de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de tales secuencias humanas, por ejemplo, secuencias de línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de línea germinal humana, o anticuerpo que contiene secuencias de marco de consenso derivadas del análisis de secuencias de marco humanas, por ejemplo, como se describe en Knappik et al., J. Mol. Biol. 296: 57–86, 2000). También se incluyen anticuerpos derivados de secuencias humanas en las que una o más CDR se han mutado para la maduración de afinidad o para propósitos de conjugación de fabricación/carga útil. Ver Kilpatrick et al., "Desarrollo rápido de anticuerpos monoclonales madurados para afinidad utilizando RIMMS", Hybridoma. 1997 Ago; 16 (4): 381–9.

Los anticuerpos humanos de la invención 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 conservadora para promover la estabilidad o la fabricación).

El término "reconocer" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno que encuentra su epítipo e interactúa (por ejemplo, se une) con su epítipo, independientemente de si dicho epítipo es lineal o conformacional. El término "epítipo" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une específicamente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. Los epítipos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la exposición a solventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con solventes

desnaturalizantes. Un epítopo típicamente incluye por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítomos incluyen técnicas de la técnica, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional (ver, por ejemplo, "Protocolos de mapeo de epítomos", en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

El término "afinidad", como se usa en el presente documento, 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 "brazo" de anticuerpo interactúa a través de fuerzas no covalentes débiles con antígeno en numerosos sitios; cuantas más interacciones, más fuerte es la afinidad.

El término "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas. Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a un antígeno puede tener reactividad cruzada con otros antígenos. Aún más, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o productos químicos.

El término "secuencia de línea germinal humana correspondiente" se refiere a la secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia o subsecuencia de aminoácidos de región variable humana que comparte la identidad de secuencia de aminoácidos más alta determinada, con una secuencia o subsecuencia de aminoácidos de región variable de referencia en comparación con todas las otras secuencias de aminoácidos de región variable conocidas codificadas por las secuencias de región variable de inmunoglobulina de línea germinal humana. La secuencia de línea germinal humana correspondiente también puede referirse a la secuencia o subsecuencia de aminoácidos de región variable humana con la identidad de secuencia de aminoácidos más alta con una secuencia o subsecuencia de aminoácidos de región variable de referencia, en comparación con todas las otras secuencias de aminoácidos de región variable evaluadas. La secuencia de línea germinal humana correspondiente puede ser solo regiones de marco, solo regiones determinantes de complementariedad, regiones determinantes de marco y 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 este documento, por ejemplo, alineando dos secuencias usando BLAST, ALIGN u otro algoritmo de alineación conocido en la técnica. La correspondiente secuencia de ácido nucleico o aminoácidos de línea germinal humana puede

tener por lo menos alrededor de 90%, 91, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos o ácido nucleico de región variable de referencia. Las secuencias de línea germinal humana correspondientes se pueden determinar, por ejemplo, a través de la base de datos internacional ImMunoGeneTics (IMGT) disponible públicamente (en la web en www.imgt.org/) y V-base (en la web en vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk).

La frase "se une específicamente" o "se une selectivamente", cuando se usa en el contexto de la descripción de la interacción entre un antígeno (por ejemplo, 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, por ejemplo, en una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de sangre, suero, plasma o tejido. Por lo tanto, en ciertas condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos o agentes de unión con una especificidad de unión particular se unen a un antígeno particular por lo menos dos veces más que el fondo, y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otros antígenos presentes en la muestra. En una forma de realización, en condiciones de inmunoensayo designadas, el anticuerpo o agente de unión con una especificidad de unión particular se une a un antígeno particular por lo menos diez (10) veces más que 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 haya sido seleccionado por su especificidad para una proteína particular. Según se desee o sea apropiado, esta selección se puede lograr sustrayendo los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con moléculas de otras especies (por ejemplo, ratones o ratas) u otros subtipos. Alternativamente, en algunas formas de realización, se seleccionan anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con ciertas moléculas deseadas.

Se pueden usar una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan de manera rutinaria para seleccionar anticuerpos específicamente inmunoreactivos con una proteína (ver, por ejemplo, Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998), para una descripción de los formatos de inmunoensayo y las condiciones que se pueden usar. para determinar la inmunorreactividad específica). Típicamente, una reacción de unión específica o selectiva producirá una señal de

por lo menos el doble sobre la señal de fondo, y más típicamente, por lo menos de 10 a 100 veces sobre el fondo.

El término "constante de disociación de equilibrio (K_D , M)" se refiere a la constante de tasa de disociación (k_d , tiempo⁻¹) dividido por la constante de tasa de asociación (k_a , tiempo⁻¹, M⁻¹). Las constantes de disociación de equilibrio pueden medirse utilizando cualquier método conocido en la técnica. Los anticuerpos de la presente invención generalmente tendrán una constante de disociación en equilibrio de menos de alrededor de 10^{-7} o 10^{-8} M, por ejemplo, menos de alrededor de 10^{-9} M o 10^{-10} M, en algunas formas de realización, menos de alrededor de 10^{-11} M, 10^{-12} M o 10^{-13} M.

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

Como se usa en el presente documento, la frase "que consiste esencialmente en" se refiere a los géneros o especies de agentes farmacéuticos activos incluidos en un método o en una composición, así como a cualquier excipiente inactivo para el propósito previsto de los métodos o de las composiciones. En algunas formas de realización, la frase "que consiste esencialmente en" excluye expresamente la inclusión de uno o más agentes activos adicionales distintos de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención. En algunas formas de realización, la frase "que consiste esencialmente en" excluye expresamente la inclusión de uno o más agentes activos adicionales distintos de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención y un segundo agente coadministrado.

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

Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido natural.

El término "variante modificada de manera conservadora" se aplica tanto a las
 5 secuencias de aminoácidos como a las de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes modificadas de manera conservadora se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de
 10 ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína determinada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición donde se especifica una alanina por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descriptos, sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son una especie de
 15 variaciones modificadas de manera conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento 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 normalmente es el único codón para metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para triptófano) puede modificarse para producir una molécula
 20 funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descripta.

Para las secuencias polipeptídicas, las "variantes modificadas de manera conservadora" incluyen sustituciones individuales, delecciones o adiciones a una secuencia polipeptídica que producen la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas
 25 de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservadora son adicionales, y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecies y alelos de la invención. 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),
 30 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 algunas formas de realización, el término "modificaciones de secuencia conservadoras" se usa para

referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan ni alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos.

El término "optimizado" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de nucleótidos que se ha alterado para codificar una secuencia de aminoácidos usando codones que se prefieren en la célula u organismo de producción, generalmente una célula eucariota, por ejemplo, una célula de levadura, una célula de *Pichia*, una célula fúngica, una célula de *Trichoderma*, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada está diseñada para retener completamente o tanto como sea posible la secuencia de aminoácidos codificada originalmente por la secuencia de nucleótidos de partida, que también se conoce como secuencia "parental".

Los términos "por ciento idéntica" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a la medida en que dos o más secuencias o subsecuencias son iguales. 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, 60% de identidad, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% de identidad sobre una región específica, o, cuando no se especifica, sobre toda la secuencia), cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o región designada según lo medido utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias, o por alineación manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que tiene por lo menos alrededor de 30 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud, o más preferiblemente, sobre una región que es de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en una computadora, las coordenadas de subsecuencia se designan, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Se pueden usar los parámetros del programa por defecto, o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias luego calcula el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, en función de los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se usa en este documento, incluye una referencia a un segmento de cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en 20 a 600, generalmente alrededor de 50 a alrededor de 200, más generalmente, alrededor de 100 a alrededor de 150, en las que una secuencia puede compararse con una
 5 secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias están alineadas de manera óptima. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482c (1970), por el algoritmo de alineación de
 10 homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl Acad Sci. USA* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineación manual e inspección visual (ver, por ejemplo, Brent et al.,
 15 *Current Protocols in Molecular Biology*, 2003).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25: 3389–3402, 1977; y Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403–410, 1990, respectivamente. El soporte lógico para realizar los análisis de
 20 BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Este algoritmo involucra primero la identificación de pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que o bien coinciden o satisfacen alguna puntuación de umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se conoce
 25 como el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul et al., supra). Estos aciertos de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas a fin de encontrar HSP más largas que los contengan. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se puede aumentar la puntuación de alineación acumulativa. Las puntuaciones acumuladas se calculan utilizando, para secuencias de
 30 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 las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección

se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulativa cae en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; el puntaje acumulativo llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntaje negativo; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como predeterminados una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$ y una comparación de ambas hebras. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como predeterminados una longitud de palabra de 3, y una expectativa (E) de 10, y las alineaciones de matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915) (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$ y una comparación de ambas hebras.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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 cual 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 prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que alrededor de 0,2, más preferiblemente, menor que alrededor de 0,01, y más preferiblemente, menor que alrededor de 0,001.

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 incorporó al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 444–453 (1970), que se incorporó al programa GAP en el paquete de soporte lógico GCG (disponible en www.gcg.com), utilizando o bien una matriz BLOSUM62 o una matriz PAM250 y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Aparte del porcentaje de identidad de secuencia indicado anteriormente, otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo en forma cruzada con los anticuerpos generados contra el polipéptido codificado por el segundo núcleo

ácido, como se describe a continuación. Por lo tanto, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, donde los dos péptidos difieren solo por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación. Otra indicación más de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que se pueden usar los mismos cebadores para amplificar la secuencia.

El término "ácido nucleico" se usa en este documento de manera indistinta con el término "polinucleótido", y se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y sus polímeros en forma de hebra simple o doble. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o uniones o residuos de espinazo modificados, que son sintéticos, naturales y no naturales, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, ribonucleótidos 2-O-metilo, ácidos peptídicos nucleicos (PNA, conforme a sus siglas en inglés).

A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico también abarca implícitamente sus variantes modificadas de manera conservadora (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, como se detalla a continuación, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr mediante la 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 et al., (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).

El término "unido operativamente" en el contexto de los ácidos nucleicos se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de polinucleótidos (por ejemplo, ADN). Típicamente, se refiere a la relación funcional de una secuencia reguladora de la transcripción con una secuencia transcripta. Por ejemplo, una secuencia promotora o mejoradora está unida operativamente a una secuencia de codificación si estimula o modula la transcripción de la secuencia de codificación en una célula huésped apropiada u otro sistema de expresión. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción promotoras que están unidas operativamente a una secuencia transcripta son físicamente contiguas a la secuencia transcripta, es decir, son de acción cis. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras de la transcripción,

tales como los mejoradores, no necesitan ser físicamente contiguas o estar ubicadas en estrecha proximidad de las secuencias codificadoras cuya transcripción mejoran.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan de manera indistinta en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos naturales y polímeros de aminoácidos no naturales. A menos que se indique lo contrario, una secuencia polipeptídica particular también abarca implícitamente sus variantes modificadas de manera conservadora.

El término "conjugado de fármaco y anticuerpo" o "inmunoconjugado", como se usa en el presente documento, se refiere a la unión de un anticuerpo o de su fragmento de unión a antígeno con otro agente, tal como un agente quimioterapéutico, una toxina, un agente inmunoterapéutico, una sonda de imágenes y similares. La unión puede ser de enlaces covalentes, o interacciones no covalentes, tal como a través de fuerzas electrostáticas. Se pueden emplear diversos enlazadores, conocidos en la técnica, para formar el conjugado de fármaco y anticuerpo. Además, el conjugado de fármaco y anticuerpo puede proporcionarse en forma de una proteína de fusión que puede expresarse a partir de un polinucleótido que codifica el inmunoconjugado. Como se usa en este documento, "proteína de fusión" se refiere a proteínas creadas a través de la unión de dos o más genes o fragmentos de genes que originalmente codificaron proteínas separadas (incluidos los péptidos y polipéptidos). La traducción del gen de fusión produce una proteína única con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales.

El término "sujeto" incluye humanos y animales no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios y reptiles. Excepto cuando se indique lo contrario, los términos "paciente" o "sujeto" se usan aquí de manera intercambiable.

El término "citotoxina", o "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier agente que sea perjudicial para el crecimiento y la proliferación de células, y que pueda actuar para reducir, inhibir o destruir una célula o tumor maligno.

El término "agente contra el cáncer", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier agente que se puede usar para tratar o prevenir un trastorno de proliferación celular como el cáncer, que incluye, entre otros, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos,

radioterapia y agentes radioterapéuticos, agentes contra el cáncer dirigidos y agentes inmunoterapéuticos.

El término "resto de fármaco" o "carga útil", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto químico que se conjuga con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención, y puede incluir cualquier agente terapéutico o de diagnóstico, por ejemplo, un agente contra el cáncer, antiinflamatorio, antiinfeccioso (p. ej., antifúngico, antibacteriano, antiparasitario, antiviral) o un agente anestésico. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser un agente contra el cáncer, tal como una citotoxina. En ciertas formas de realización, un resto de fármaco se selecciona de un inhibidor de la V-ATPasa, un inhibidor de HSP90, un inhibidor IAP, un inhibidor de mTor, un estabilizador de microtúbulos, un desestabilizador de microtúbulos, una auristatina, una dolastatina, un maitansinoide, un MetAP (metionina aminopeptidasa), un inhibidor de la ARN polimerasa, una pirrolobenzodiazepina (PBD), una amanitina, un inhibidor de la exportación nuclear de proteínas CRM1, un inhibidor de DPPIV, un inhibidor de las reacciones de transferencia de fosforilo en las mitocondrias, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inhibidor de la quinasa, un inhibidor de CDK2, un inhibidor de CDK9, un inhibidor de proteasoma, un inhibidor de quinesina, un inhibidor de HDAC, un agente dañino de ADN, un agente alquilante de ADN, un intercalador de ADN, un ligante del surco menor del ADN y un inhibidor de DHFR. Los métodos para unir cada uno de estos a un enlazador compatible con los anticuerpos y el método de la invención son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Singh et al., (2009), *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*, vol. 525, 445–457. Además, una carga útil puede ser una sonda biofísica, un fluoróforo, una etiqueta espín, una sonda de infrarrojos, una sonda de afinidad, un quelante, una sonda espectroscópica, una sonda radiactiva, una molécula lipídica, un polietilenglicol, un polímero, un etiqueta espín, 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.

El término "resto de fármaco maitansinoide" significa la subestructura de un conjugado de anticuerpo–fármaco que tiene la estructura de un compuesto maitansinoide. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (Patente de los Estados Unidos Nro. 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, como el maitansinol y los ésteres del maitansinol C–3 (Patente de los Estados Unidos Nro. 4.151.042). Se han informado análogos de maitansinol y maitansinol sintético. Ver las Patentes de los Estados Unidos Nros. 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 una de las cuales se incorpora expresamente por referencia. Ejemplos de maitansinoides específicos útiles para la conjugación incluyen DM1, DM3 y DM4.

"Tumor" se refiere al crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas, y a todas las células y los tejidos precancerosos y cancerosos.

El término "actividad antitumoral" significa una reducción en la tasa de proliferación, viabilidad o actividad metastásica de las células tumorales. Por ejemplo, la actividad antitumoral se puede mostrar por una disminución en la tasa de crecimiento de células anormales que surge durante la terapia, o la reducción o estabilidad del tamaño del tumor, o una mayor sobrevida debido a la terapia en comparación con el control sin terapia. Dicha actividad puede evaluarse utilizando modelos de tumores *in vitro* o *in vivo* aceptados, incluidos, entre otros, modelos de xenoinjertos, modelos de aloinjertos, modelos de MMTV (virus tumoral mamario de ratón, conforme a sus siglas en inglés) y otros modelos conocidos en la técnica para investigar la actividad antitumoral.

El término "tumor maligno" se refiere a un tumor no benigno o un cáncer. Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" incluye un tumor maligno caracterizado por un crecimiento celular desregulado o no regulado. Los tipos de cáncer ejemplares incluyen: carcinomas, sarcomas, leucemias y linfomas.

El término "cáncer" incluye tumores malignos primarios (por ejemplo, aquellos cuyas células no han migrado a sitios en el organismo del sujeto, diferentes del sitio del tumor original) y tumores malignos secundarios (por ejemplo, aquellos que surgen de la metástasis, la migración de células tumorales a sitios secundarios que son diferentes del sitio del tumor original).

El término "CCR7" (también conocido como BLR2, CC-CKR-7, CCR-7, CD197, CDw197, CMKBR7, EBI1, o receptor de quimioquina con motivo CC 7) se refiere a un miembro de la familia de receptores acoplados a la proteína G. La secuencia de ácidos nucleicos y aminoácidos de CCR7 humano se ha publicado en GenBank con los siguientes números de acceso: NP_001829, NP_001288643, NP_001288645, NP_001288646, NP_001288647 (secuencias de aminoácidos) y NM_001838, NM_001301714, NM_001301716, NM_001301717, NM_001301718 (secuencias de nucleótidos). Tal como se usa aquí, el

término "CCR7" se emplea para referirse colectivamente a todas las isoformas naturales de proteína CCR7, o a una de sus variantes.

El término "variante" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a un polipéptido de referencia, o está codificado por una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica, y es capaz de tener una o más actividades del polipéptido de referencia. Por ejemplo, una variante puede tener alrededor de 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencia con un polipéptido de referencia, mientras que a la vez retiene una o más actividades del polipéptido de referencia.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refieren, en una forma de realización, a la mejora de la enfermedad o del trastorno (es decir, ralentizar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o de por lo menos uno de sus síntomas clínicos). En otra forma de realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a aliviar o mejorar por lo menos un parámetro físico, incluidos aquellos que pueden no ser discernibles por el paciente. En otra forma de realización más, "tratar" o "tratamiento" se refiere a la modulación de la enfermedad o del trastorno, o bien físicamente (por ejemplo, la estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (por ejemplo, la estabilización de un parámetro físico), o ambos.

Como se usa en el presente documento, el término "prevenir" o "prevención", respecto de cualquier enfermedad o trastorno, se refiere al tratamiento profiláctico de la enfermedad o el trastorno, o al retraso del inicio o la progresión de la enfermedad o el trastorno.

El término "cantidad terapéuticamente aceptable" o "dosis terapéuticamente efectiva" se refiere de manera indistinta a una cantidad suficiente para lograr el resultado deseado (es decir, una reducción en el tamaño del tumor, inhibición del crecimiento tumoral, prevención de la metástasis, inhibición o prevención de la infección viral, bacteriana, fúngica o parasitaria). En algunas formas de realización, una cantidad terapéuticamente aceptable no induce ni causa efectos secundarios indeseables. En algunas formas de realización, una cantidad terapéuticamente aceptable induce o causa efectos secundarios, pero solo aquellos que son aceptables por los proveedores de atención médica en vista de la condición del paciente. Se puede determinar una cantidad terapéuticamente aceptable administrando primero una dosis baja, y luego incrementando esa dosis de manera incremental hasta lograr el efecto deseado. Una "dosificación profilácticamente efectiva/eficaz" y una "dosificación terapéuticamente efectiva/eficaz" de las moléculas de la invención pueden prevenir el inicio, o producir la

disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, respectivamente, incluidos los síntomas asociados con el cáncer.

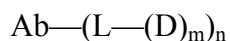
El término "coadministrar" se refiere a la presencia de dos agentes activos en la sangre de un individuo. Los agentes activos que se administran conjuntamente pueden suministrarse en forma concurrente o secuencial.

La presente invención proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) y sus conjugados de fármaco, es decir, conjugados de fármaco y anticuerpo o ADC, que se unen a CCR7. En particular, la presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se unen a CCR7, y que se internalizan con dicha unión. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) de la presente invención pueden usarse para producir conjugados de fármaco y anticuerpo. Además, la presente invención proporciona conjugados de fármacos y anticuerpos que tienen características farmacocinéticas deseables y otros atributos deseables, y por lo tanto se pueden usar para tratar o prevenir un cáncer que expresa CCR7. La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de anticuerpos y fármacos de la invención, y métodos para preparar y usar dichas composiciones farmacéuticas para el tratamiento o la prevención del cáncer.

Conjugados de fármacos y anticuerpos.

La presente invención proporciona conjugados de fármacos y anticuerpos, también denominados inmunoconjugados, donde un anticuerpo, o su fragmento de unión a antígeno o su equivalente funcional que se une específicamente a CCR7, se une a un resto de fármaco. En un aspecto, los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno o sus equivalentes funcionales de la invención se unen mediante unión covalente por un enlazador, a un resto de fármaco que es un agente contra el cáncer. Los conjugados de anticuerpos y fármacos de la invención pueden suministrar una dosis efectiva de un agente contra el cáncer (por ejemplo, un agente citotóxico) a los tejidos tumorales que expresan CCR7, por lo que se puede lograr una mayor selectividad (y una menor dosis eficaz).

En un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado de Fórmula (I):



donde Ab representa anticuerpo de unión a CCR7 descrito en este documento;

L es un enlazador;

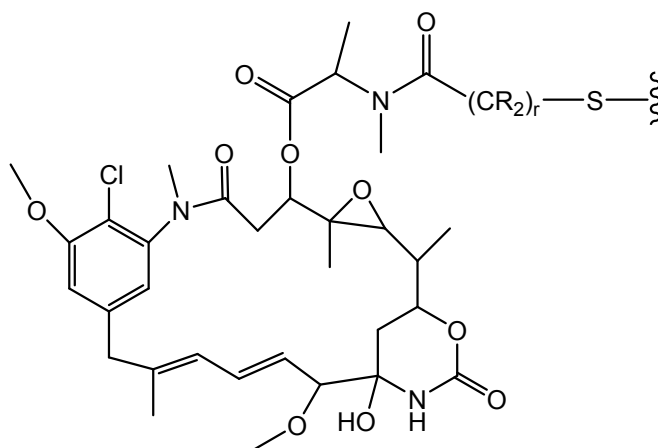
D es un resto de fármaco;

m es un número entero de 1 a 8; y

n es un número entero de 1–20. En una forma de realización, n es un número entero de 1 a 10, 2 a 8, o 2 a 5. En una forma de realización específica, n es 2, 3, o 4. En algunas formas de realización, m es 1; en otras formas de realización, m es 2, 3 o 4.

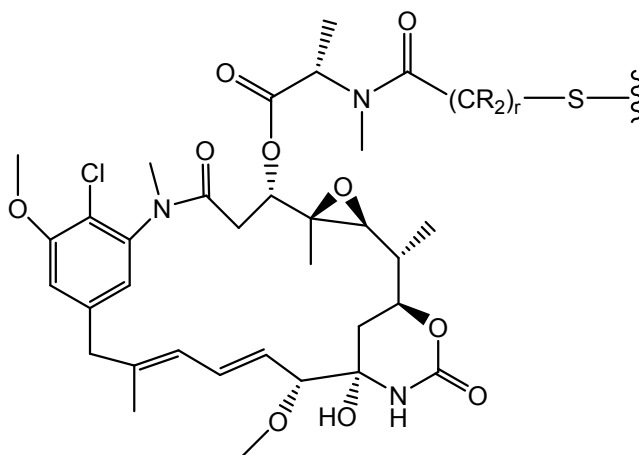
Mientras que la relación de fármaco a anticuerpo tiene un valor exacto para una molécula de conjugado específica (por ejemplo, n multiplicado por m en la Fórmula (I)), se entiende que el valor será a menudo un valor promedio cuando se usa para describir una muestra que contiene muchas moléculas, debido a un cierto grado de heterogeneidad, típicamente asociado con la etapa de conjugación. La carga promedio para una muestra de un inmunoconjugado se refiere aquí como la relación de fármaco a anticuerpo, o "DAR" (conforme a sus siglas en inglés). En algunas formas de realización, cuando el fármaco es un maitansinoide, se denomina "MAR". En algunas formas de realización, el DAR está entre alrededor de 2 y alrededor de 6, y típicamente, es alrededor de 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0. En algunas formas de realización, por lo menos el 50% de una muestra en peso es un compuesto que tiene un DAR promedio más o menos 2, y preferiblemente por lo menos el 50% de la muestra es un conjugado que contiene un DAR promedio más o menos 1. Las formas de realización incluyen inmunoconjugados en los que el DAR es alrededor de 3,5, 3,6, 3,7, 3,8 o 3,9. En algunas formas de realización, un DAR de 'alrededor de n' significa que el valor medido para DAR está dentro del 20% de n.

La presente invención también está dirigida a inmunoconjugados que comprenden los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) y sus equivalentes funcionales como se describen en el presente documento, unidos o conjugados a un resto de fármaco. En una forma de realización, el resto de fármaco D es un resto de fármaco maitansinoide, incluidos aquellos que tienen la estructura:

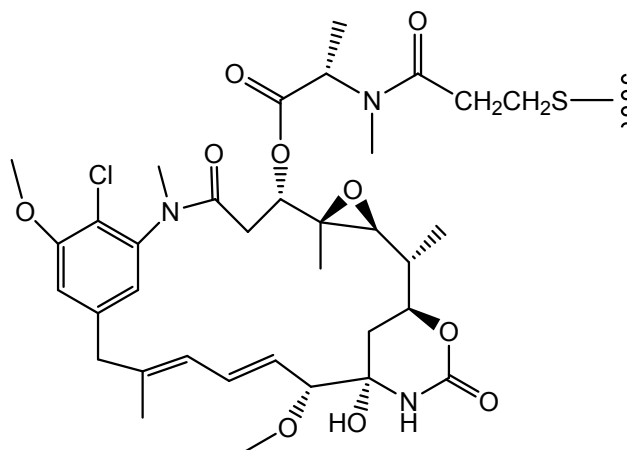


donde la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre del maitansinoide a un enlazador de un conjugado de fármaco y anticuerpo. R en cada aparición es de manera independiente H o un C₁–C₆ alquilo. La cadena de alquileo que une el grupo amida al átomo de azufre puede ser metanilo, etanilo o propilo, es decir, r es 1, 2, o 3 (Patente de los Estados Unidos Nro. 633.410, Patente de los Estados Unidos Nro. 5.208.020, Chari *et al.* (1992) Cancer Res. 52; 127–131, Lui *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 8618–8623).

Se contemplan todos los estereoisómeros del resto de fármaco maitansinoide para los immunoconjugados de la invención, es decir, cualquier combinación de configuraciones R y S en los carbonos quirales del maitansinoide. En una forma de realización, el resto de fármaco maitansinoide tiene la siguiente estereoquímica.



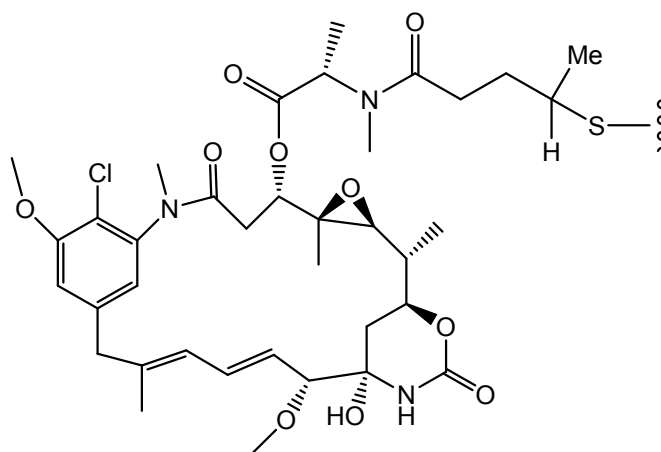
En una forma de realización, el resto de fármaco maitansinoide es N^{2'}–deacetil–N^{2'}–(3–mercapto–1–oxopropil)–maitansina (también conocida como DM1). DM1 es representada por la siguiente fórmula estructural:



DM1

En otra forma de realización, el resto de fármaco maitansinoide es $N^{2'}$ -deacetil- $N^{2'}$ -(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (también conocida como DM3). DM3 es representada por

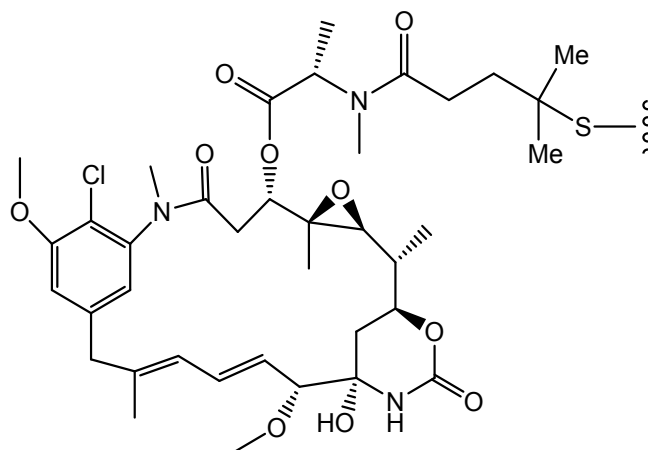
5 la siguiente fórmula estructural:



DM3

En otra forma de realización, el resto de fármaco maitansinoide es $N^{2'}$ -deacetil- $N^{2'}$ -(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (también conocida como DM4). DM4 es

10 representada por la siguiente fórmula estructural:



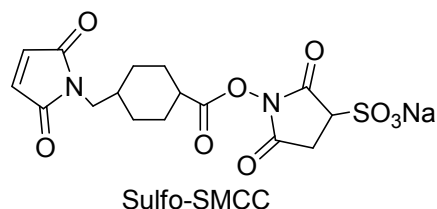
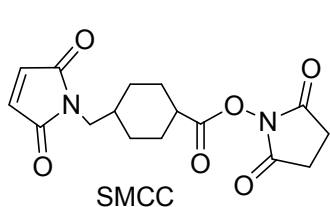
DM4

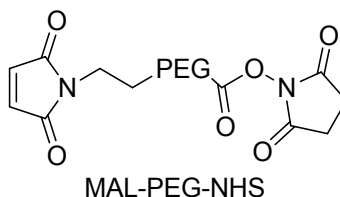
El resto de fármaco D se puede unir al anticuerpo Ab a través del enlazador L. L es cualquier resto químico capaz de unir el resto de fármaco al anticuerpo a través de enlaces covalentes. Un reactivo de reticulación es un reactivo bifuncional o multifuncional que se puede usar para enlazar un resto de fármaco y un anticuerpo para formar conjugados de fármaco y anticuerpo. Los conjugados de fármaco y anticuerpo pueden prepararse utilizando un reactivo de reticulación que tiene una funcionalidad reactiva capaz de unirse tanto al resto de fármaco como al anticuerpo. Por ejemplo, una cisteína, tiol o una amina, p. ej., el término N o una cadena lateral de aminoácido, tal como lisina del anticuerpo, puede formar un enlace con un grupo funcional de un reactivo de reticulación. Alternativamente, los conjugados de fármaco y anticuerpo pueden prepararse formando previamente un enlazador–resto de fármaco (o resto de enlazador–fármaco, ambos términos se usan indistintamente), y haciendo reaccionar el enlazador–resto de fármaco con el anticuerpo. En algún momento, el resto de enlazador se construye sobre el fármaco por etapas utilizando varios restos enlazantes hasta obtener el resto de enlazador–fármaco deseado.

En una forma de realización, L es un enlazador escindible. En otra forma de realización, L es un enlazador no escindible. En algunas formas de realización, L es un enlazador lábil al ácido, un enlazador fotolábil, un enlazador escindible por peptidasa, enlazador escindible por esterasa, un enlazador escindible por enlace de disulfuro, un enlazador hidrófilo, un enlazador procargado, un enlazador escindible por glicosidasa, un enlazador escindible por fosfodiesterasa, un enlazador escindible por fosfatasa, o un enlazador a base de ácido dicarboxílico.

Los reactivos de reticulación adecuados que forman un enlazador no escindible entre el resto de fármaco, por ejemplo, maitansinoide, y el anticuerpo son bien conocidos en la técnica, y pueden formar enlazadores no escindibles que comprenden un átomo de azufre (tal como SMCC) o aquellos que están sin un átomo de azufre. Los reactivos de reticulación preferidos que forman enlazadores no escindibles entre el resto de fármaco, por ejemplo, maitansinoide, y el anticuerpo comprenden un resto a base de maleimido o haloacetilo. De acuerdo con la presente invención, se dice que dichos enlazadores no escindibles derivan de restos a base de maleimido o haloacetilo.

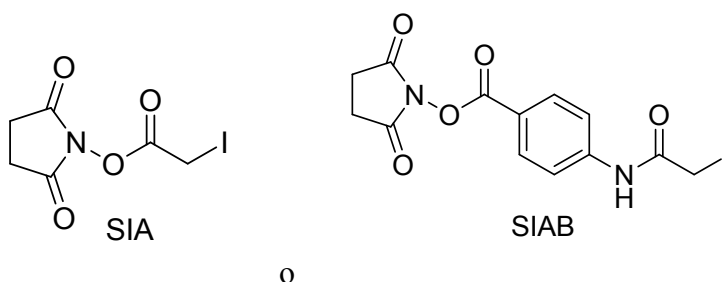
Los reactivos de reticulación que comprenden un resto a base de maleimido incluyen, sin limitación, *N*-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), sulfosuccinimidil 4-(*N*-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC), *N*-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato), que es un análogo de “cadena larga” de SMCC (LC-SMCC), *N*-succinimidil éster de ácido κ -maleimidoundecanoico (KMUA), *N*-succinimidil éster de ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), *N*-succinimidil éster de ácido ϵ -maleimidocaproico (EMCS), éster de *m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida (MBS), éster de *N*-(α -maleimidoacetoxi)-succinimida (AMSA), succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), *N*-succinimidil-4-(*p*-maleimidofenil)-butirato (SMPB), *N*-(*p*-maleimidofenil)isocianato (PMIP) y reactivos reticulantes a base de maleimido que contienen un espaciador de polietilenglicol tal como MAL-PEG-NHS. Estos reactivos de reticulación forman enlazadores no escindibles derivados de restos a base de maleimido. Estructuras representativas de reactivos de reticulación a base de maleimido se muestran a continuación.





En otra forma de realización, el enlazador L deriva de *N*-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), sulfosuccinimidil 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) o MAL-PEG-NHS.

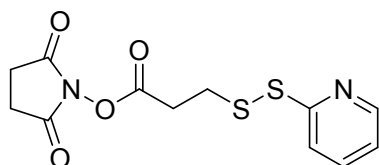
5 Los reactivos de reticulación que comprenden un resto a base de haloacetilo incluyen *N*-succinimidil yodoacetato (SIA), *N*-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato (SIAB), *N*-succinimidil bromoacetato (SBA) y *N*-succinimidil 3-(bromoacetamido)propionato (SBAP). Estos reactivos de reticulación forman un enlazador no escindible derivado de restos a base de haloacetilo. Las estructuras representativas de reactivos de reticulación a base de haloacetilo
10 se muestran a continuación.



En una forma de realización, el enlazador L deriva de *N*-succinimidil yodoacetato (SIA) o *N*-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato (SIAB).

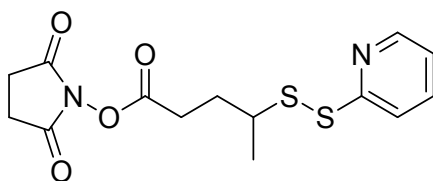
15 Los reactivos de reticulación adecuados que forman un enlazador escindible entre el resto de fármaco, por ejemplo, maitansinoide, y el anticuerpo son bien conocidos en la técnica. Los enlazadores que contienen disulfuro son enlazadores escindibles a través del intercambio de disulfuro, que puede ocurrir en condiciones fisiológicas. De acuerdo con la presente invención, se dice que dichos enlazadores escindibles derivan de restos a base de disulfuro. Los
20 reactivos de reticulación disulfuro 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 (sulfo-SPDB), cuyas estructuras se muestran a continuación. Estos reactivos

de reticulación de disulfuro forman un enlazador escindible derivado de restos a base de disulfuro.

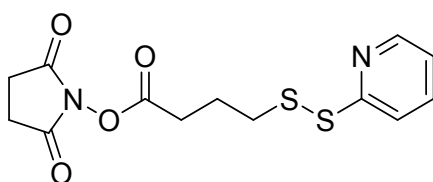


5

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

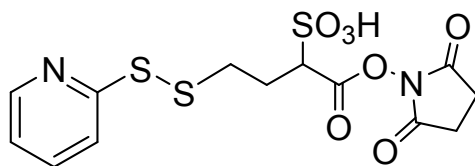


N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP),



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

10

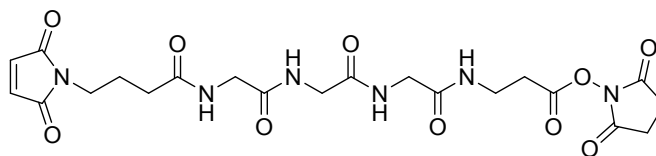


N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB).

En una forma de realización, el enlazador L deriva de N-succinimidil-4-(2-piridilditio) butanoato (SPDB).

15

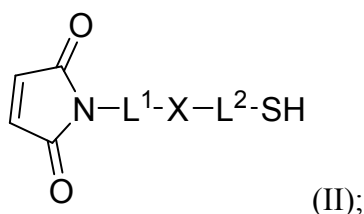
Los reactivos de reticulación adecuados que forman un enlazador cargado entre el resto de fármaco, por ejemplo, maitansinoide, y el anticuerpo son conocidos como reactivos de reticulación procargados. En una forma de realización, el enlazador L deriva del reactivo de reticulación procargado CX1-1. La estructura de CX1-1 se muestra 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)

5 Cada uno de los reactivos de reticulación representados anteriormente contiene, en un extremo del reactivo de reticulación, un éster de NHS que reacciona con una amina primaria del anticuerpo para formar un enlace de amida y, en el otro extremo, un grupo maleimida o grupo piridinildisulfuro que reacciona con el sulfhidrilo del resto de fármaco maitansinoide para formar un enlace de tioéter o disulfuro.

10 En otra forma de realización, los restos de reticulación adecuados que forman un enlazador escindible entre el resto de fármaco (por ejemplo, maitansinoide) y el anticuerpo están representados por la siguiente fórmula (II):



15 donde:

L^1 es un C_{1-6} alquileo donde uno de los grupos metileno puede estar reemplazado con oxígeno;

L^2 es un C_{1-6} alquileo o es $-(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ donde y es 1 a 11; y

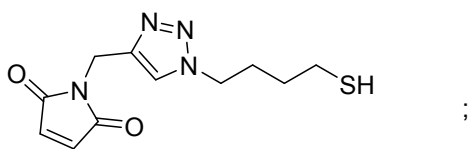
X es $-C(O)-NH-$, $-NHC(O)-$ o un triazol;

20 donde el alquileo es lineal o ramificado.

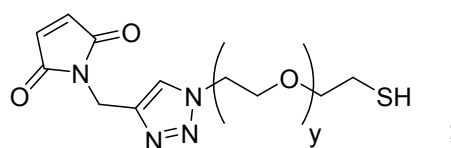
En un aspecto de esta forma de realización, y es 5, 7, 9 u 11. En otro aspecto de esta forma de realización, y es inferior a 5.

En aún otra forma de realización, los restos de reticulación adecuados de acuerdo con la Fórmula I se seleccionan del grupo que consiste en:

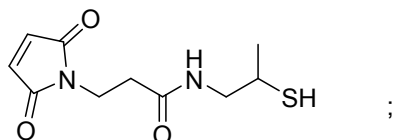
25



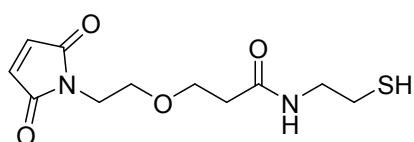
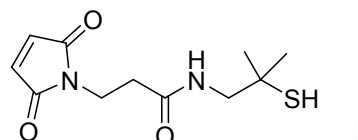
MaleimidoMetilTriazolButanoTiol (MMTBT)



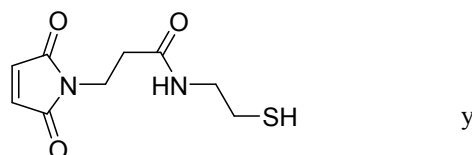
MPBT: MaleimidoPropionamidoButilTio



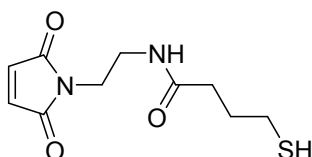
MPPT: MaleimidoPropionamidoPropanoTio



MEPET: MaleimidoEtoxiPropionamidoEtilTio



MPET: MaleimidoPropionamidoEtilTio

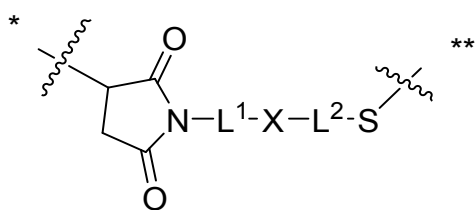


MBT: MaleimidoEtilButanamidoTio

donde y es 1 a 11.

Para los restos de reticulación representados anteriormente (es decir, MBT, MPET, MEPET; MMTBT, MPPT, MPBT), el grupo maleimida permite la reacción con el sulfhidrilo (o tiol) de una cisteína en un anticuerpo, de modo de formar un enlace de tioéter; y la funcionalidad tiol del resto de reticulación está conectada al tiol del resto de fármaco maitansinoide para formar un enlace de disulfuro escindible. En vista de la naturaleza de reacción cruzada del resto de enlace de Fórmula (I) (el tiol y la maleimida podrían reaccionar de manera cruzada), un experto en la técnica apreciará que el resto de enlace debe construirse paso a paso sobre el resto de fármaco como se muestra en el Esquema 1.

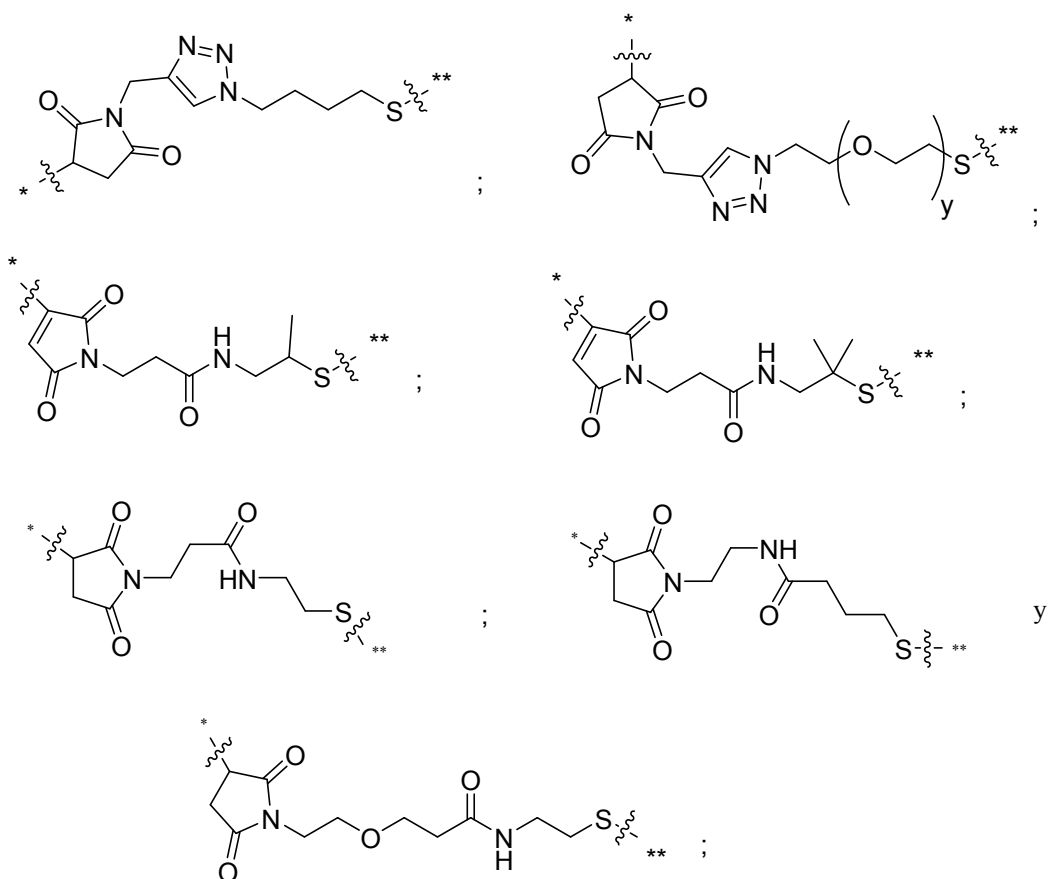
De acuerdo con la forma de realización anterior, los enlazadores resultantes de los restos de reticulación (es decir, MBT, MPET, MEPET) pueden representarse de la siguiente manera:



(IIA);

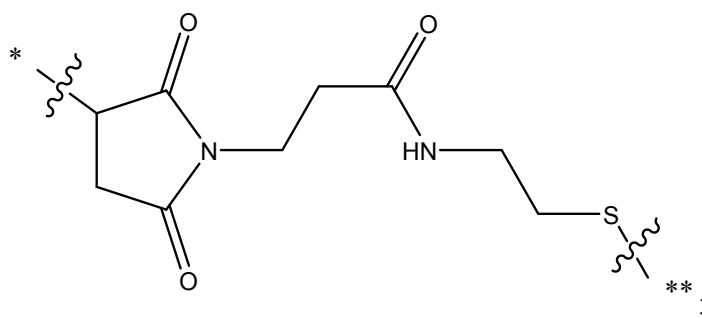
donde * está unido a la funcionalidad tiol en el anticuerpo, y ** está unido a la funcionalidad tiol de un resto de fármaco (por ejemplo, resto de fármaco maitansinoide DM1, DM3 o DM4).

5 De acuerdo con la forma de realización anterior, los enlazadores que resultan de restos de reticulación (es decir, MBT, MPET, MEPET) pueden representarse de la siguiente manera:



donde y es 1 a 11; * está unido a la funcionalidad tiol en el anticuerpo, y ** está unido a la funcionalidad tiol del resto de fármaco (por ejemplo, resto maitansinoide DM1, DM3 o DM4).

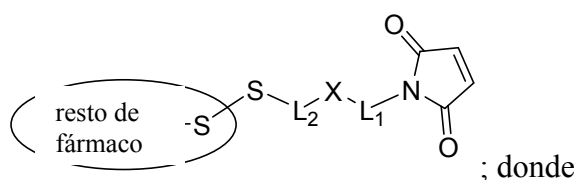
En una forma de realización preferida, el enlazador tiene la siguiente Fórmula:



donde * está unido a la funcionalidad tiol en el anticuerpo, y ** está unido a la funcionalidad tiol del fármaco maitansinoide (DM1, DM3 o DM4)

En una forma de realización, la invención se refiere al enlazador-resto de fármaco de

5 Fórmula:



L^1 es un C_{1-6} alquileo donde uno de los grupos metileno puede estar reemplazado con oxígeno;

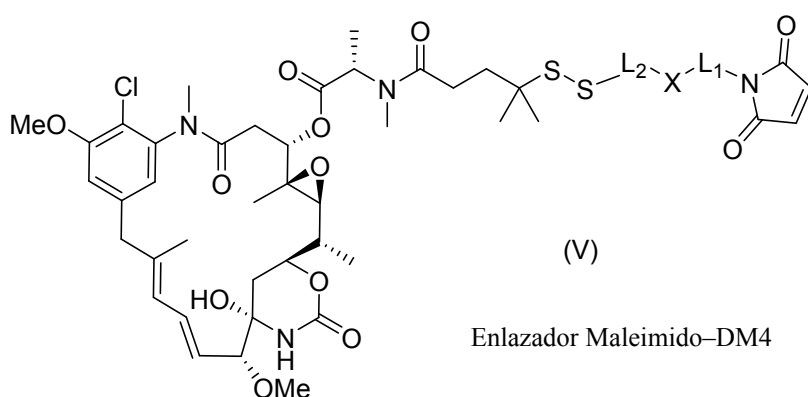
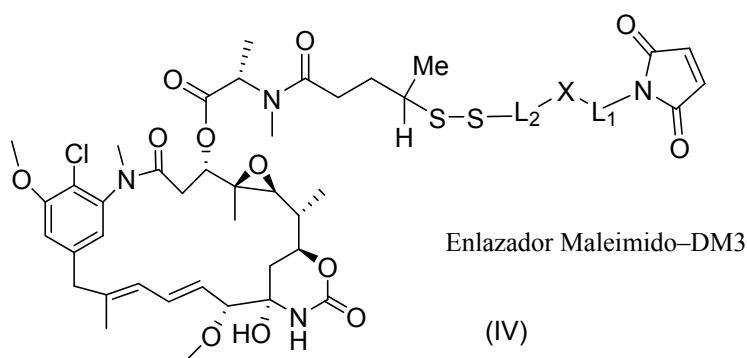
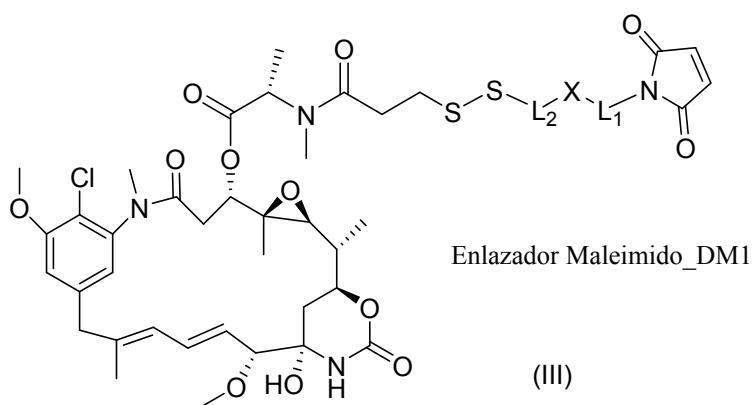
L^2 es un C_{1-6} alquileo o es $-(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ donde y es 1 a 11; y

10 X es $-C(O)-NH-$, $-NHC(O)-$ o un triazol;

donde el alquileo es lineal o ramificado.

En otra forma de realización, la invención se refiere a la formación por etapas del conjugado enlazador-fármaco anterior como se describe en el Esquema 1 de este documento.

En una forma de realización, la invención se refiere a los compuestos de resto de
15 fármaco enlazador que tienen una de las siguientes fórmulas (III), (IV) y (V):



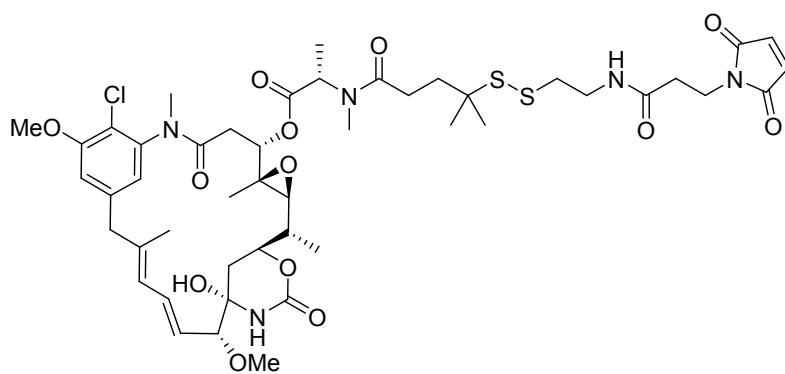
donde L^1 es un C_{1-6} alquileo donde uno de los grupos metileno puede estar reemplazado con oxígeno;

L^2 es un C_{1-6} alquileo o es $-(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ donde y es 1 a 11; y

5 X es $-C(O)-NH-$, $-NHC(O)-$ o un triazol;

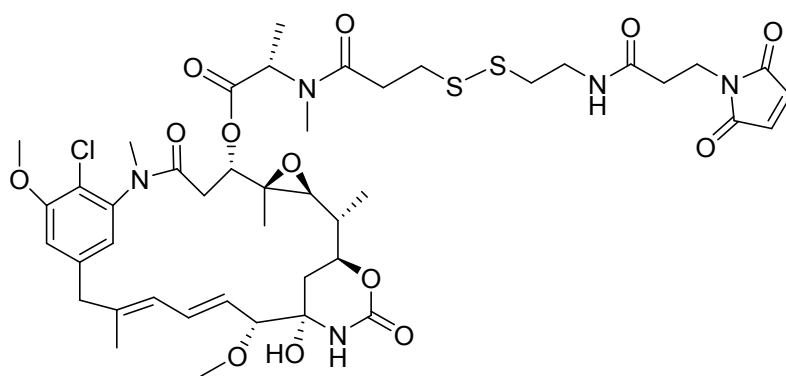
donde el alquileo es lineal o ramificado.

En una forma de realización, la invención se refiere a los compuestos de enlazador-resto de fármaco que son seleccionados de las siguientes fórmulas:



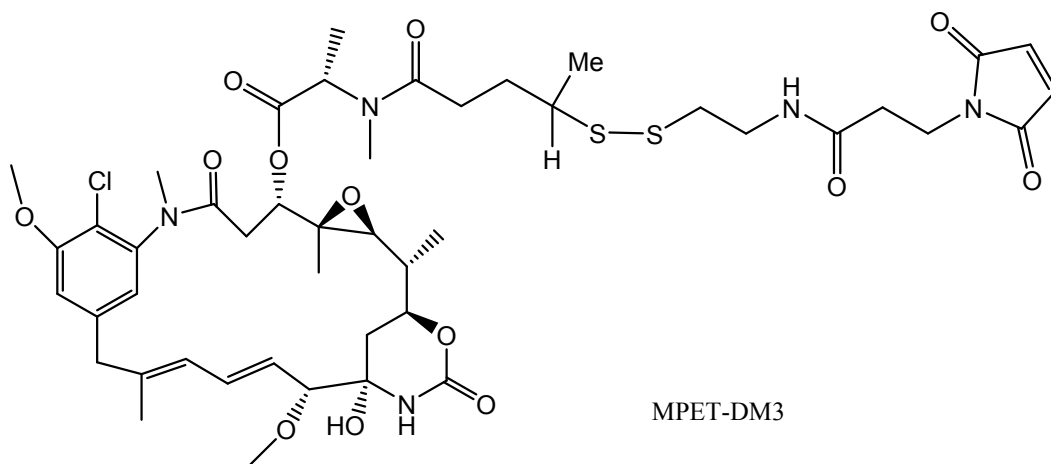
MPET-DM4

;



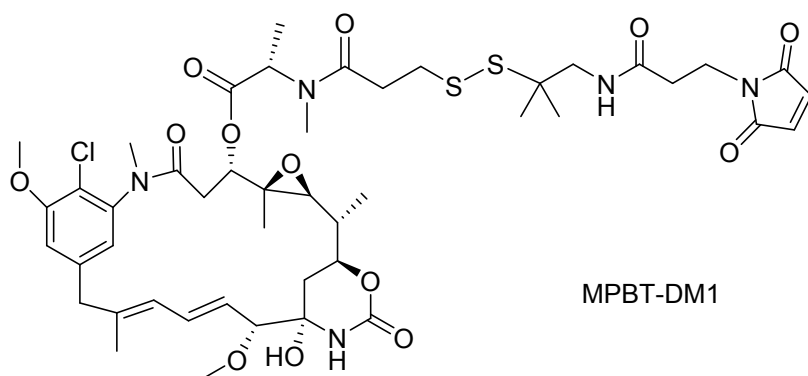
MPET-DM1

;

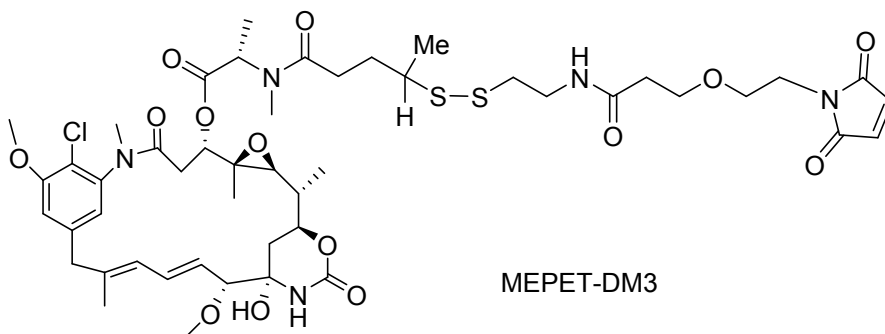
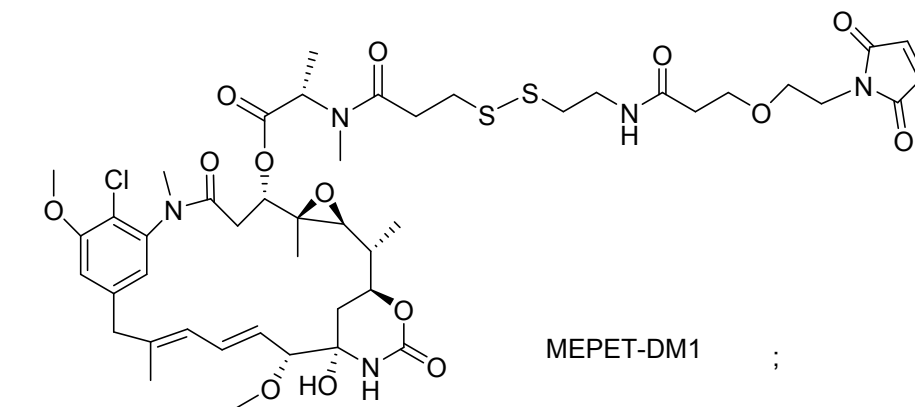
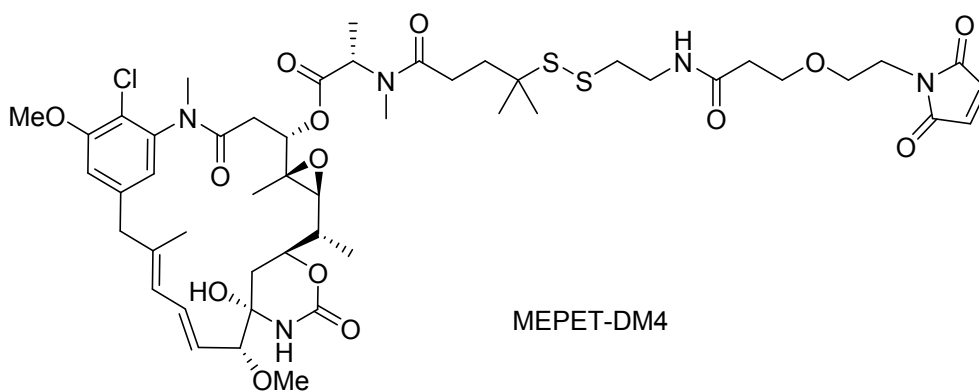


MPET-DM3

; y

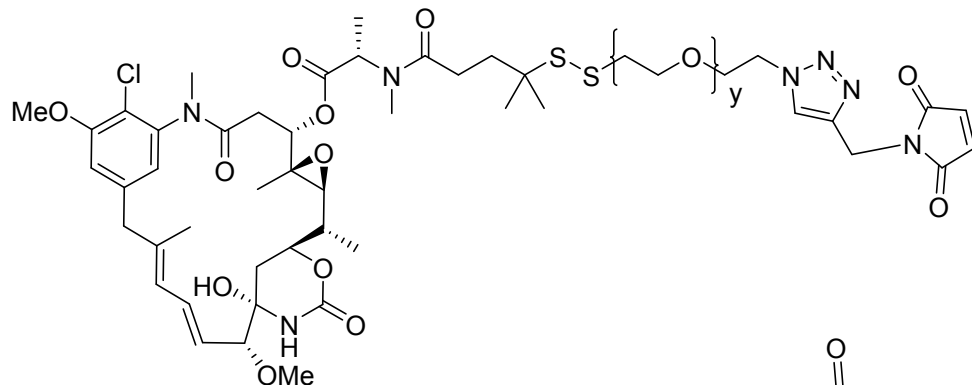


En otra forma de realización, la invención se refiere a los compuestos de enlazador-resto de fármaco que son seleccionados de las siguientes fórmulas:

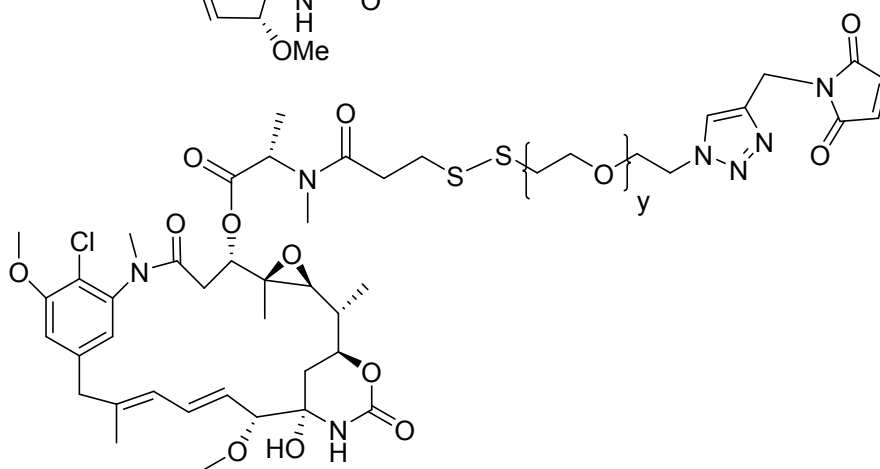


En otra forma de realización, el enlazador-fármaco de la presente invención es representado por cualquiera de las siguientes fórmulas

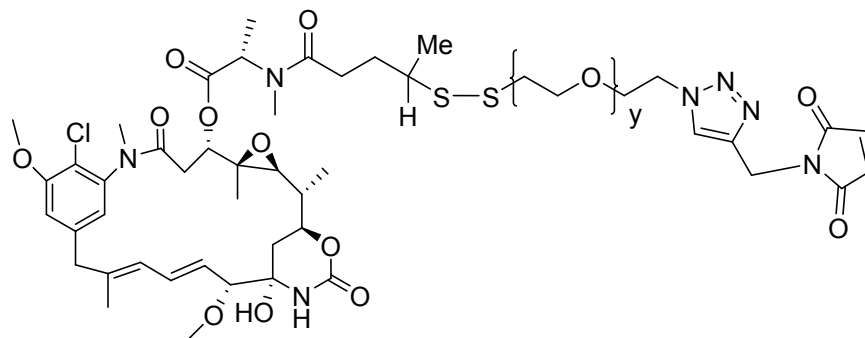
:



;



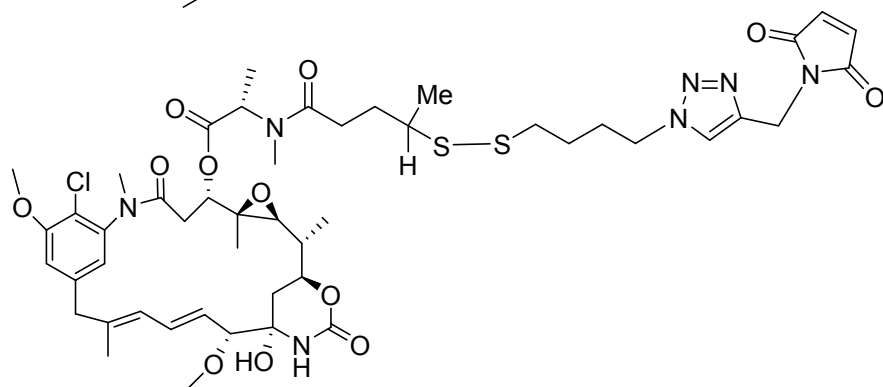
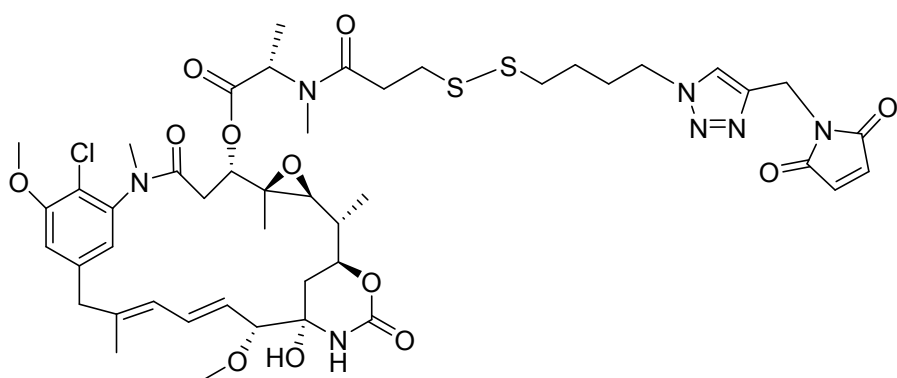
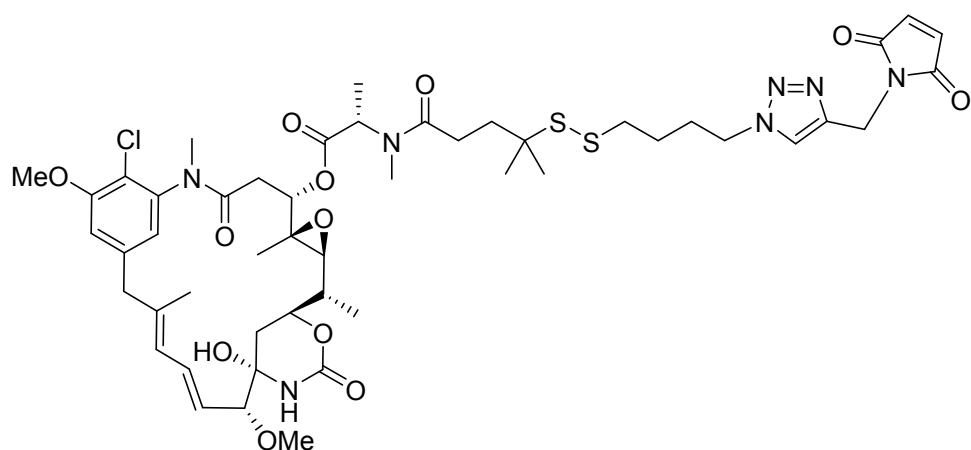
;



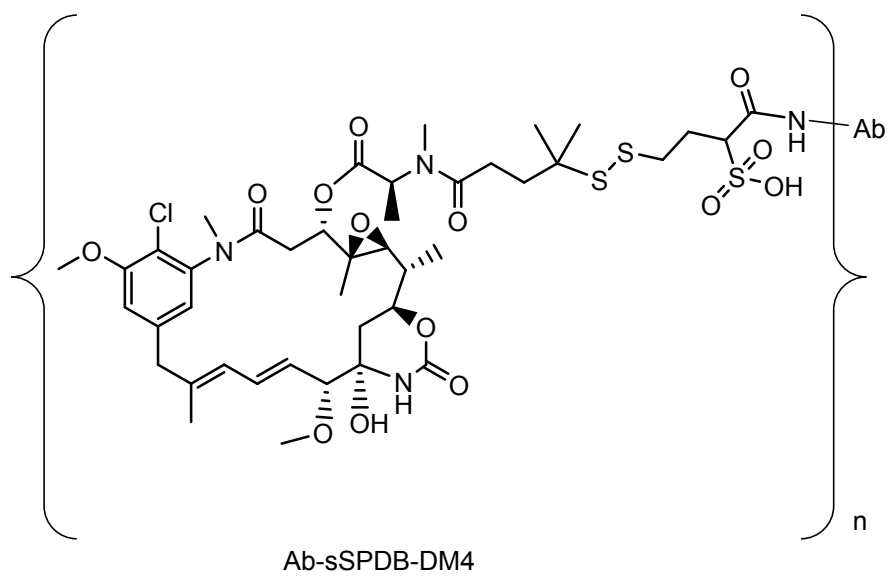
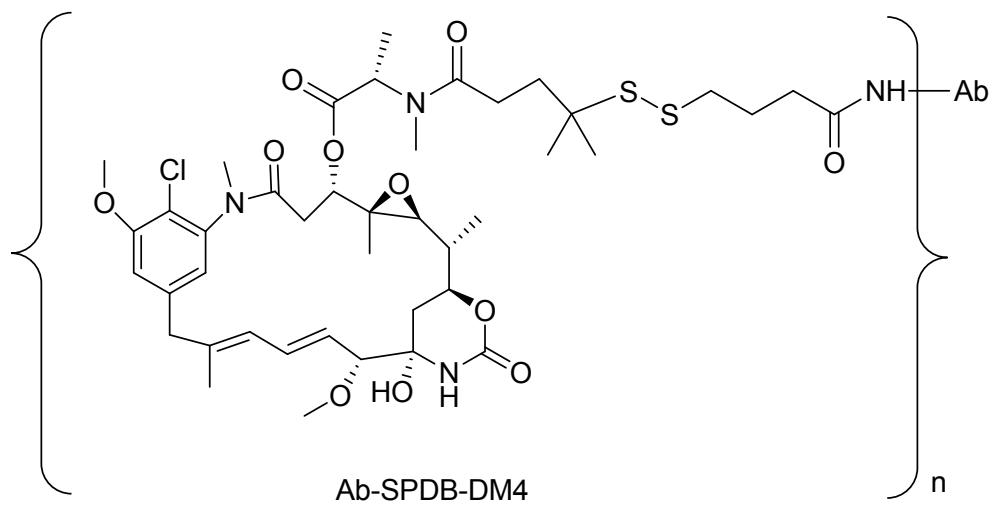
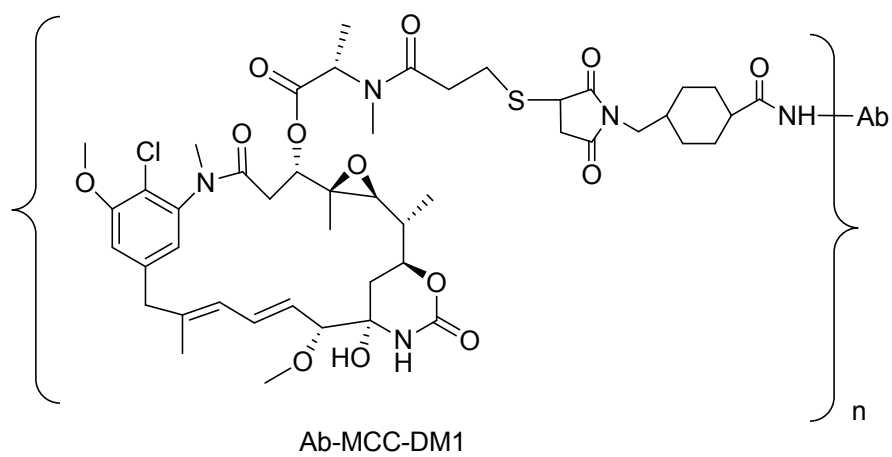
;

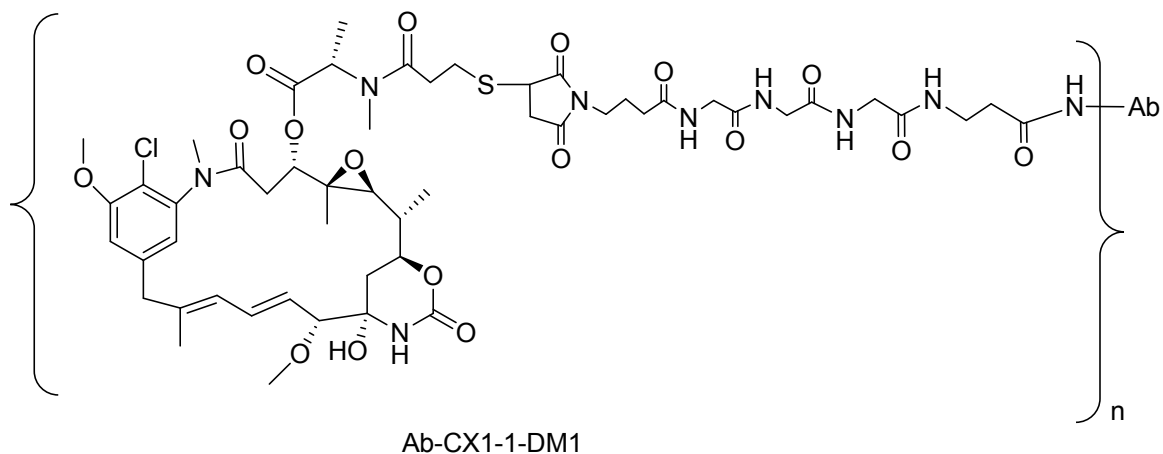
5 donde y es 1 a 11, preferentemente, 1 a 5.

En una forma de realización, el enlazador-fármaco de la presente invención es representado por cualquiera de las siguientes fórmulas estructurales:



En una forma de realización, el conjugado de la presente invención es representado por cualquiera de las siguientes fórmulas estructurales:



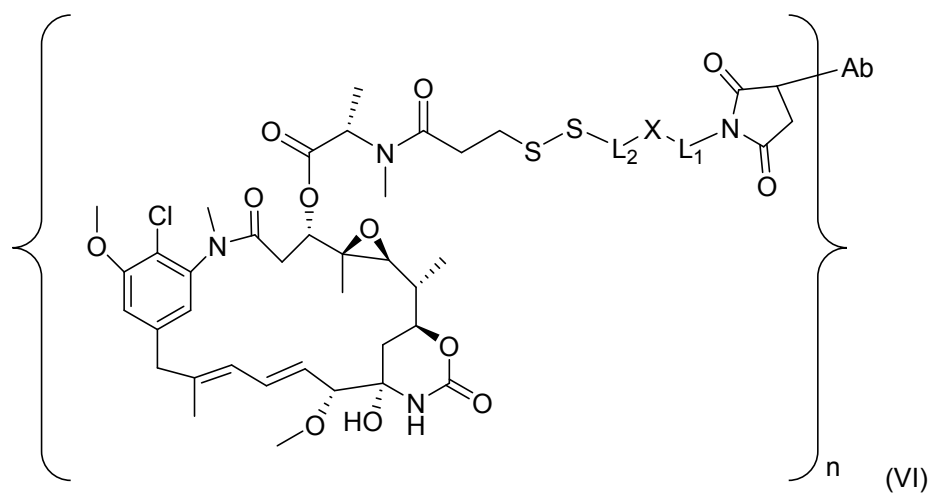


donde:

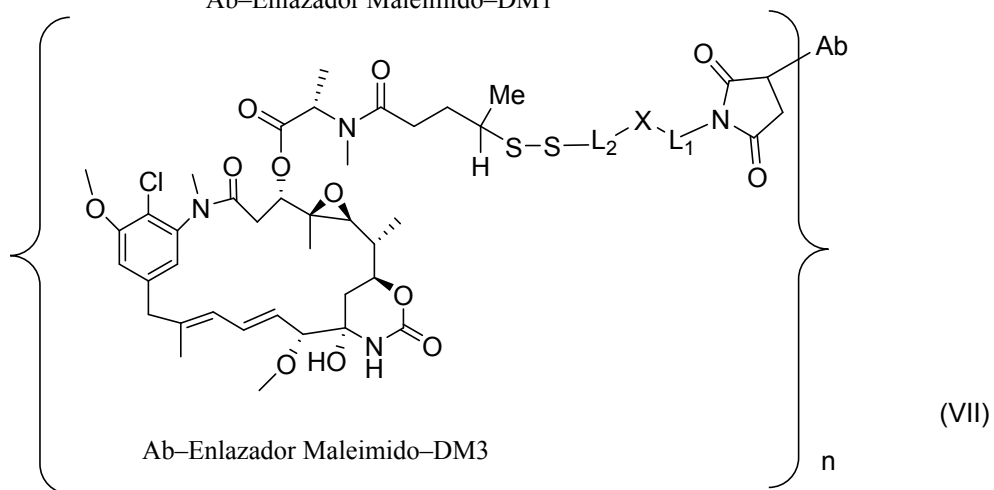
Ab es un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a CCR7;

n, que indica el número de grupos de enlazador-fármaco (L-D-) unidos 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 una forma de realización, n es un número entero de 1 a 10, 2 a 8 o 2 a 5. En una forma de realización específica, n es 3 o 4.

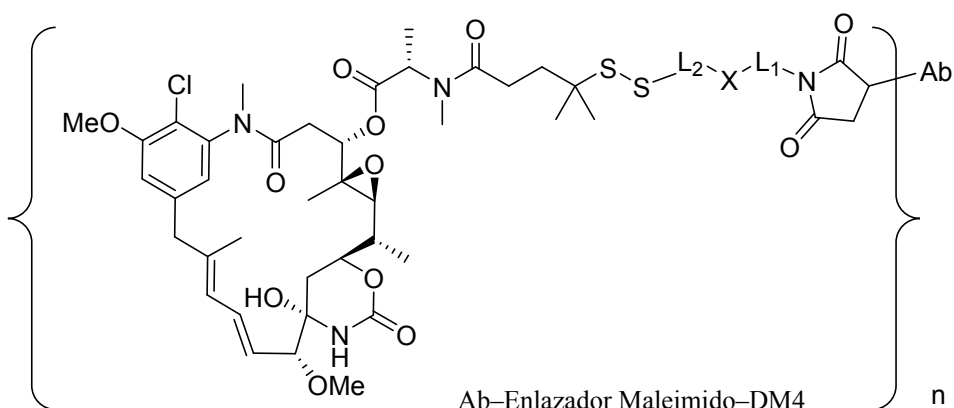
En otra forma de realización, el conjugado de la presente invención es representado por cualquiera de las siguientes Fórmulas (VI), (VII) y (VIII):



Ab-Enlazador Maleimido-DM1



Ab-Enlazador Maleimido-DM3



Ab-Enlazador Maleimido-DM4

;

donde:

5 L^1 es un C_{1-6} alquileo donde uno de los grupos metileno puede estar reemplazado con oxígeno;

L^2 es un C_{1-6} alquileo o es $-(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ donde y es 1 a 11; y

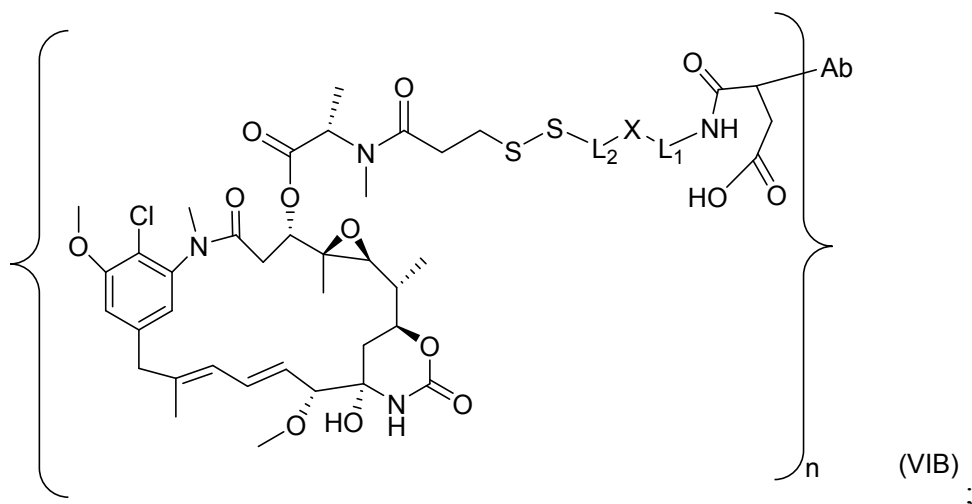
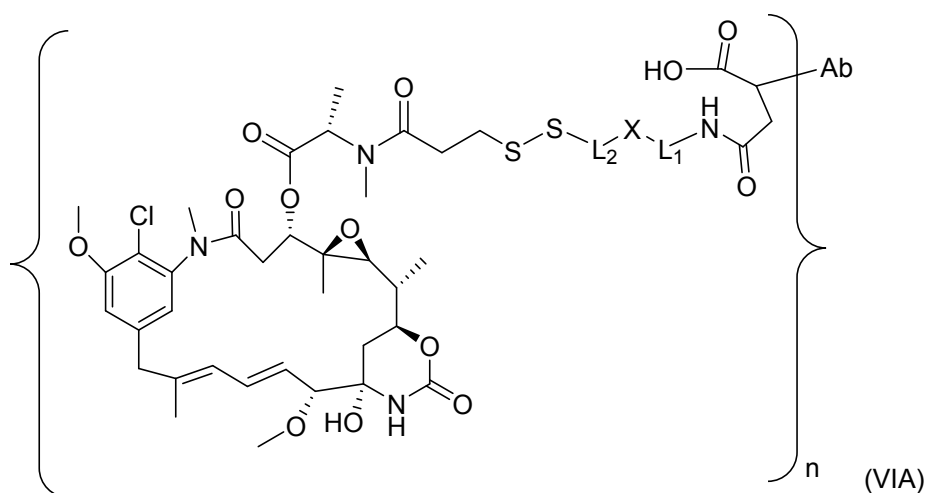
X es $-C(O)-NH-$, $-NHC(O)-$ o un triazol;

donde el alquileo es lineal o ramificado; y

Ab es un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno;

n, que indica el número de grupos de enlazador-fármaco (L-D-) unidos 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 una forma de realización, n es un número entero de 1 a 10, 2 a 8 o 2 a 5. En una forma de realización específica, n es 3 o 4. En algunas formas de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une a un antígeno que es expresado en células tumorales. En una forma de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a CCR7. En otras formas de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a P-cadherina, Cadherina 6, FGFR2, o FGFR4.

En otra forma de realización, el conjugado de la presente invención tiene la Fórmula (VIA) o (VIB) correspondiente a las formas abiertas de la succinimida del conjugado de Fórmula (VI):



donde:

L^1 es un C_{1-6} alquileo donde uno de los grupos metileno puede estar reemplazado con oxígeno;

5 L^2 es un C_{1-6} alquileo o es $-(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ donde y es 1 a 11; y

X es $-C(O)-NH-$, $-NHC(O)-$ o un triazol;

donde el alquileo es lineal o ramificado; y

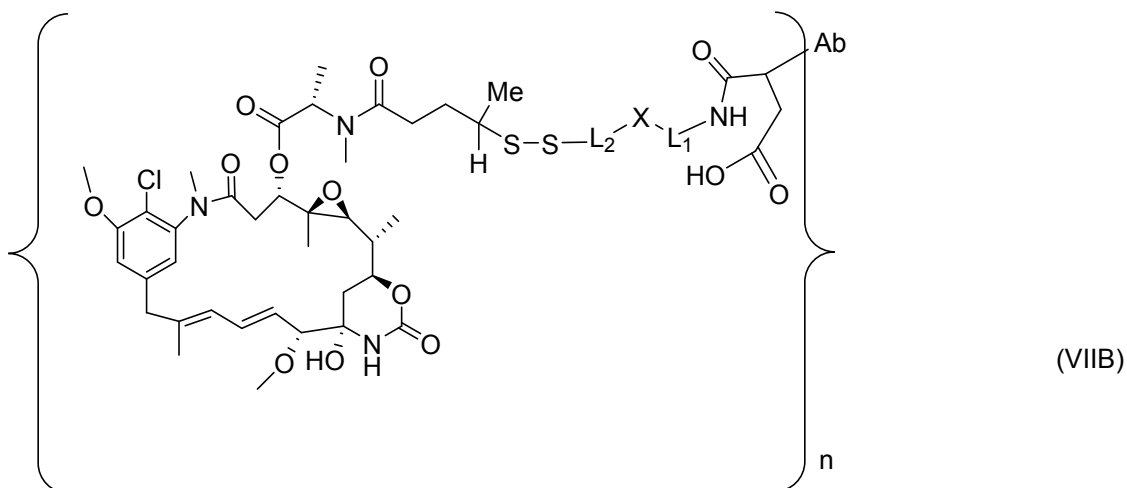
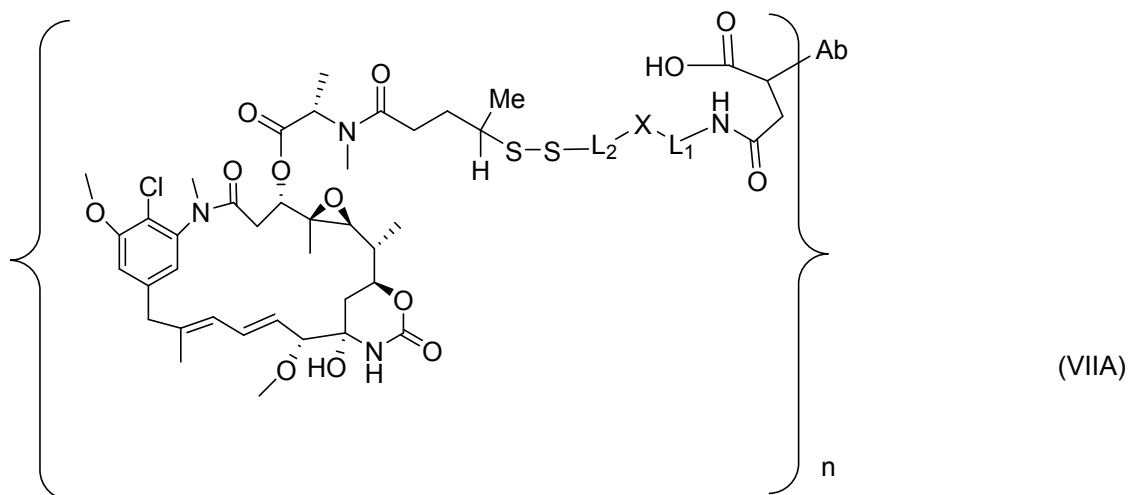
Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno;

10 n , que indica el número de grupos de enlazador-fármaco ($L-D-$) unidos 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 una forma de realización, n es un número entero de 1 a 10, 2 a 8 o 2 a 5. En una forma de realización específica, n es 3 o 4. En algunas formas de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une a un antígeno que es expresado en células tumorales. En una forma de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une

específicamente a CCR7. En otras formas de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a P-cadherina, Cadherina 6, FGFR2, o FGFR4.

En otra forma de realización, el conjugado de la presente invención tiene la Fórmula (VIIA) o (VIIB) correspondiente a las formas abiertas de la succinimida del conjugado de

5 Fórmula (VII):



;

donde:

10 L^1 es un C_{1-6} alquileo donde uno de los grupos metileno puede estar reemplazado con oxígeno;

L^2 es un C_{1-6} alquileo o es $-(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ donde y es 1 a 11; y

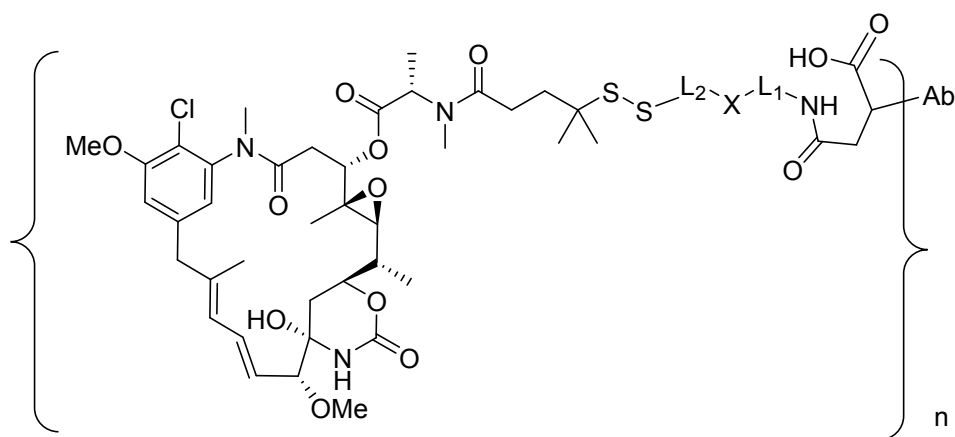
X es $-C(O)-NH-$, $-NHC(O)-$ o un triazol;

donde el alquileo es lineal o ramificado; y

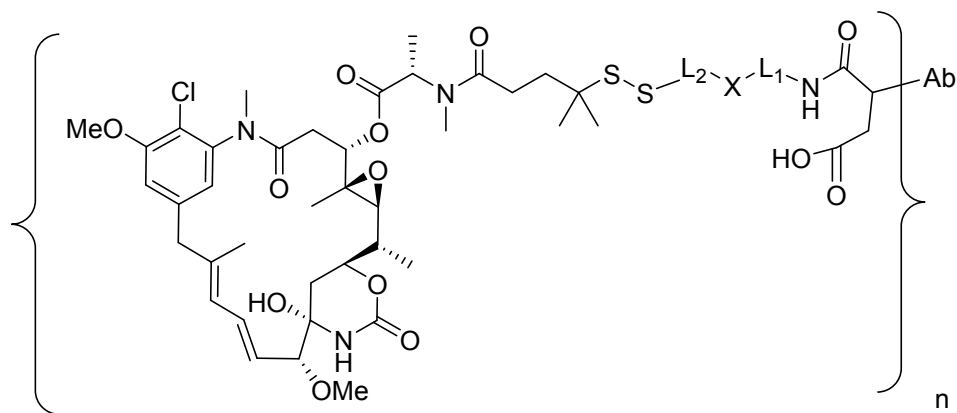
Ab es un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno;

n, que indica el número de grupos de enlazador-fármaco (L-D) unidos 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 una forma de realización, n es un número entero de 1 a 10, 2 a 8 o 2 a 5. En una forma de realización específica, n es 3 o 4. En algunas formas de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une a un antígeno que es expresado en células tumorales. En una forma de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a CCR7. En otras formas de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a P-cadherina, Cadherina 6, FGFR2, o FGFR4.

En otra forma de realización, el conjugado de la presente invención tiene la Fórmula (VIII A), (VIII B) correspondiente a las formas abiertas de la succinimida del conjugado de Fórmula (VIII):



(VIII A)



(VIII B)

15 ;

donde:

L^1 es un C_{1-6} alquileo donde uno de los grupos metileno puede estar reemplazado con oxígeno;

L^2 es un C_{1-6} alquileo o es $-(CH_2CH_2O)_y-CH_2-CH_2-$ donde y es 1 a 11; y

X es $-C(O)-NH-$, $-NHC(O)-$ o un triazol;

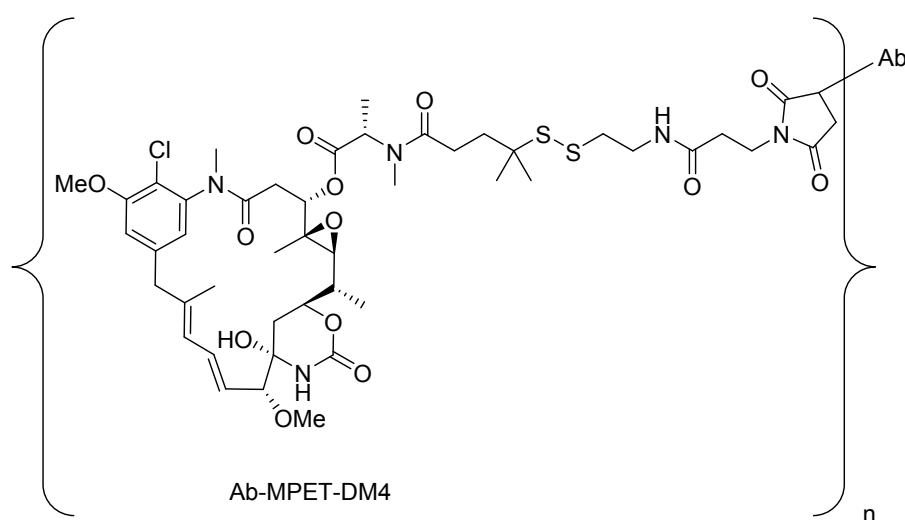
5 donde el alquileo es lineal o ramificado; y

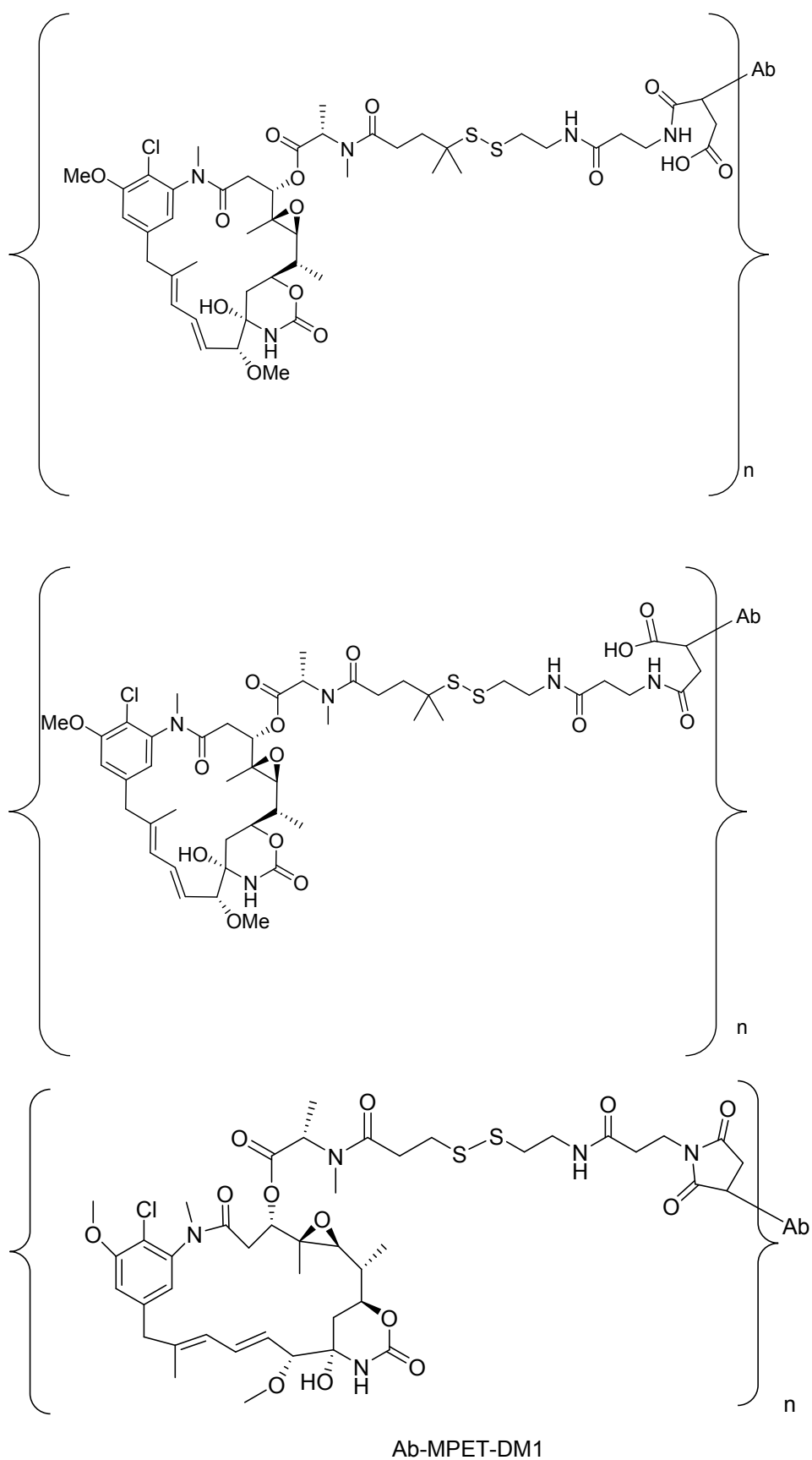
Ab es un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno;

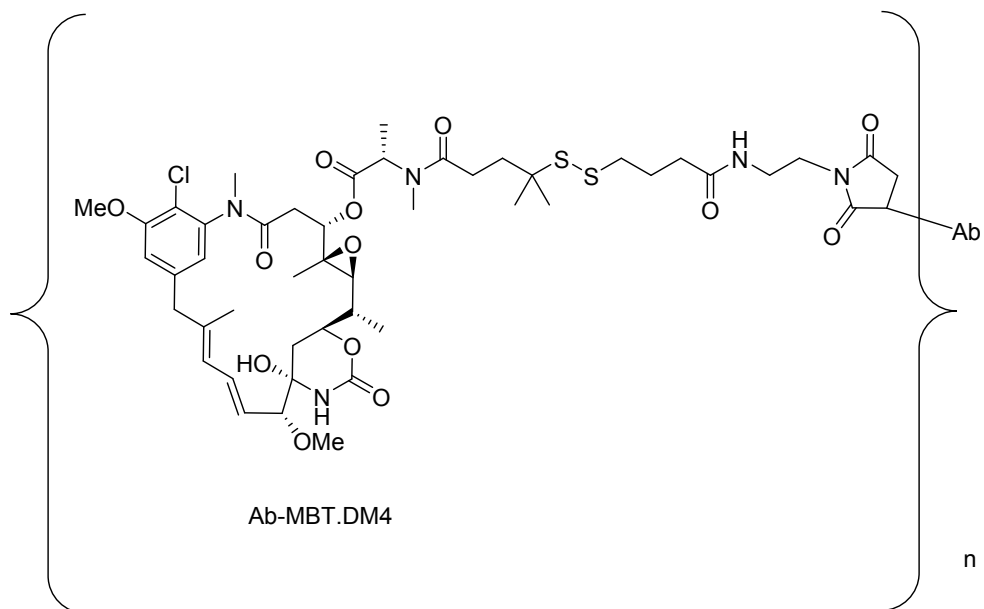
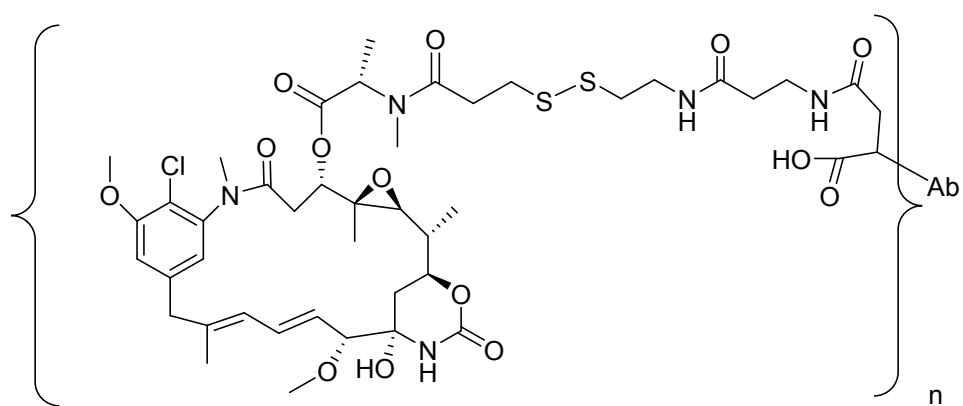
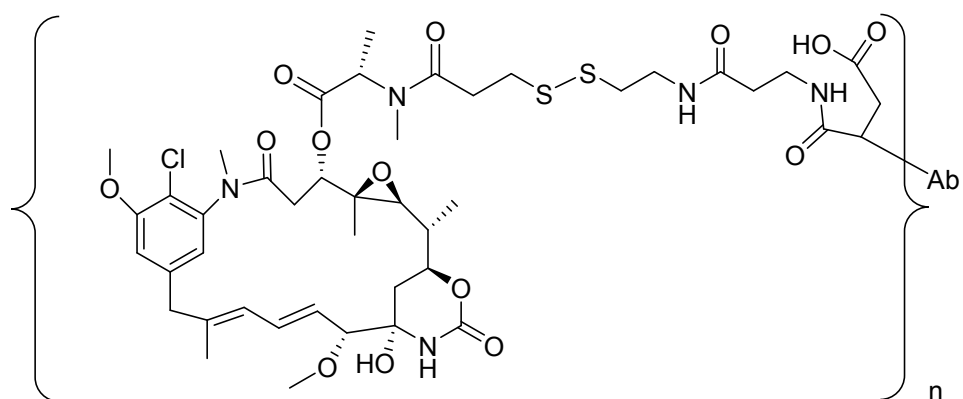
n , que indica el número de grupos de enlazador-fármaco ($L-D-$) unidos al Ab a través de la formación de un enlace de amida con una amina primaria del Ab , es un número entero de 1 a 20. En una forma de realización, n es un número entero de 1 a 10, 2 a 8 o 2 a 5. En una forma de realización específica, n es 3 o 4. En algunas formas de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une a un antígeno que es expresado en células tumorales. En una forma de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a CCR7. En otras formas de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a P-cadherina, Cadherina 6, FGFR2, o FGFR4.

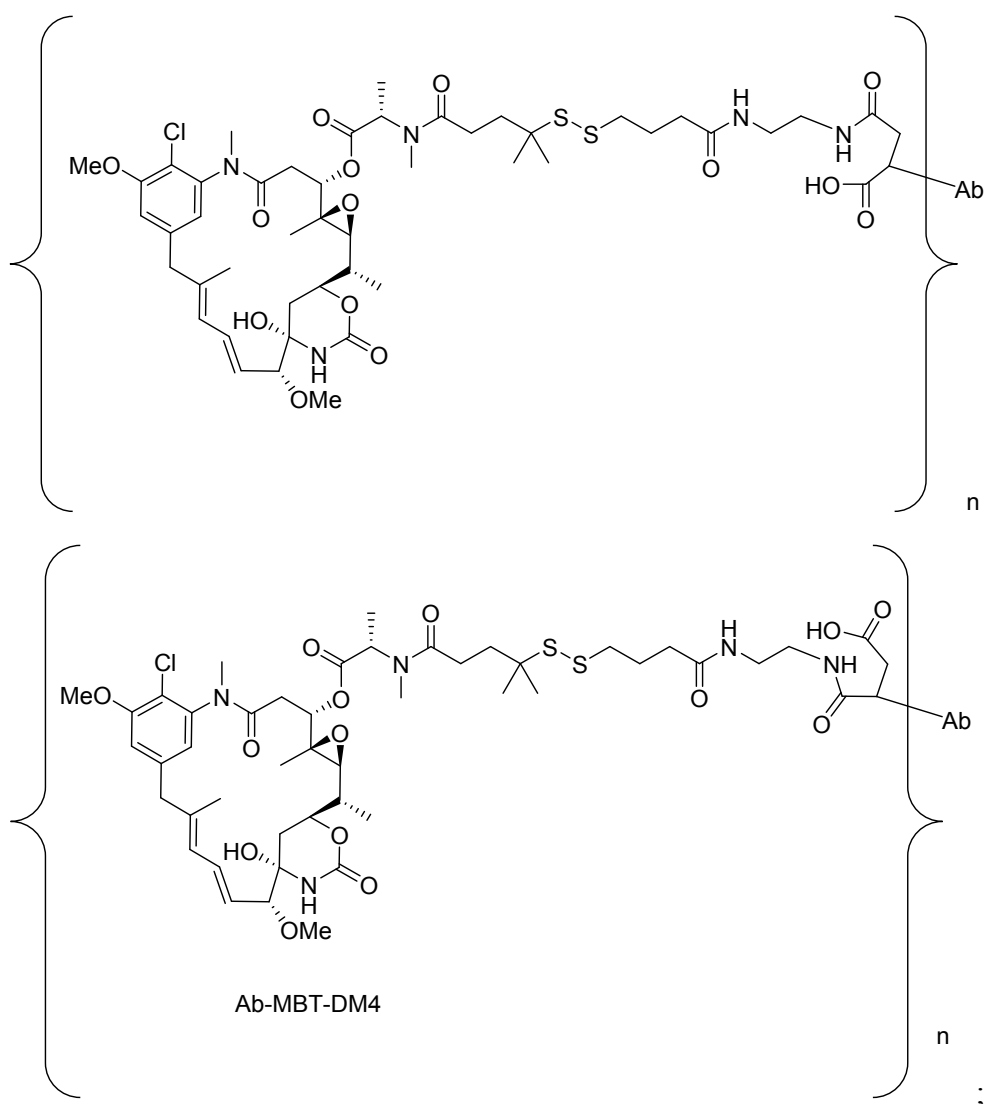
15 En una forma de realización, cada conjugado de anticuerpo y fármaco divulgado en este documento, donde el resto de enlazador-fármaco se une al anticuerpo por medio de una succimida, también puede existir como las formas abiertas de la succinimida, como se representa generalmente en las Fórmulas (VIA), (VIB), (VIIA), (VIIB), (VIII A) y (VIII B).

Aún en otra forma de realización, el conjugado de la presente invención es representado por cualquiera de las siguientes fórmulas estructurales:







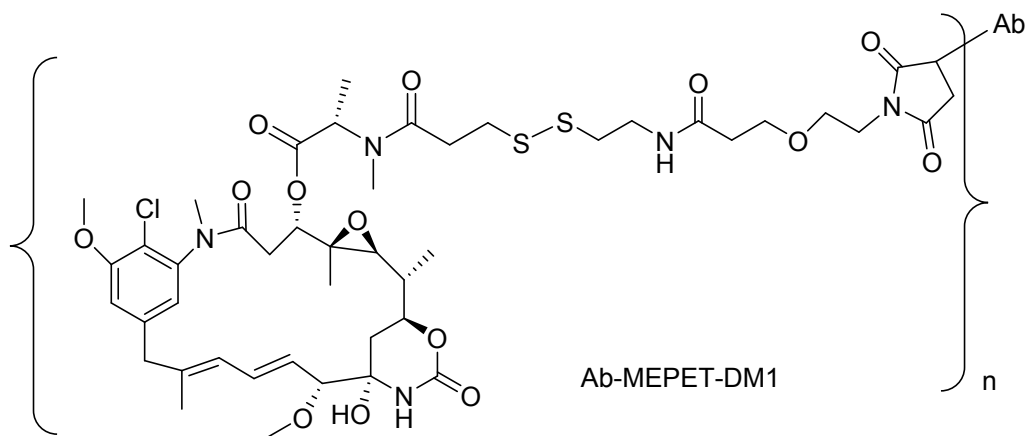
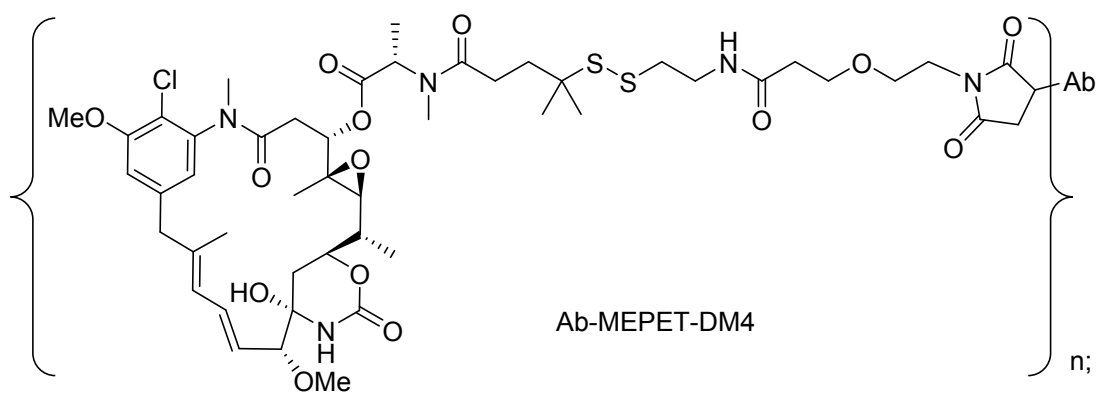
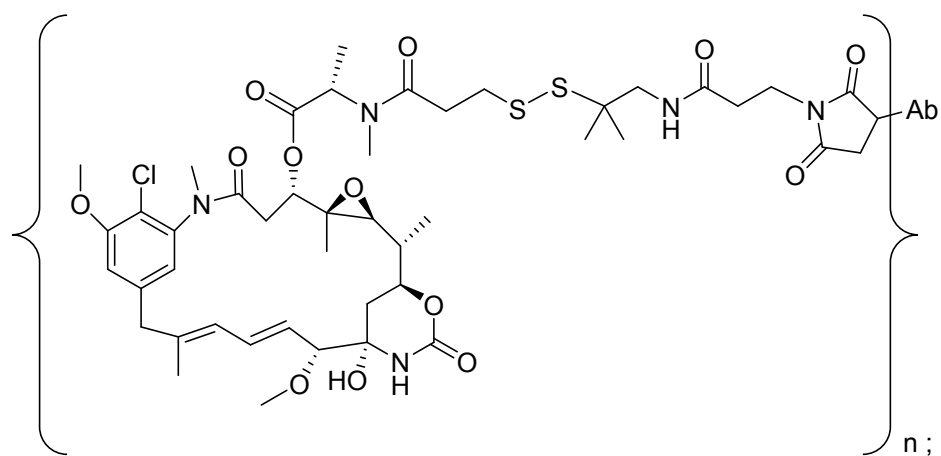


donde:

Ab es un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno;

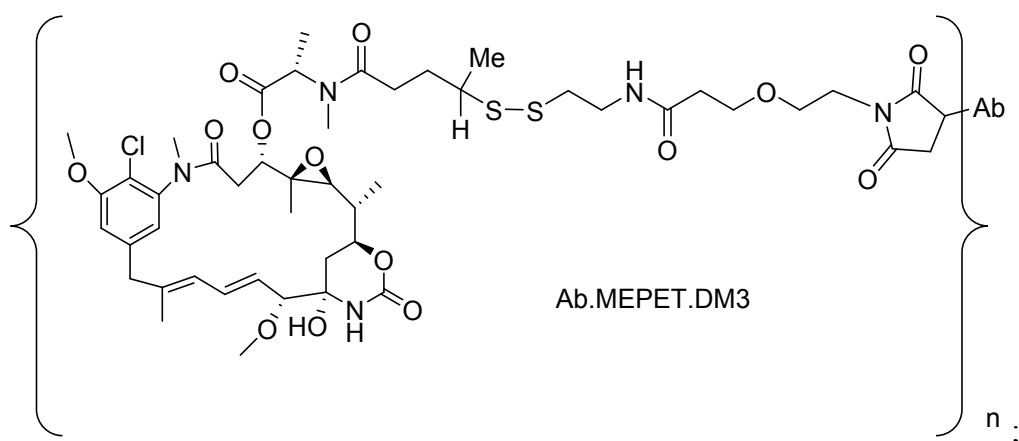
- 5 n, que indica el número de grupos D-L unidos al Ab a través de la formación de un enlace de tioéster con un sulfhidrilo del Ab, es un número entero de 1 a 12, o 1 a 8, o preferentemente, 1 a 4. En una forma de realización específica, n es 3 o 4. En algunas formas de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une a un antígeno que es expresado en células tumorales. En una forma de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a CCR7. En otras formas de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a P-cadherina, Cadherina 6, FGFR2, o FGFR4.
- 10

En otra forma de realización, el conjugado de la presente invención es representado por cualquiera de las siguientes fórmulas estructurales:



y

;



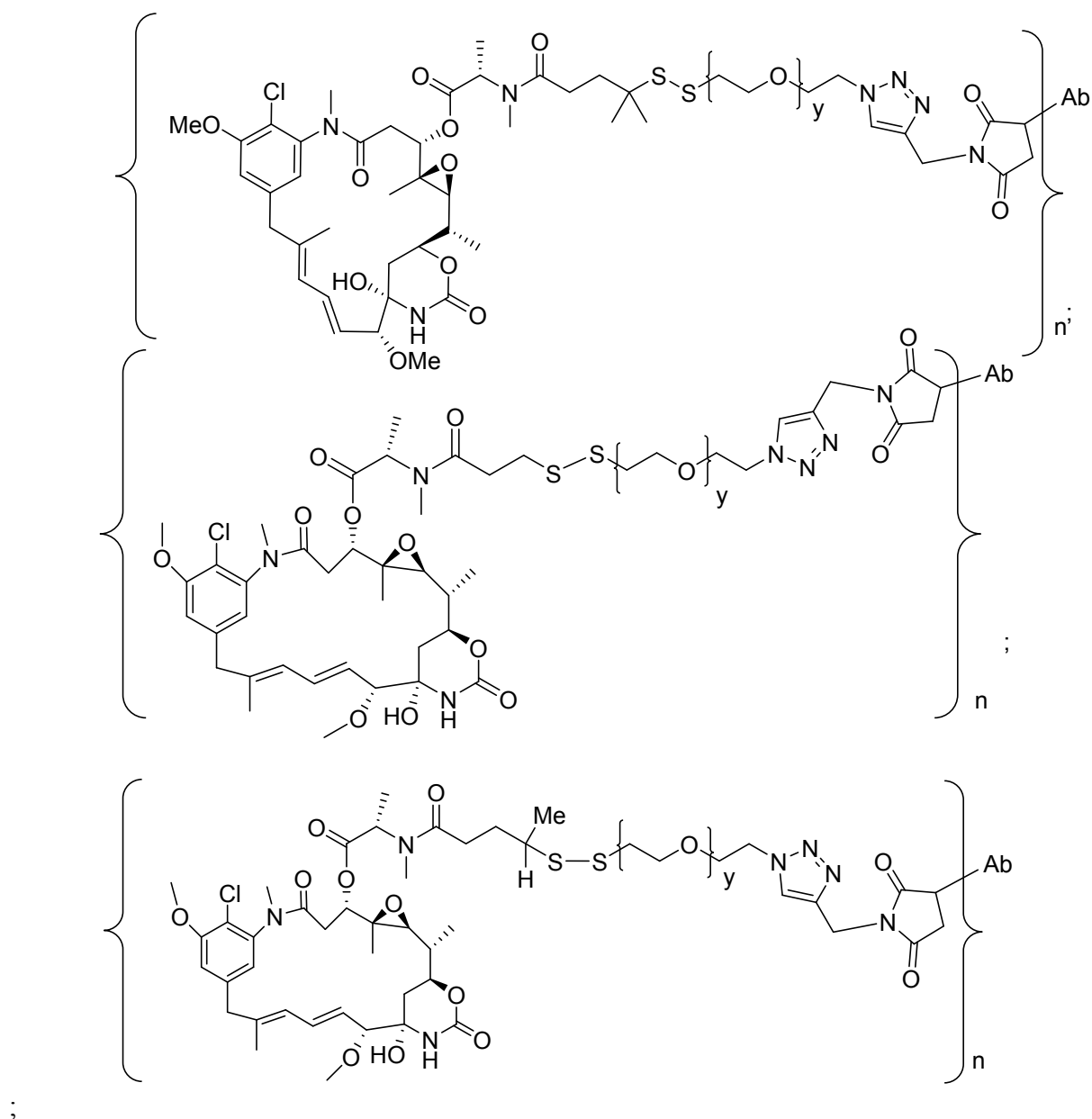
así como las correspondientes formas abiertas de la succinimida;

donde:

Ab es un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno;

- 5 n, que indica el número de grupos D–L unidos al Ab a través de la formación de un enlace de tioéster con un sulfhidrilo del Ab, es un número entero de 1 a 12, o 1 a 8, o preferentemente, 1 a 4. En una forma de realización específica, n es 3 o 4. En algunas formas de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une a un antígeno que es expresado en células tumorales. En una forma de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a CCR7. En otras formas de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a P–cadherina, Cadherina 6, FGFR2, o FGFR4.
- 10

En otra forma de realización; el conjugado de la presente invención es representado por cualquiera de las siguientes fórmulas estructurales:



al igual que las correspondientes formas abiertas de la succinimida;

donde:

5 y es 1 a 11, preferentemente, 1 a 5;

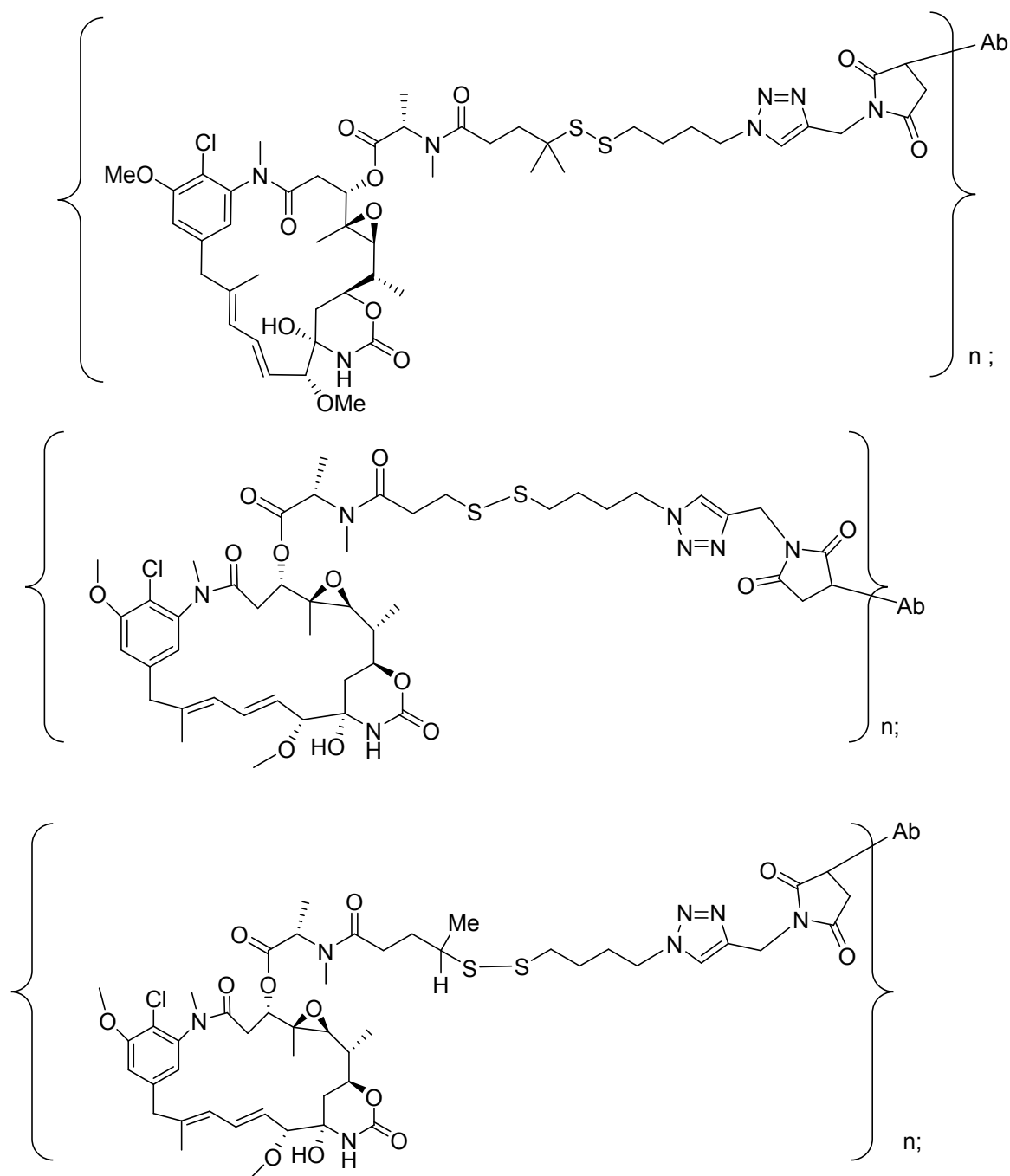
Ab es un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno;

10 n, que indica el número de grupos D-L unidos al Ab a través de la formación de un enlace de tioéster con un sulfhidrido del Ab, es un número entero de 1 a 12, o 1 a 8, o preferentemente, 1 a 4. En una forma de realización específica, n es 3 o 4. En algunas formas de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une a un antígeno que es expresado en células tumorales. En una forma de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a CCR7. En otras formas de realización, el anticuerpo

o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a P-cadherina, Cadherina 6, FGFR2, o FGFR4.

Aún en otra forma de realización, el conjugado de la presente invención es representado por las siguientes Fórmulas:

5



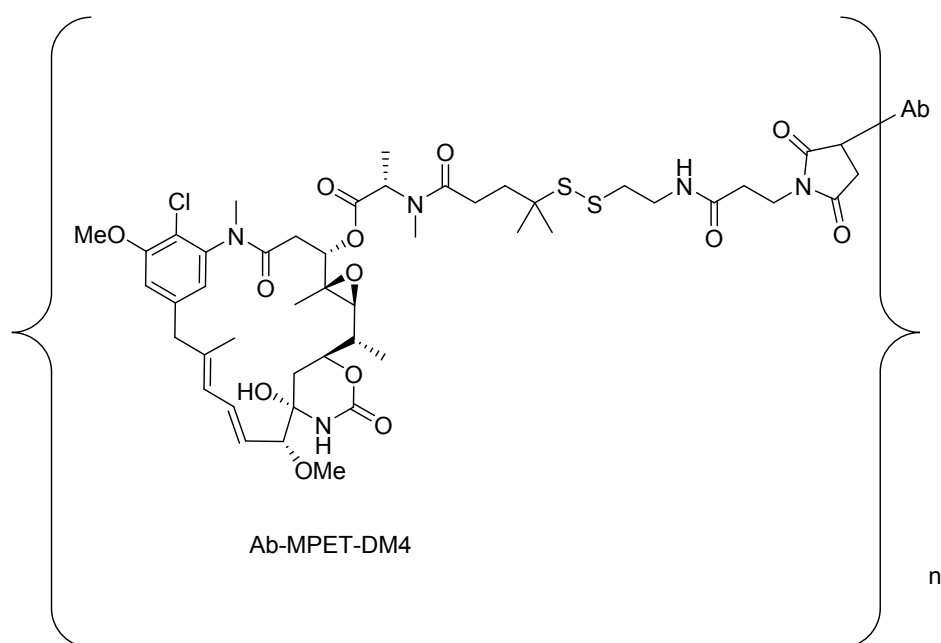
al igual que las correspondientes formas abiertas de la succinimida;

donde:

Ab es un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno;

n, que indica el número de grupos D–L unidos al Ab a través de la formación de un enlace de tioéster con un sulfhidrilo del Ab, es un número entero de 1 a 12, o 1 a 8, o preferentemente, 1 a 4. En una forma de realización específica, n es 3 o 4. En algunas formas de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une a un antígeno que es expresado en células tumorales. En una forma de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a CCR7. En otras formas de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a P–cadherina, Cadherina 6, FGFR2, o FGFR4.

En una forma de realización preferida, el conjugado de la presente invención es representado por la siguiente Fórmula:



donde:

Ab es un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno;

n, que indica el número de grupos D–L unidos al Ab a través de la formación de un enlace de tioéster con un sulfhidrilo del Ab, es un número entero de 1 a 20. En algunas formas de realización, n es un número entero de 1 a 12. En algunas formas de realización, n es un número entero de 1 a 8. En algunas formas de realización, n es un número entero de 1 a 4. En una forma de realización específica, n es 3 o 4. En otra forma de realización, el valor n promedio es alrededor de 3 a alrededor de 4. En algunas formas de realización, el anticuerpo o su

fragmento de unión a antígeno se une a un antígeno que es expresado en células tumorales. En una forma de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a CCR7. En otras formas de realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a P–cadherina, Cadherina 6, FGFR2, o FGFR4.

5 En una forma de realización, la relación molar promedio de fármaco (por ejemplo, DM1, DM3 o DM4) al anticuerpo en el conjugado (es decir, valor n promedio, también conocido como Relación de Maitansinoide Anticuerpo (MAR)) es alrededor de 1 a alrededor de 10, alrededor de 2 a alrededor de 8 (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, 10 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, u 8,1), alrededor de 2,5 a alrededor de 7, alrededor de 3 a alrededor de 5, alrededor de 2,5 a alrededor de 4,5 (por ejemplo, alrededor de 2,5, alrededor de 2,6, alrededor de 2,7, alrededor de 2,8, alrededor de 2,9, alrededor de 3,0, alrededor de 3,1, alrededor de 3,3, alrededor de 3,4, alrededor de 3,5, alrededor de 3,6, 15 alrededor de 3,7, alrededor de 3,8, alrededor de 3,9, alrededor de 4,0, alrededor de 4,1, alrededor de 4,2, alrededor de 4,3, alrededor de 4,4, alrededor de 4,5), alrededor de 3,0 a alrededor de 4,0, alrededor de 3,2 a alrededor de 4,2, o alrededor de 4,5 a 5,5 (por ejemplo, alrededor de 4,5, alrededor de 4,6, alrededor de 4,7, alrededor de 4,8, alrededor de 4,9, alrededor de 5,0, alrededor de 5,1, alrededor de 5,2, alrededor de 5,3, alrededor de 5,4, o 20 alrededor de 5,5).

En un aspecto de la invención, el conjugado de la presente invención tiene sustancialmente alta pureza, y tiene una o más de las siguientes características: (a) más de alrededor de 90% (por ejemplo, más o igual a alrededor de 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 25 97%, 98%, 99%, o 100%), preferentemente más de alrededor de 95%, de especies de conjugados son monómeras; (b) el nivel de enlazador no conjugado en la preparación de conjugado es inferior a alrededor del 10% (por ejemplo, menos o igual a alrededor del 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1 %, o 0%) (en relación con el enlazador total), (c) menos del 10% de las especies de conjugado están reticuladas (por ejemplo, menos o igual a alrededor del 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4 %, 3%, 2%, 1% o 0%), (d) el nivel de fármaco libre (por ejemplo, DM1, 30 DM3 o DM4) en la preparación de conjugado es menor que alrededor de 2% (por ejemplo, menor o igual a alrededor de 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 en relación con el agente citotóxico total) y/o (e) no se produce un aumento sustancial en el nivel de fármaco libre (por ejemplo, DM1, DM3

o DM4) después del almacenamiento (por ejemplo, después de alrededor de 1 semana, alrededor de 2 semanas, alrededor de 3 semanas, alrededor de 1 mes, alrededor de 2 meses, alrededor de 3 meses, alrededor de 4 meses, alrededor de 5 meses, alrededor de 6 meses, alrededor de 1 año, alrededor de 2 años, alrededor de 3 años, alrededor de 4 años, o alrededor de 5 años). “Aumento sustancial” en el nivel de fármaco libre (por ejemplo, DM1, DM3 o DM4) significa que después de cierto tiempo de almacenamiento (por ejemplo, alrededor de 1 semana, alrededor de 2 semanas, alrededor de 3 semanas, alrededor de 1 mes, alrededor de 2 meses, alrededor de 3 meses, alrededor de 4 meses, alrededor de 5 meses, alrededor de 6 meses, alrededor de 1 año, alrededor de 2 años, alrededor de 3 años, alrededor de 4 años o alrededor de 5 años), el aumento en el nivel de fármaco libre (por ejemplo, DM1, DM3 o DM4) es menor que alrededor de 0,1%, alrededor de 0,2%, alrededor de 0,3%, alrededor de 0,4%, alrededor de 0,5%, alrededor de 0,6%, alrededor de 0,7%, alrededor de 0,8%, alrededor de 0,9%, alrededor de 1,0%, alrededor de 1,1%, alrededor de 1,2%, alrededor de 1,3%, alrededor de 1,4%, alrededor de 1,5%, alrededor de 1,6%, alrededor de 1,7%, alrededor de 1,8%, alrededor de 1,9%, alrededor de 2,0%, alrededor de 2,2%, alrededor de 2,5%, alrededor de 2,7%, alrededor de 3,0 %, alrededor de el 3,2%, alrededor del 3,5%, alrededor del 3,7%, o alrededor del 4,0%.

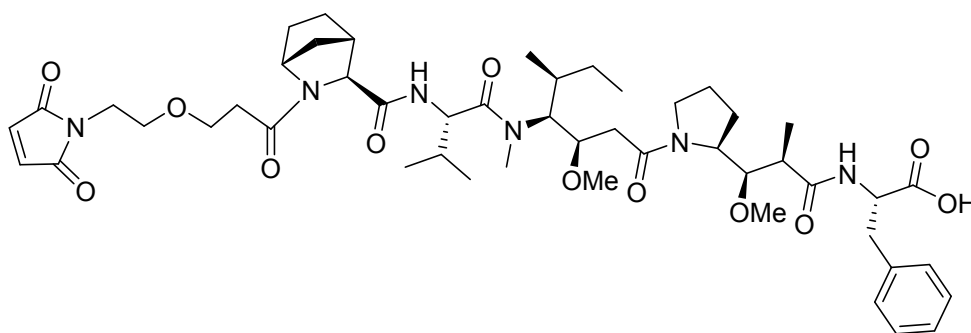
Como se usa en este documento, el término "enlazador no conjugado" se refiere al anticuerpo que está enlazado covalentemente con un enlazador derivado de un reactivo de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1), en donde el anticuerpo no está acoplado covalentemente al fármaco (por ejemplo, DM1, DM3 o DM4) a través de un enlazador (es decir, el "enlazador no conjugado" puede ser representado por Ab-MCC, Ab-SPDB o Ab-CX1-1).

1. Resto de fármaco.

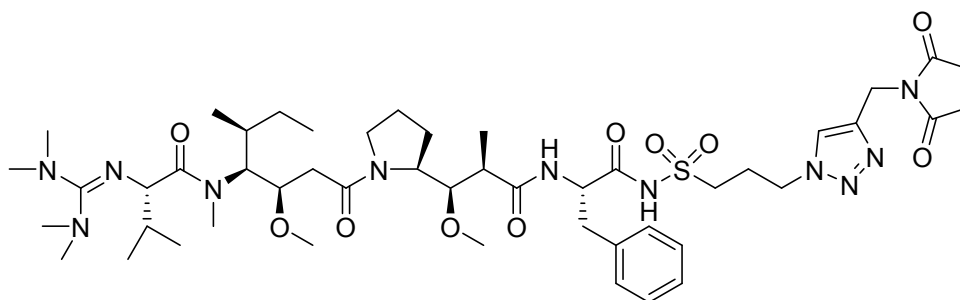
La presente invención proporciona inmunoconjugados que se unen específicamente a CCR7. Los conjugados de anticuerpos y fármacos de la invención comprenden anticuerpos anti-CCR7, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales que se conjugan con un resto de fármaco, por ejemplo, un agente contra el cáncer, un agente de tratamiento autoinmunitario, un agente antiinflamatorio, un agente antifúngico, un agente antibacteriano, un agente antiparasitario, un agente antiviral, o un agente anestésico. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la invención pueden conjugarse con varios restos de fármacos idénticos o diferentes usando cualquier método conocido en la técnica.

En ciertas formas de realización, el resto de fármaco de los inmunoconjugados de la presente invención se selecciona de un grupo que consiste en un inhibidor de V-ATPasa, un agente proapoptótico, un inhibidor de Bcl2, un inhibidor de MCL1, un inhibidor de HSP90, un inhibidor IAP, un inhibidor de mTor, un estabilizador de microtúbulos, un desestabilizador de microtúbulos, un inhibidor de la ARN polimerasa, una amanitina, una pirrolobenzodiazepina, una auristatina, una dolastatina, un maitansinoide, una MetAP (metionina aminopeptidasa), un inhibidor de la exportación nuclear de proteínas CRM1, un inhibidor de DPPIV, un inhibidor de Eg5, inhibidores del proteasoma, un inhibidor de las reacciones de transferencia de fosforilo en las mitocondrias, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inhibidor de la quinasa, un inhibidor de la CDK2, un inhibidor de la CDK9, un inhibidor de la quinesina, un inhibidor de HDAC, un agente dañino del ADN, un agente alquilante de ADN, un intercalador de ADN, un ligante del surco menor del ADN y un inhibidor de DHFR.

En cierta forma de realización, el resto de fármaco de los inmunoconjugados de la presente invención es una auristatina descrita en las Publicaciones PCT Nros.: WO 2015/095301 y WO2015/189791, ambas solicitudes se incorporan aquí como referencia. Ejemplos no limitativos de construcciones de enlazador-resto de fármaco de auristatina son:



(que es AURIX2 como se divulga en la presente solicitud); y



(que es AURIX1 como se divulga en la presente solicitud).

En una forma de realización, el resto de fármaco de los inmunoconjugados de la presente invención es un resto de fármaco maitansinoide, tal como, sin limitación, DM1, DM3 o DM4.

Además, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente invención pueden conjugarse con un resto de fármaco que modifica una respuesta biológica determinada. Los restos de fármacos no deben interpretarse como limitados a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína, un péptido o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotosina de *Pseudomonas*, toxina del cólera o toxina diftérica, una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, una citoquina, un agente apoptótico, un agente antiangiogénico o un modificador de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfoquina.

En una forma de realización, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente invención se conjugan con un resto de fármaco, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Los ejemplos de citotoxinas incluyen, entre otros, taxanos (ver, por ejemplo, las Solicitudes de Patente Internacional (PCT) Números 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 comprenden un resto de polietilenglicol reactivo (ver, por ejemplo, Sasse *et al.*, J. Antibiot. (Tokyo), 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) (publicación electrónica antes de la publicación impresa), Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.475.092, 6.340.701, 6.372.738 y 6.436.931, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nro. 2001/0036923 A1, Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Pendiente Acta Nros. 10/024.290 y 10/116.053, y Solicitud de Patente Internacional (PCT) Nro. WO 01/49698), taxón, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, t. colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1–dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y sus análogos u homólogos. Los agentes terapéuticos además incluyen, por

ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6–mercaptopurina, 6–tioguanina, citarabina, 5–fluorouracil decarbazina), agentes de ablación (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucilo, meifalano, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis–diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino, antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente, daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente, actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). (Ver, por ejemplo, Seattle Genetics US20090304721).

Otros ejemplos de citotoxinas que pueden conjugarse con los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (o fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la invención incluyen duocarmicinas, caliquemicinas, maitansinas y auristatinas y sus derivados.

Se conocen en la técnica diversos tipos de citoquinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos a anticuerpos; ver, por ejemplo, Saito *et al.*, (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 and Kreitman, (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089–1091; Senter and Springer, (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247–264.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente invención también pueden conjugarse con un isótopo radiactivo para generar radiofármacos citotóxicos, denominados radioinmunoconjugados. Los ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso de diagnóstico o terapéutico incluyen, entre otros, yodo–131, indio–111, itrio–90 y lutecio–177. Los métodos para preparar radioinmunoconjugados se establecen en la técnica. Los ejemplos de radioinmunoconjugados están disponibles comercialmente, e incluyen Zevalin™ (DEC Pharmaceuticals) y Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), y se pueden usar métodos similares para preparar radioinmunoconjugados utilizando los anticuerpos de la invención. En ciertas formas de realización, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10–tetraazaciclododano–N,N',N'',N'''–tetraacético (DOTA), que se puede unir al anticuerpo a través de una molécula de enlazador. Dichas moléculas de enlazador son comúnmente conocidas en la técnica y se describen en Denardo *et al.*, (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 una, incorporada por referencia en su totalidad.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente invención también pueden conjugarse con una proteína o polipéptido heterólogo (o fragmento de estos, preferiblemente, con un polipéptido de por lo menos 10, por lo menos 20, a por lo menos 30, por lo menos 40, por lo menos 50, por lo menos 60, por lo menos 70, por lo menos 80, por lo menos 90 o por lo menos 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. En particular, la invención proporciona proteínas de fusión que comprenden un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmento de unión a antígeno) descrito aquí (por ejemplo, un fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F(ab)₂, un dominio VH, una CDR de VH, un dominio VL o una CDR de VL) y una proteína heteróloga, polipéptido o péptido.

Se pueden generar proteínas de fusión adicionales a través de las técnicas de combinación de genes, combinación de motivos, combinación de exones y/o combinación de codones (denominados colectivamente "combinación de ADN"). La combinación de ADN se puede emplear para alterar las actividades de los anticuerpos de la invención o sus fragmentos (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de estos con afinidades más altas y tasas de disociación más bajas). Ver, en general, las Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252 y 5.837.458; Patten *et al.*, (1997) *Curr. Opinion Biotechnol.* 8:724–33; Harayama, (1998) *Trends Biotechnol.* 16(2):76–82; Hansson *et al.*, (1999) *J. Mol. Biol.* 287:265–76; y Lorenzo and Blasco, (1998) *Biotechniques* 24(2):308–313 (cada una de estas patentes y publicaciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad). Los anticuerpos o sus fragmentos, o los anticuerpos codificados o sus fragmentos, pueden alterarse al ser sometidos a mutagénesis aleatoria mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa, conforme a sus siglas en inglés) propensa a errores, inserción de nucleótidos aleatorios u otros métodos, antes de la recombinación. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de este que se une específicamente a un antígeno puede recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc., de una o más moléculas heterólogas.

Además, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente invención pueden conjugarse con secuencias de marcador, tales como un péptido, para facilitar la purificación. En formas de realización preferidas, la secuencia de aminoácidos de marcador es un péptido de hexa-histidina (SEQ ID NO: 628), tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están

disponibles comercialmente. Como se describe en Gentz et al., (1989) Proc. Natl Acad Sci. USA 86: 821–824, por ejemplo, hexa–histidina (SEQ ID NO: 628) proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, sin limitación, la etiqueta hemaglutinina ("HA"), que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la influenza (Wilson et al., (1984) Cell 37: 767), y la etiqueta "FLAG" (A. Einhauer et al., J. Biochem. Biophys. Methods 49: 455–465, 2001). De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno también pueden conjugarse con péptidos que penetran en el tumor, a fin de mejorar su eficacia.

En otras formas de realización, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente invención se conjugan con un agente de diagnóstico o detectable. Dichos inmunoconjugados pueden ser útiles para monitorear o pronosticar el inicio, desarrollo, la progresión y/o gravedad de una enfermedad o un trastorno como parte de un procedimiento de evaluación clínica, tal como la determinación de la eficacia de una terapia particular. Dicho diagnóstico y detección se pueden lograr mediante el acoplamiento del anticuerpo a sustancias detectables que incluyen, sin limitación, diversas enzimas, tales como, sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta–galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos protéticos, tales como, sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, sin limitación, 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, fluoresceína isotiocianato, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, dansil cloruro o ficoeritrina; materiales luminescentes, tales como, sin limitación, luminol; materiales bioluminescentes, tales como, sin limitación, luciferasa, luciferina y Aequerina; materiales radiactivos tales como, sin limitación, yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I y ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In y ^{111}In), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{64}Cu , ^{113}Sn y ^{117}Sn ; y metales emisores de positrones que usan diversas tomografías por emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la invención también pueden unirse a soportes sólidos,

que son particularmente útiles para inmunoensayos o la purificación del antígeno objetivo. Dichos soportes sólidos incluyen, sin limitación, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno

2. Enlazador.

5 Como se usa en este documento, un "enlazador" es cualquier resto químico que es capaz de enlazar un anticuerpo, fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) o equivalente funcional a otro resto, tal como un resto de fármaco. Los enlazadores pueden ser sensibles de escisión (enlazador escindible), tal como la escisión inducida por ácido, escisión fotoinducida, escisión inducida por peptidasa, escisión inducida por esterasa, escisión
10 inducida por glicosidasa, escisión inducida por fosfodiesterasa, escisión inducida por fosfatasa y escisión por enlace de disulfuro, en condiciones en las cuales el compuesto o el anticuerpo permanece activo. Alternativamente, los enlazadores pueden ser sustancialmente resistentes a la escisión (por ejemplo, un enlazador estable o un enlazador no escindible). En algunos aspectos, el enlazador es un enlazador procargado, un enlazador hidrófilo o un enlazador a base
15 de ácido dicarboxílico.

En un aspecto, el enlazador usado en la presente invención deriva de un reactivo de reticulación tal como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB), N-succinimidil
20 yodoacetato (SIA), N-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato (SIAB), maleimida PEG NHS, N-succinimidil 4-(maleimidometil) ciclohexanocarboxilato (SMCC), N-sulfosuccinimidil 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).

25 Los enlazadores no escindibles son cualquier resto químico capaz de enlazar un fármaco, tal como un maitansinoide, a un anticuerpo de manera covalente y estable, y no se incluye en las categorías enumeradas anteriormente para los enlazadores escindibles. Por lo tanto, los enlazadores no escindibles son sustancialmente resistentes a la escisión inducida por ácido, la escisión fotoinducida, la escisión inducida por peptidasa, la escisión inducida por
30 esterasa y la escisión de enlace disulfuro. Además, no escindible se refiere a la capacidad del enlace químico en el enlazador o adyacente al enlazador para resistir la escisión inducida por un ácido, un agente de escisión fotolábil, una peptidasa, una esterasa o un compuesto químico

o fisiológico que escinde un enlace de disulfuro, en condiciones bajo las cuales el fármaco, tal como maitansionoide o el anticuerpo no pierde su actividad.

Los enlazadores lábiles al ácido son enlazadores escindibles a pH ácido. Por ejemplo, ciertos compartimentos intracelulares, como los endosomas y los lisosomas, tienen un pH ácido (pH 4–5) y proporcionan condiciones adecuadas para escindir los enlazadores lábiles al ácido.

Los enlazadores fotolábiles son enlazadores que son útiles en la superficie corporal y en muchas cavidades corporales que son accesibles a la luz. Además, la luz infrarroja puede penetrar en el tejido.

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

Algunos enlazadores pueden ser escindidos por esterasas, es decir, enlazadores escindibles con esterasa. Nuevamente, solo ciertos ésteres pueden ser escindidos por las esterasas presentes dentro o fuera de las células. Los ésteres se forman por la condensación de un ácido carboxílico y un alcohol. Los ésteres simples son ésteres producidos con alcoholes simples, tales como alcoholes alifáticos, y alcoholes aromáticos pequeños y cíclicos pequeños.

Los enlazadores procargados derivan de reactivos de reticulación cargados que retienen su carga después de la incorporación en un conjugado de fármaco y anticuerpo. Se pueden encontrar ejemplos de enlazadores procargados en el documento US 2009/0274713.

3. Conjugación y preparación de ADC.

En la técnica se conocen numerosos métodos para conjugar la carga útil del enlazador con el resto de unión a antígeno (revisado en, por ejemplo: Antibody–Drug Conjugate, Methods in Molecular Biology, Vol. 1045, Editor L. Ducry, Humana Press (2013)). Tradicionalmente, los fármacos se conjugan con residuos lisina nativa o residuos cisteína nativa del anticuerpo. Las preparaciones resultantes son mezclas complejas. Más recientemente, se están empleando métodos de conjugación específicos de sitio para mejorar el índice terapéutico y la homogeneidad de las preparaciones de ADC (Para revisión: Panowski, S.; Bhakta, S.; Raab,

H.; Polakis, P.; Junutula, J. R. mAbs 2014, 6, 34). Además de la glicoingeniería (Zhou, Q. et al. Bioconjugate chemistry 2014, 25, 510; Zhu, Z. et al. MABs 2014, 6, 1190), algunos de los métodos más comunes de preparación de ADC específicos de sitio se sustentan en la incorporación de cisteínas diseñadas por ingeniería genética (Junutula, J. R. et al., Nature
5 biotechnology 2008, 26, 925; Shinmi, D. et al., Bioconjugate chemistry 2016, 27, 1324), aminoácidos no canónicos (Tian, F. et al., Proceedings National Academy of Sciences USA 2014, 111, 1766; Axup, J. Y. et al., Proceedings National Academy of Sciences USA 2012, 109, 16101) o secuencias peptídicas cortas en el espinazo del anticuerpo (Drake, PM et al., Bioconjugado chemistry 2014, 25, 1331; Strop, P. et al., Chemistry & biology 2013, 20, 161;
10 Beerli, R. R. et al., PloS one 2015, 10, e0131177; Grunewald, J. et al., Bioconjugado chemistry 2015, 26, 2554). Estos métodos proporcionan control sobre la estequiometría y el sitio de unión de la citotoxina, lo que produce mejores perfiles de farmacocinética (PK), seguridad y eficacia de los conjugados en relación con los ADC preparados tradicionalmente.

Los conjugados de la presente invención pueden prepararse por cualquier método
15 conocido en la técnica, tales como aquellos descritos en las Patente de los Estados Unidos Nros. 7.811.572, 6.411.163, 7.368.565 y 8.163.888, Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nros. 2011/0003969, 2011/0166319, 2012/0253021 y 2012/0259100, y Publicaciones PCT WO2014/124316 y WO2015/138615. Las enseñanzas enteras de estas patentes y publicaciones de solicitud de patente se incorporan en la presente solicitud por
20 referencia.

Proceso para la conjugación con residuos de anticuerpo cisteína diseñados.

Los conjugados de la invención pueden ser preparados usando residuos cisteína diseñados por ingeniería genética en un anticuerpo, por ejemplo, por mutagénesis dirigida a sitio. Dichos conjugados específicos de sitio son homogéneos y tienen propiedades mejoradas
25 (Junutula JR, Raab H, Clark S, Bhakta S, Leipold DD, Weir S, Chen Y, Simpson M, Tsai SP, Dennis MS, Lu Y, Meng YG, Ng C, Yang J, Lee CC, Duenas E, Gorrell J, Katta V, Kim A, McDorman K, Flagella K, Venook R, Ross S, Spencer SD, Lee Wong W, Lowman HB, Vandlen R, Sliwowski MX, Scheller RH, Polakis P, Mallet W. (2008) Nature Biotechnology 26:925–932).

Debido a que las cisteínas diseñadas por ingeniería genética en anticuerpos expresados
30 en células de mamíferos se modifican mediante aductos (disulfuros) como el glutatión (GSH) y/o cisteína durante su biosíntesis (Chen et al. 2009), los residuos cisteína diseñados en el producto tal como se expresaron inicialmente no son reactivos con los reactivos reactivos al

tiol, tales como los grupos maleimido o bromo o yodoacetamida. Para conjugar la carga útil con una cisteína diseñada después de la expresión, los aductos de glutatión o cisteína deben eliminarse mediante la reducción de estos aductos de disulfuro, lo que generalmente implica también la reducción de los disulfuros nativos en la proteína expresada. La desprotección de las cisteínas diseñadas con aductos se puede lograr exponiendo primero el anticuerpo a un agente reductor, por ejemplo, ditioneitol (DTT), TCEP o cisteína reducida, seguido de un procedimiento que permite la reoxidación de todos los enlaces de disulfuro nativos de un anticuerpo para restaurar y/o estabilizar la estructura del anticuerpo funcional.

Se pueden emplear varios métodos para reducir y reoxidar anticuerpos con residuos Cys diseñados para la preparación de conjugados de fármacos y anticuerpos. Los intentos de seguir los protocolos de reoxidación descritos previamente en la literatura que utilizan una alta concentración de CuSO_4 dieron como resultado la precipitación de proteínas (Junutula JR, Raab H, Clark S, Bhakta S, Leipold DD, Weir S, Chen Y, Simpson M, Tsai SP, Dennis MS, Lu Y, Meng YG, Ng C, Yang J, Lee CC, Duenas E, Gorrell J, Katta V, Kim A, McDorman K, Flagella K, Venook R, Ross S, Spencer SD, Lee Wong W, Lowman HB, Vandlen R, Sliwowski MX, Scheller RH, Polakis P, Mallet W. (2008) *Nature Biotechnology* 26:925). Hemos preparado y obtenido con éxito conjugados de fármacos y anticuerpos con varios métodos diferentes para la reducción y la reoxidación de anticuerpos.

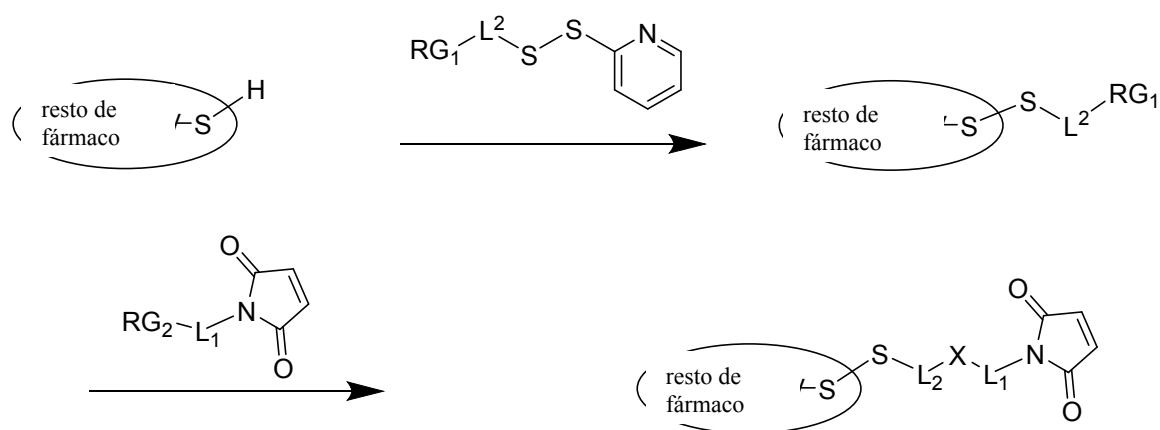
En un ejemplo, se añade DTT recién preparado a los anticuerpos mutantes Cys purificados hasta una concentración final de 10 mM. Después de la incubación con DTT a temperatura ambiente durante 1 hora, la mezcla se dializa a 4°C contra PBS durante tres días, con un intercambio de tampón diario para eliminar DTT y volver a oxidar los enlaces de disulfuro nativos del anticuerpo. Un método alternativo es eliminar los reactivos reductores a través de una columna de desalinización tal como Sephadex G-25, equilibrada con PBS. Una vez que la proteína está completamente reducida, se agrega opcionalmente ascorbato oxidado 1 mM (ácido deshidro-ascórbico) a las muestras desaladas, y se llevan a cabo incubaciones de reoxidación durante 20–24 horas.

En otro método ejemplar, la desprotección de residuos Cys modificados por ingeniería genética se logra mediante la adición de cisteína completamente reducida a una concentración de 20 mM a los anticuerpos unidos a la resina de proteína A-Sepharose. La reducción de los aductos de Cys se logra mediante incubación durante aproximadamente 30–60 minutos a temperatura ambiente, luego el agente reductor se elimina rápidamente lavando la resina con 50 lechos de PBS. La reoxidación del anticuerpo reducido se logra mediante la incubación de

la suspensión lavada a temperatura ambiente con o sin la adición de CuCl_2 , 50–2000 nM como acelerante. Excepto el uso de sulfato de cobre, los ejemplos en el presente documento utilizan cada uno de los protocolos descritos en el presente documento con resultados similares. La reoxidación restaura los disulfuros dentro de la cadena, mientras que la diálisis, la desalinización o la cromatografía de proteína A eliminan el agente reductor, así como las cisteínas y glutaciones inicialmente conectados a las cisteínas diseñadas del anticuerpo. La cromatografía de fase inversa de HPLC se usa típicamente para monitorear el proceso de reoxidación: los anticuerpos se cargan en una columna PLRP-S (4000 Å, 50 mm x 2,1 mm, Agilent), se calientan a 80°C y se eluyen utilizando un gradiente lineal de 30–45% de CH_3CN en agua que contiene 0,1% de TFA a 1,5 mL/min, y detección de picos a 215, 254 y 280 nm.

Después de la reoxidación, el anticuerpo se conjuga con un resto de fármaco–enlazador preformado. A modo de ejemplo, el resto de fármaco–enlazador preformado (tal como, por ejemplo, MMTBT–DM4; MPET–DM4; MBT–DM4; MEPET–DM4, MPBT–DM1; y otros restos de enlazador–fármaco como se describen aquí), es añadido al anticuerpo mutante Cys reoxidado a 10 equivalentes molares en relación con el anticuerpo en el tampón PBS (pH 7.2). Las incubaciones se realizan durante 1 hora. El proceso de conjugación se controla mediante HPLC de fase inversa, que es capaz de separar los anticuerpos conjugados de los no conjugados. Las mezclas de reacción de conjugación se analizan en una columna PRLP-S (4000 Å, 50 mm x 2,1 mm, Agilent) calentada a 80°C, y la elución de la columna se lleva a cabo mediante un gradiente lineal de 30–60% de acetonitrilo en agua que contiene 0,1% de TFA con un caudal de 1,5 ml/min. La elución de proteínas de la columna se monitorea a 280 nm, 254 nm y 215 nm.

En una forma de realización, ejemplos de enlazador–resto de fármaco para la conjugación de cisteína pueden prepararse de acuerdo con los Esquemas 1 a 3:

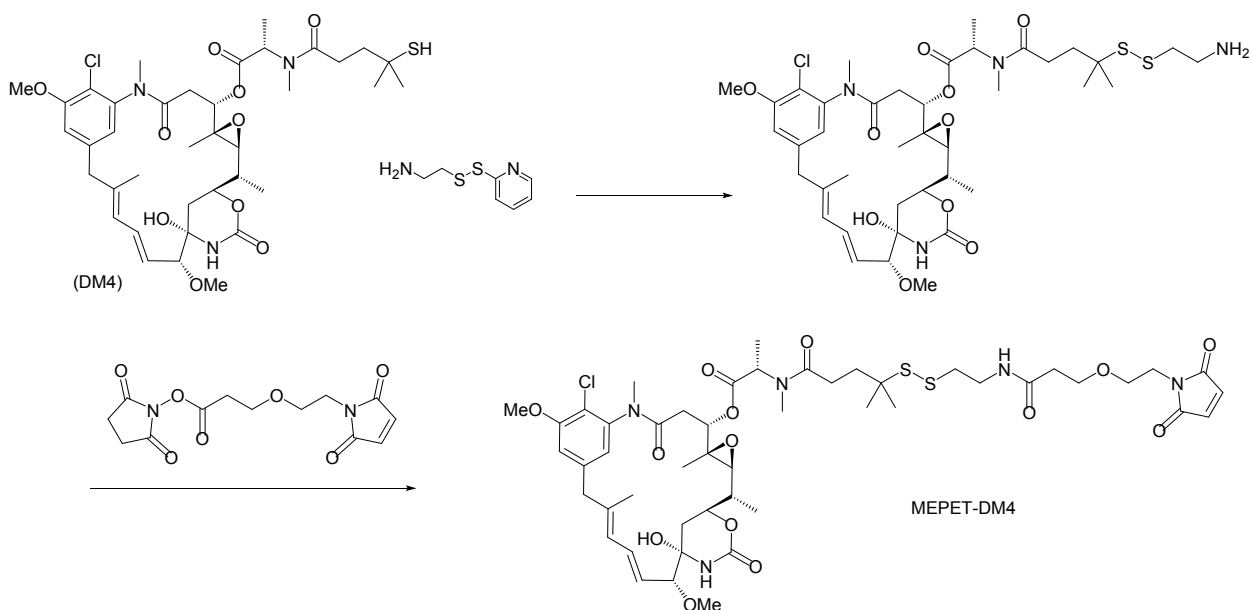


Esquema 1

donde:

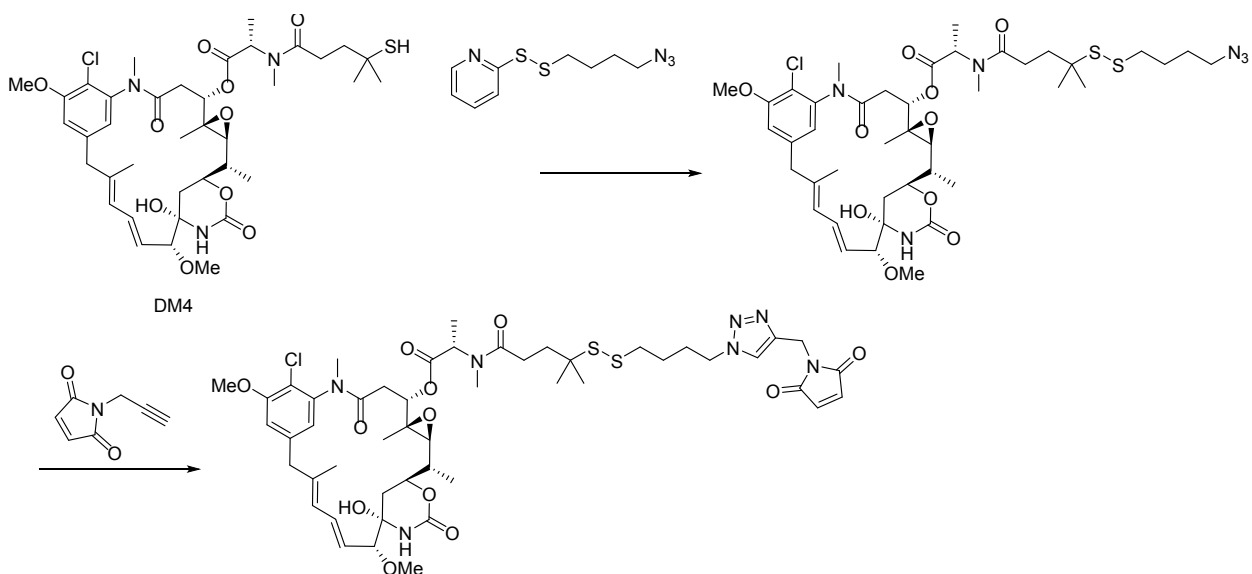
- 5 el resto de fármaco está unido al enlazador por medio de una funcionalidad tiol;
 L¹ es un C₁₋₆alquileo donde uno de los grupos metileno puede estar reemplazado con oxígeno;
 L² es un C₁₋₆alquileo o es -(CH₂CH₂O)_y-CH₂-CH₂- donde y es 1 a 11; y
 X es -C(O)-NH-, -NHC(O)- o un triazol;
 10 donde el alquileo es lineal o ramificado; y
 RG1 y RG2 son 2 grupos reactivos que forma el grupo X.

Los grupos de reacción que forman una amida o un triazol son bien conocidos en la técnica. Un ejemplo de preformación del resto de fármaco-enlazador se representa en el Esquema 2, donde el resto de fármaco es DM4; RG1 es un grupo amino y RG2 es un ácido
 15 activado, que resulta en la formación del enlace de amida (X):



Esquema 2.

Otro ejemplo de preformación del enlazador-resto de fármaco es representado en el Esquema 3, donde el resto de fármaco es DM4; RG1 es un grupo azida, y RG2 es un grupo alquino, para lograr la formación del tetrazol (X):



Esquema 3

La eficacia de la conjugación de diversos restos de fármaco que tienen una maleimida unida a un anticuerpo mutante Cys varía de acuerdo con la solubilidad de los restos de fármaco utilizados; sin embargo, muchas reacciones dan como resultado más del 90% de conjugado.

Para evaluar el estado de agregación, los conjugados resultantes se analizan en una columna de cromatografía por exclusión de tamaño (GE, Superdex200, 3,2/30) con un caudal de 0,1 ml/min en PBS. Todos los conjugados son principalmente monoméricos. La mayoría de los conjugados contienen menos de 3% de material dimérico y oligomérico, lo que indica que la conjugación del resto de fármaco que tiene una maleimida unida al anticuerpo mutante Cys no causa agregación.

Los inmunoconjugados también se caracterizan en términos de carga promedio de un resto de fármaco a un resto de unión a anticuerpo, generalmente denominado relación de fármaco a anticuerpo (DAR). El valor DAR se extrapola, por ejemplo, a partir de datos de LC-MS, para muestras reducidas y desglicosiladas. La LC/MS permite la cuantificación del número promedio de moléculas de carga útil (resto de fármaco) unidas a un anticuerpo en un ADC. La HPLC separa un anticuerpo en cadenas ligeras y pesadas, y también separa la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de acuerdo con el número de grupos de Enlazador-Carga útil por cadena. Los datos espectrales de masas permiten la identificación de las especies componentes en la mezcla, por ejemplo, LC, LC + 1, LC + 2, HC, HC + 1, HC + 2, etc. A partir de la carga promedio de las cadenas LC y HC, el DAR promedio puede ser calculado para un ADC. El DAR para una muestra de inmunoconjugado determinada representa el número promedio de moléculas de fármaco (carga útil) unidas a un anticuerpo tetramérico que contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas.

Proceso para la conjugación a residuos de anticuerpos cisteína nativos.

Los restos de fármaco-enlazador como se describen en el presente documento también pueden conjugarse con residuos cisteína nativos de anticuerpos no diseñados mediante ingeniería genética, utilizando un procedimiento que implica la reducción parcial de los anticuerpos (Doronina, S. O., Toki, B. E., Torgov, M. Y., Mendelsohn, B. A., Cervený, C. G., Chace, D. F., DeBlanc, R. L., Gearing, R. P., Bovee, T. D., Siegall, C. B., Francisco, J. A., Wahl, A. F., Meyer, D. L., y Senter, P. D. (2003) Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. *Nat. Biotechnol.* 21, 778–784). El siguiente protocolo es un ejemplo no limitativo de cómo se pueden preparar dichos conjugados: los enlaces disulfuros inter- e intracatenarios del anticuerpo (en una concentración típicamente de 5 a 10 mg/ml) se reducen parcialmente en primer lugar en PBS que contiene EDTA 2 mM agregando TCEP en una concentración final de 10 mM e incubando la mezcla a 37°C durante 1 hora. Después de desalar y añadir 1% p/v de detergente PS-20, los anticuerpos parcialmente reducidos (1–2 mg/ml) se hacen reaccionar durante la noche a 4°C con 0,5 a 1 mg de un

compuesto de carga útil de enlazador que contiene maleimida por 10 mg de anticuerpo. Los conjugados resultantes se purifican mediante cromatografía de proteína A mediante métodos estándares, se intercambian en tampón PBS, y se perfilan típicamente mediante espectrometría de masas (MS), cromatografía de exclusión de tamaño analítica (AnSEC) y cromatografía de interacción hidrofóbica analítica (AnHIC) para determinar su relación de fármaco a anticuerpo, propensión a la agregación e hidrofobicidad, así como mediante ensayos de actividad.

Proceso de una sola etapa para la reticulación a residuos de anticuerpos lisina.

En una forma de realización, los conjugados de la presente invención se pueden preparar mediante un proceso de una sola etapa para reticular el fármaco a los residuos lisina en el anticuerpo. El proceso comprende combinar el anticuerpo, el fármaco y el agente de reticulación en un medio sustancialmente acuoso, que contiene opcionalmente uno o más cosolventes, a un pH adecuado. En una forma de realización, 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 de reticulación (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) fármaco libre (por ejemplo, DM1 o DM4) y (iii) subproductos de reacción.

En una forma de realización, el proceso de una etapa comprende poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4), y luego, el agente de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) en una solución que tiene un pH de alrededor de 6 o mayor (por ejemplo, alrededor de 6 a alrededor de 9, alrededor de 6 a alrededor de 7, alrededor de 7 a alrededor de 9, alrededor de 7 a alrededor de 8,5, alrededor de 7,5 a alrededor de 8,5, alrededor de 7,5 a alrededor de 8,0, alrededor de 8,0 a alrededor de 9,0, o alrededor de 8,5 a alrededor de 9,0). Por ejemplo, el proceso de la invención comprende poner en contacto un agente de unión celular con el fármaco (DM1 o DM4), y luego, el agente de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) en una solución que tiene un pH de alrededor de 6,0, alrededor de 6,1, alrededor de 6,2, alrededor de 6,3, alrededor de 6,4, alrededor de 6,5, alrededor de 6,6, alrededor de 6,7, alrededor de 6,8, alrededor de 6,9, alrededor de 7,0, alrededor de 7,1, alrededor de 7,2, alrededor de 7,3, alrededor de 7,4, alrededor de 7,5, alrededor de 7,6, alrededor de 7,7, alrededor de 7,8,

alrededor de 7,9, alrededor de 8,0, alrededor de 8,1, alrededor de 8,2, alrededor de 8,3, alrededor de 8,4, alrededor de 8,5, alrededor de 8,6, alrededor de 8,7, alrededor de 8,8, alrededor de 8,9, o alrededor de 9,0. En una forma de realización específica, el proceso de la invención comprende poner en contacto un agente de unión celular con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) y luego, el agente de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) en una solución que tiene un pH de alrededor de 7,8 (por ejemplo, un pH de 7,6 a 8,0, o un pH de 7,7 a 7,9).

El proceso de una etapa (es decir, poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4), y luego, el agente de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) puede llevarse a cabo a cualquier temperatura adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, el proceso de una sola etapa puede ocurrir a alrededor de 20°C o menos (por ejemplo, alrededor de -10°C (siempre que se evite la congelación de la solución, por ejemplo, por la presencia de un solvente orgánico utilizado para disolver el agente citotóxico y el reactivo de reticulación bifuncional) a alrededor de 20°C, alrededor de 0°C a alrededor de 18°C, alrededor de 4°C a alrededor de 16°C), a temperatura ambiente (por ejemplo, alrededor de 20°C a alrededor de 30°C o alrededor de 20°C a alrededor de 25°C), o a una temperatura elevada (por ejemplo, alrededor de 30°C a alrededor de 37°C). En una forma de realización, el proceso de una etapa se produce a una temperatura de alrededor de 16°C a alrededor de 24°C (por ejemplo, alrededor de 16°C, alrededor de 17°C, alrededor de 18°C, alrededor de 19°C, alrededor de 20°C, alrededor de 21°C, alrededor de 22°C, alrededor de 23°C, alrededor de 24°C, o alrededor de 25°C). En otra forma de realización, el proceso de una etapa se lleva a cabo a una temperatura de alrededor de 15°C o menos (por ejemplo, alrededor de -10°C a alrededor de 15°C, o alrededor de 0°C a alrededor de 15°C). Por ejemplo, el proceso comprende poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4), y luego, el agente de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) a una temperatura de alrededor de 15°C, alrededor de 14°C, alrededor de 13°C, alrededor de 12°C, alrededor de 11°C, alrededor de 10°C, alrededor de 9°C, alrededor de 8°C, alrededor de 7°C, alrededor de 6°C, alrededor de 5°C, alrededor de 4°C, alrededor de 3°C, alrededor de 2°C, alrededor de 1°C, alrededor de 0°C, alrededor de -1°C, alrededor de -2°C, alrededor de -3°C, alrededor de -4°C, alrededor de -5°C, alrededor de -6°C, alrededor de -7°C, alrededor de -8°C, alrededor de -9°C, o alrededor de -10°C, siempre que se evita la congelación de la solución, por ejemplo, por la presencia de solventes orgánicos usados para disolver el agente de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, Sulfo-SPDB SPDB, o

CX1-1). En una forma de realización, el proceso comprende poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4), y luego, el agente de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) a una temperatura de alrededor de -10°C a alrededor de 15°C, alrededor de 0°C a alrededor de 15°C, alrededor de 0°C a alrededor de 10°C, alrededor de 0°C a alrededor de 5°C, alrededor de 5°C a alrededor de 15°C, alrededor de 10°C a alrededor de 15°C, o alrededor de 5°C a alrededor de 10°C. En otra forma de realización, el proceso comprende poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) y luego, el agente de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) a una temperatura de alrededor de 10°C (por ejemplo, a una temperatura de 8°C a 12°C, o a una temperatura de 9°C a 11°C).

En una forma de realización, el contacto descrito anteriormente se realiza proporcionando el anticuerpo, luego poniendo 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, poniendo en contacto la primera mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) con el agente de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1). Por ejemplo, en una forma de realización, el anticuerpo se proporciona en un recipiente de reacción, el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) se agrega al recipiente de reacción (de modo de ponerse en contacto con el anticuerpo), y luego, el agente de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) se agrega a la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) (de modo de ponerse en contacto con la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco). En una forma de realización, el anticuerpo se proporciona en un recipiente de reacción, y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) se agrega al recipiente de reacción inmediatamente después de proporcionar el anticuerpo al recipiente. En otra forma de realización, el anticuerpo se proporciona en un recipiente de reacción, y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) se agrega al recipiente de reacción después de un intervalo de tiempo luego de proporcionar el anticuerpo al recipiente (por ejemplo, alrededor de 5 minutos, alrededor de 10 minutos, alrededor de 20 minutos, alrededor de 30 minutos, alrededor de 40 minutos, alrededor de 50 minutos, alrededor de 1 hora, alrededor de 1 día o más luego de proporcionar el agente de unión celular al espacio). El fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) puede agregarse rápidamente (es decir, dentro de un corto intervalo de tiempo, tal como alrededor de 5 minutos, alrededor de 10 minutos) o lentamente (tal como mediante el uso de una bomba).

La mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) luego puede ponerse en contacto con el agente de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1), o bien inmediatamente después de poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4), o en algún momento posterior (por ejemplo, alrededor de 5 minutos a alrededor de 8 horas o más) al contacto del anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4). Por ejemplo, en una forma de realización, el agente de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) se agrega 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 de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) a alrededor de 5 minutos, alrededor de 10 minutos, alrededor de 20 minutos, alrededor de 30 minutos, alrededor de 1 hora, alrededor de 2 horas, alrededor de 3 horas, alrededor de 4 horas, alrededor de 5 horas, alrededor de 6 horas, alrededor de 7 horas, alrededor de 8 horas, o más, después de poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4).

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

En una forma de realización, el proceso de una etapa comprende además una etapa de apagado para apagar cualquier fármaco sin reaccionar (por ejemplo, DM1 o DM4) y/o agente de reticulación sin reaccionar (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1). La etapa de apagado se realiza típicamente antes de la purificación del conjugado. En una forma de realización, la mezcla se apaga poniendo en contacto la mezcla con un reactivo de apagado. Como se usa en este documento, el "reactivo de apagado" se refiere a un reactivo que reacciona con el fármaco libre (por ejemplo, DM1 o DM4) y/o agente de reticulación (por

ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1). En una forma de realización, los reactivos de apagado de maleimida o haloacetamida, tales como ácido 4-maleimidobutírico, ácido 3-maleimidopropiónico, N-etilmaleimida, yodoacetamida o ácido yodoacetamidopropiónico, pueden usarse para garantizar que cualquier grupo sin reaccionar (como tiol) en el fármaco (por ejemplo, DM1 o DM4) sea apagado. La etapa de apagado puede ayudar a prevenir la dimerización del fármaco (por ejemplo, DM1). El DM1 dimerizado puede ser difícil de eliminar. Al apagar con reactivos polares cargados que apagan tiol (tal como el ácido 4-maleimidobutírico o el ácido 3-maleimidopropiónico), el exceso de DM1 sin reaccionar se convierte en un aducto polar, cargado y soluble en agua que se puede separar fácilmente del conjugado enlazado covalentemente, durante la etapa de purificación. También se puede usar el apagado con reactivos de apagado de tiol neutros y no polares. En una forma de realización, la mezcla se apaga poniendo en contacto la mezcla con un reactivo de apagado que reacciona con el agente de reticulación sin reaccionar (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1). Por ejemplo, se pueden agregar nucleófilos a la mezcla a fin de apagar cualquier SMCC que no haya reaccionado. El nucleófilo es preferiblemente un nucleófilo que contiene grupo amino, tal como lisina, taurina e hidroxilamina.

En una forma de realización preferida, la reacción (es decir, el contacto del anticuerpo con el fármaco) (por ejemplo, DM1 o DM4) y luego, el agente de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1)) se deja proceder hasta la finalización, antes de poner en contacto la mezcla con un reactivo de apagado. En este sentido, el reactivo de apagado se agrega a la mezcla alrededor de 1 hora a alrededor de 48 horas (por ejemplo, alrededor de 1 hora, alrededor de 2 horas, alrededor de 3 horas, alrededor de 4 horas, alrededor de 5 horas, alrededor de 6 horas, alrededor de 7 horas, alrededor de 8 horas, alrededor de 9 horas, alrededor de 10 horas, alrededor de 11 horas, alrededor de 12 horas, alrededor de 13 horas, alrededor de 14 horas, alrededor de 15 horas, alrededor de 16 horas, alrededor de 17 horas, alrededor de 18 horas, alrededor de 19 horas, alrededor de 20 horas, alrededor de 21 horas, alrededor de 22 horas, alrededor de 23 horas, alrededor de 24 horas, o alrededor de 25 horas a alrededor de 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 de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1).

Alternativamente, la mezcla se apaga disminuyendo el pH de la mezcla a alrededor de 5,0 (por ejemplo, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1 o 5,2). En otra forma de realización, la mezcla se apaga mediante la disminución 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 baja a alrededor de 4,0 (por ejemplo, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1 o 4,2) a alrededor de 6,0 (por ejemplo, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1 o 6,2), alrededor de 4,0 a alrededor de 5,0, alrededor de 4,5 (por ejemplo, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6 o 4,7) a alrededor de 5,0. En una forma de realización, la mezcla se apaga disminuyendo el pH de la mezcla a 4,8. En otra forma de realización, la mezcla se apaga disminuyendo el pH de la mezcla a 5,5.

En una forma de realización, el proceso de una etapa comprende además una etapa de mantenimiento para liberar los enlazadores unidos de manera inestable, del anticuerpo. La etapa de mantenimiento comprende mantener 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 apagado, o después de la etapa de apagado). Por ejemplo, el proceso comprende (a) poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1, DM3 o DM4) para formar una mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1, DM3 o DM4); y luego poner en contacto la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1, DM3 o DM4) con el agente de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1), en una solución que tiene un pH de alrededor de 4 a alrededor de 9, para proporcionar una mezcla que comprende (i) el conjugado (por ejemplo, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 o Ab-CX1-1-DM1), (ii) fármaco libre (por ejemplo, DM1, DM3 o DM4), y (iii) subproductos de reacción, (b) mantener la mezcla preparada en la etapa (a) para liberar los enlazadores unidos de manera inestable, del agente de unión celular, y (c) purificar la mezcla para proporcionar un conjugado purificado.

En otra forma de realización, el proceso comprende (a) poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (por ejemplo, DM1, DM3 o DM4) para formar una mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1, DM3 o DM4); y luego, poner en contacto la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1, DM3 o DM4) con el agente de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1), en una solución que tiene un pH de alrededor de 4 a alrededor de 9 para proporcionar una mezcla que comprende (i) el conjugado, (ii) fármaco libre (por ejemplo, DM1, DM3 o DM4), y (iii) subproductos de reacción, (b) apagar la mezcla preparada en la etapa (a) para apagar cualquier fármaco sin reaccionar (por ejemplo, DM1, DM3 o DM4) y/o agente de reticulación sin reaccionar (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1), (c) mantener la mezcla preparada en la etapa (b) para liberar los enlazadores unidos de manera inestable, del

agente de unión celular, y (d) purificar la mezcla para proporcionar un conjugado purificado (por ejemplo, Ab–MCC–DM1, Ab–SPDB–DM4 o Ab –CX1–1–DM1).

Alternativamente, la etapa de mantenimiento puede realizarse después de la purificación del conjugado, seguida de una etapa de purificación adicional.

5 En una forma de realización preferida, se permite que la reacción continúe hasta completarse, antes de la etapa de mantenimiento. En este sentido, la etapa de mantenimiento se puede realizar alrededor de 1 hora a alrededor de 48 horas (por ejemplo, alrededor de 1 hora, alrededor de 2 horas, alrededor de 3 horas, alrededor de 4 horas, alrededor de 5 horas, alrededor de 6 horas, alrededor de 7 horas, alrededor de 8 horas, alrededor de 9 horas, alrededor de 10
10 horas, alrededor de 11 horas, alrededor de 12 horas, alrededor de 13 horas, alrededor de 14 horas, alrededor de 15 horas, alrededor de 16 horas, alrededor de 17 horas, alrededor de 18 horas, alrededor de 19 horas, alrededor de 20 horas, alrededor de 21 horas, alrededor de 22 horas, alrededor de 23 horas, alrededor de 24 horas, o alrededor de 24 horas a alrededor de 48 horas) después de que la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (por ejemplo, DM1, DM3 o DM4) se pone en contacto con el agente de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo–SMCC, SPDB, Sulfo–SPDB o CX1–1).

La etapa de mantenimiento comprende mantener la solución a una temperatura adecuada (por ejemplo, alrededor de 0°C a alrededor de 37°C) durante un período de tiempo adecuado (por ejemplo, alrededor de 1 hora a alrededor de 1 semana, alrededor de 1 hora a
20 alrededor de 24 horas, alrededor de 1 hora a alrededor de 8 horas, o alrededor de 1 hora a alrededor de 4 horas) para liberar del anticuerpo los enlazadores ligados de manera inestable, mientras que no se liberan sustancialmente los enlazadores ligados de manera estable, del anticuerpo. En una forma de realización, la etapa de mantenimiento comprende mantener la solución a alrededor de 20°C o menos (por ejemplo, alrededor de 0°C a alrededor de 18°C, alrededor de 4°C a alrededor de 16°C), a temperatura ambiente (por ejemplo, alrededor de 20°C
25 a alrededor de 30°C o alrededor de 20°C a alrededor de 25°C), o a una temperatura elevada (por ejemplo, alrededor de 30°C a alrededor de 37°C). En una forma de realización, la etapa de mantenimiento comprende mantener la solución a una temperatura de alrededor de 16°C a alrededor de 24°C (por ejemplo, alrededor de 15°C, alrededor de 16°C, alrededor de 17°C, alrededor de 18°C, alrededor de 19°C, alrededor de 20°C, alrededor de 21°C, alrededor de 22°C,
30 alrededor de 23°C, alrededor de 24°C, o alrededor de 25°C). En otra forma de realización, la etapa de mantenimiento comprende mantener la solución a una temperatura de alrededor de 2°C a alrededor de 8°C (por ejemplo, alrededor de 0°C, alrededor de 1°C, alrededor de 2°C,

alrededor de 3°C, alrededor de 4°C, alrededor de 5°C, alrededor de 6°C, alrededor de 7°C, alrededor de 8°C, alrededor de 9°C, o alrededor de 10°C). En otra forma de realización, la etapa de mantenimiento comprende mantener la solución a una temperatura de alrededor de 37°C (por ejemplo, alrededor de 34°C, alrededor de 35°C, alrededor de 36°C, alrededor de 37°C, alrededor de 38°C, alrededor de 39°C, o alrededor de 40°C).

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

En una forma de realización, la etapa de mantenimiento comprende mantener la solución a una temperatura de alrededor de 2 °C a alrededor de 8 °C durante un período de por lo menos alrededor de 12 horas durante hasta una semana. En otra forma de realización, la etapa de mantenimiento comprende mantener la solución a una temperatura de alrededor de 2°C a alrededor de 8°C durante la noche (por ejemplo, alrededor de 12 a alrededor de 24 horas, preferentemente alrededor de 20 horas).

El valor de pH para la etapa de mantenimiento preferentemente es alrededor de 4 a alrededor de 10. En una forma de realización, el valor de pH para la etapa de mantenimiento es alrededor de 4 o más, pero menos de alrededor de 6 (por ejemplo, 4 a 5,9), o alrededor de 5 o más, pero menos de alrededor de 6 (por ejemplo, 5 a 5,9). En otra forma de realización, los

valores de pH para la etapa de mantenimiento varían de alrededor de 6 a alrededor de 10 (por ejemplo, alrededor de 6,5 a alrededor de 9, alrededor de 6 a alrededor de 8). Por ejemplo, los valores de pH para la etapa de mantenimiento pueden ser de alrededor de 6, alrededor de 6,5, alrededor de 7, alrededor de 7,5, alrededor de 8, alrededor de 8,5, alrededor de 9, alrededor de 9,5, o alrededor de 10.

En formas de realización específicas, la etapa de mantenimiento puede comprender incubar la mezcla a 25°C a un pH de alrededor de 6–7,5 durante alrededor de 12 horas a alrededor de 1 semana, incubar la mezcla a 4°C a un pH de alrededor de 4,5–5,9 durante alrededor de 5 horas a alrededor de 5 días, o incubar la mezcla a 25°C a un pH de alrededor de 4,5–5,9 durante alrededor de 5 horas a alrededor de 1 día.

El proceso de una etapa puede incluir opcionalmente la adición de sacarosa a la etapa de reacción a fin de aumentar la solubilidad y la recuperación de los conjugados. Convenientemente, la sacarosa se agrega en una concentración de alrededor de 0,1% (p/v) a alrededor de 20% (p/v) (por ejemplo, alrededor de 0,1% (p/v), 1% (p/v), 5% (p/v), 10% (p/v), 15% (p/v), o 20% (p/v)). Preferentemente, la sacarosa se agrega en una concentración de alrededor de 1% (p/v) a alrededor de 10% (p/v) (por ejemplo, alrededor de 0,5% (p/v), alrededor de 1% (p/v), alrededor de 1,5% (p/v), alrededor de 2% (p/v), alrededor de 3% (p/v), alrededor de 4% (p/v), alrededor de 5% (p/v), alrededor de 6% (p/v), alrededor de 7% (p/v), alrededor de 8% (p/v), alrededor de 9% (p/v), alrededor de 10% (p/v), o alrededor de 11% (p/v)). Además, la etapa de reacción también puede comprender la adición de un agente de tamponamiento. Se puede usar cualquier agente tampón adecuado conocido en la técnica. Los agentes tamponantes adecuados incluyen, por ejemplo, un tampón de citrato, un tampón de acetato, un tampón de succinato y un tampón de fosfato. En una forma de realización, el agente de tampón es seleccionado del grupo que consiste en HEPPSO (N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-hidroxi-propanosulfónico)), POPSO (piperazina-1,4-bis-(ácido 2-hidroxi-propano-sulfónico) dehidrato), HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico), HEPPS (EPPS) (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-propanosulfónico), TES (ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfónico) y una de sus combinaciones.

En una forma de realización, el proceso de una etapa puede comprender además la etapa de purificar la mezcla para proporcionar un conjugado purificado (por ejemplo, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 o Ab-CX1-1-DM1). Se puede usar cualquier método de purificación conocido en la técnica para purificar los conjugados de la presente invención. En una forma de realización, los conjugados de la presente invención que usan filtración de flujo tangencial

(TFF), cromatografía de no adsorción, cromatografía de adsorción, filtración de adsorción, precipitación selectiva o cualquier otro proceso de purificación adecuado, así como combinaciones de los anteriores. En otra forma de realización, antes de someter 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 filtran a través de una o más membranas de PVDF después de someter los conjugados al proceso de purificación descrito anteriormente. Por ejemplo, en una forma de realización, los conjugados se filtran a través de una o más membranas de PVDF y luego se purifican utilizando filtración de flujo tangencial. Alternativamente, los conjugados se purifican utilizando filtración de flujo tangencial y luego se filtran a través de una o más membranas de PVDF.

Se puede utilizar cualquier sistema TFF adecuado para la purificación, incluido un sistema de tipo Pellicon (Millipore, Billerica, MA), un sistema de casete Sartocoon (Sartorius AG, Edgewood, NY) y un sistema de tipo Centrasette (Pall Corp., East Hills, NY).

Se puede utilizar cualquier resina de cromatografía de adsorción adecuada para la purificación. Las resinas de cromatografía de adsorción preferidas incluyen cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de inducción de carga hidrofóbica (HCIC), cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio iónico de modo mixto, cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC), cromatografía de ligando de tinte, cromatografía de afinidad, cromatografía de fase inversa y combinaciones de las anteriores. Los ejemplos de resinas de hidroxapatita adecuadas incluyen hidroxapatita cerámica (CHT Tipo I y Tipo II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), hidroxapatita HA Ultrogel (Pall Corp., East Hills, NY) y fluoroapatita 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, NY). Los ejemplos de resinas HIC adecuadas incluyen Butyl-Sepharose, Hexyl-Sepharose, Fenil-Sepharose, y Octyl Sepharose (todas, de GE Healthcare, Piscataway, NJ), así como las resinas Macro-prep Methyl y Macro-Prep t-Butyl (Biorad Laboratories, Hercules, CA). Los ejemplos de resinas de intercambio iónico adecuadas incluyen las resinas SP-Sepharose, CM-Sepharose y Q-Sepharose (todas, de GE Healthcare, Piscataway, NJ), y la resina Unosphere S (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Los ejemplos de intercambiadores de iones de modo mixto adecuados incluyen la resina Bakerbond ABx (JT Baker, Phillipsburg NJ). Los ejemplos de resinas IMAC adecuadas incluyen la resina Chelating Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y la resina Profinity IMAC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Los ejemplos de resinas de ligando de tinte

adecuadas incluyen la resina de Blue Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y la resina Affi-gel Blue (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Los ejemplos de resinas de afinidad adecuadas incluyen resina de Proteína A Sepharose (por ejemplo, MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ) y resinas de afinidad de lectina, por ejemplo, resina Lentil Lectin Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ), donde el anticuerpo porta los sitios de unión de lectina apropiados. Los ejemplos de resinas de fase reversa adecuadas incluyen resinas C4, C8 y C18 (Grace Vydac, Hesperia, CA).

Para la purificación se puede utilizar cualquier resina de cromatografía no adsorbente adecuada. Los ejemplos de resinas de cromatografía no adsorbentes adecuadas incluyen, entre otras, resinas SEPHADEX™ G-25, G-50, G-100, SEPHACRYL™ (por ejemplo, S-200 y S-300), resinas 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 otras conocidas por los expertos en la técnica.

Proceso de dos etapas y proceso de un recipiente para la reticulación con residuos de anticuerpo lisina.

En una forma de realización, los conjugados de la presente invención pueden prepararse como se describe en la Patente de los Estados Unidos Nro. 7.811.572 y en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nro. 2006/0182750. El proceso comprende las etapas de (a) poner en contacto el anticuerpo de la presente invención con el agente de reticulación (por ejemplo, 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; (b) opcionalmente, someter la primera mezcla a un proceso de purificación para preparar una primera mezcla purificada del anticuerpo que tiene el enlazador unido; (c) conjugar el fármaco (por ejemplo, DM1, DM3, o DM4) con el anticuerpo que tiene el enlazador unido en la primera mezcla, haciendo reaccionar el anticuerpo que tiene el enlazador unido, con el fármaco (por ejemplo, DM1, DM3, o DM4) en una solución que tiene un pH de alrededor de 4 a alrededor de 9, a fin de preparar una segunda mezcla que comprende (i) conjugado (por ejemplo, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 o Ab-CX1-1-DM1), (ii) fármaco libre (por ejemplo, DM1, DM3 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, la etapa de purificación (b) puede ser omitida. Puede usarse cualquier método de purificación descrito en este documento, para las etapas (b) y (d). En una

forma de realización, se usa TFF para ambas etapas (b) y (d). En otra forma de realización, se usa TFF para la etapa (b), y se usa cromatografía adsorbente (por ejemplo, CHT), para la etapa (d).

Proceso *in situ* y de reactivo de una etapa para la reticulación a residuos de anticuerpo

5 lisina.

En una forma de realización, los conjugados de la presente invención pueden prepararse mediante la conjugación de compuesto de enlazador-fármaco preformado (por ejemplo, SMCC-DM1, Sulfo-SMCC-DM1, SPDB-DM4 o CX1-1-DM1), con el anticuerpo de la presente invención, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Nro. 6.441.163 y en
10 las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nros. 2011/0003969 y 2008/0145374, seguida de una etapa de purificación. Puede usarse cualquier método de purificación descrito en este documento. El compuesto de enlazador-fármaco se prepara mediante la reacción del fármaco (por ejemplo, DM1, DM3, o DM4) con el agente de reticulación (por ejemplo, SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1). El compuesto
15 de enlazador-fármaco (por ejemplo, SMCC-DM1, Sulfo-SMCC-DM1, SPDB-DM4 o CX1-1-DM1) se somete opcionalmente a la purificación, antes de ser conjugado con el anticuerpo.

Anticuerpos anti-CCR7.

La presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a CCR7. Los
20 anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) de la invención incluyen, sin limitación, los anticuerpos monoclonales humanos o fragmentos de estos, aislados como se describe en los Ejemplos.

La presente invención, en ciertas formas de realización, proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se unen
25 específicamente a CCR7, donde dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) comprenden un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO: 13, 45, 77 o 608. La presente invención en ciertas formas de realización también proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a CCR7, donde dichos
30 anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) comprenden un CDR de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR de VH enumeradas en las Tablas 1 y 4, a continuación. En formas de realización particulares, la invención proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de

unión a antígeno) que se unen específicamente a CCR7, donde dichos anticuerpos comprenden (o alternativamente, consisten en) una, dos, tres, cuatro, cinco o más CDR de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR de VH enumeradas en las Tablas 1 y 4, a continuación.

5 La presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a CCR7, donde dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) comprenden un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 61, 93 o 624. La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos
10 (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a CCR7, donde dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) comprenden una CDR de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR de VL enumeradas en las Tablas 1 y 4, a continuación. En particular, la invención proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se
15 unen específicamente a CCR7, donde dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) comprenden (o alternativamente, consisten en) uno, dos, tres o más CDR de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR de VL enumeradas en las Tablas 1 y 4, más adelante.

 Otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a
20 antígeno) de la invención incluyen aminoácidos que han sido mutados, pero que tienen por lo menos 60, 70, 80, 90 o 95 por ciento de identidad en las regiones CDR con las regiones CDR representadas en las secuencias descritas en las Tablas 1 y 4. En algunas formas de realización, los anticuerpos comprenden secuencias de aminoácidos mutantes en las que no se han mutado más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en las regiones CDR cuando se comparan con las regiones
25 CDR representadas en la secuencia descrita en las Tablas 1 y 4.

 La presente invención también proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican la VH, VL, la cadena pesada de longitud completa y la cadena ligera de longitud completa de los anticuerpos que se unen específicamente a CCR7. Dichas secuencias de ácido nucleico pueden optimizarse para la expresión en células de mamíferos.

30 En todo el texto de esta solicitud, si existiera una discrepancia entre el texto de la memoria descriptiva y el listado de secuencias, prevalecerá el texto de la memoria descriptiva.

Tabla 1. Ejemplos de anticuerpos anti-CCR7 de la presente invención.

506E15 (CysMab DAPA humanizado)		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (Combinada)	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Combinada)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Combinada)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
SEQ ID NO: 5	HCDR2 (Kabat)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 6	HCDR3 (Kabat)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 7	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID NO: 8	HCDR2 (Chothia)	SSGGSF
SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 10	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 11	HCDR2 (IMGT)	ISSGGSFT
SEQ ID NO: 12	HCDR3 (IMGT)	ARRASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 13	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWIR QAPGKGLEWVATISSGGSFTYYPDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRASTVVGTD FDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 14	ADN VH	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTC AAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCT CCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGCCATGTCCTGGATC CGGCAGGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGC CACCATCTCCTCCGGCGGCAGCTTCACCTACTACCCC GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGAC AACGCCAAGAAGTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCC TGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCA GACGGGCCTCCACCGTCGTGGGCACCGATTCGATG TGTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGTCTCC
SEQ ID NO: 15	Cadena Pesada (DAPA, CysMab	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWIR QAPGKGLEWVATISSGGSFTYYPDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRASTVVGTD FDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVV

	mutaciones subrayadas)	TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV <u>A</u> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL <u>A</u> APIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 16	ADN cadena pesada	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTC AAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCT CCGGCTTACCTTCTCCAGCTACGCCATGTCCTGGATC CGGCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAGTGGGTGGC CACCATCTCCTCCGGCGGCAGCTTACCTACTACCCC GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGAC AACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCC TGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCA GACGGGCCTCCACCGTCGTGGGCACCGATTTTCATG TGTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGTCTCCG CCTCCACCAAGGGACCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCC TTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACCGCCGCTCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCTGCCCTGTGA CAGTGTCTTGGAATCCGGCGCTCTGACCTCCGGCGT GCACACCTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTG TACTCCCTGTCTCCGTCTGACCGTGCCTTCCCTCCAG CCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCTCCAACACCAAAGTGGAACAAGCGGGTGGA CCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCT GCCCTGCCCCTGAGCTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTT CCTGTTCCCTCCAAAGCCCCAAGGACACCCTGATGATC TCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCC GTGTCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGG TACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAATGCCAAGACC AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGG GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCACCAGGACTGG CTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTGCCAAC AAGGCCCTGGCCGCTCCCATCGAAAAGACCATCTCCA AGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAAGTGTACA CACTGCCTCCCAGCCGGAAGAGATGACCAAGAACC AAGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCC CTGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCA GCCCAGAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGTCTG GACAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGA CCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGT TCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCA CTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 17	LCDR1 (Combinada)	RASQDIGSSLN

SEQ ID NO: 18	LCDR2 (Combinada)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 19	LCDR3 (Combinada)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 20	LCDR1 (Kabat)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 21	LCDR2 (Kabat)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 22	LCDR3 (Kabat)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 23	LCDR1 (Chothia)	SQDIGSS
SEQ ID NO: 24	LCDR2 (Chothia)	ATS
SEQ ID NO: 25	LCDR3 (Chothia)	YASSPP
SEQ ID NO: 26	LCDR1 (IMGT)	QDIGSS
SEQ ID NO: 27	LCDR2 (IMGT)	ATS
SEQ ID NO: 28	LCDR3 (IMGT)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 29	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVLTLCRASQDIGSSLNWLQQ KPGKAIKRLIYATSSLDSGVPSRFSGRSGTDYTLTISSLQ PEDFVYYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 30	ADN VL	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCAGCCTGTCCG CCTCCGTGGGCGATAGAGTGACCCTGACCTGCCGGG CCTCCCAGGACATCGGCTCCTCCCTGAACTGGCTGCA GCAGAAGCCCGGCAAGGCCATCAAGCGGCTGATCTA CGCCACCTCCTCCCTGGACTCCGGCGTGCCCTCCCGG TTCTCTGGCTCCAGATCCGGCACCGACTACACCCTGA CCATCTCCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGTGGTGTA CTACTGCCTGCAGTACGCCTCCAGCCCTCCACCTTCG GCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 31	Cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRVLTLCRASQDIGSSLNWLQQ KPGKAIKRLIYATSSLDSGVPSRFSGRSGTDYTLTISSLQ PEDFVYYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 32	ADN Cadena ligera	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCAGCCTGTCCG CCTCCGTGGGCGATAGAGTGACCCTGACCTGCCGGG CCTCCCAGGACATCGGCTCCTCCCTGAACTGGCTGCA GCAGAAGCCCGGCAAGGCCATCAAGCGGCTGATCTA CGCCACCTCCTCCCTGGACTCCGGCGTGCCCTCCCGG

		TTCTCTGGCTCCAGATCCGGCACCGACTACACCCTGA CCATCTCCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGTGGTGTA CTACTGCCTGCAGTACGCCTCCAGCCCTCCCACCTTCG GCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTG GCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACG AGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCC TGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGC AGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGGCGAGTGC
121G12 (Humanizado CysMab, DAPA)		
SEQ ID NO: 33	HCDR1 (Combinada)	GFTFSTYAMS
SEQ ID NO: 34	HCDR2 (Combinada)	TISDAGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 35	HCDR3 (Combinada)	RGSRYEYYVMDY
SEQ ID NO: 36	HCDR1 (Kabat)	TYAMS
SEQ ID NO: 37	HCDR2 (Kabat)	TISDAGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 38	HCDR3 (Kabat)	RGSRYEYYVMDY
SEQ ID NO: 39	HCDR1 (Chothia)	GFTFSTY
SEQ ID NO: 40	HCDR2 (Chothia)	SDAGSY
SEQ ID NO: 41	HCDR3 (Chothia)	RGSRYEYYVMDY
SEQ ID NO: 42	HCDR1 (IMGT)	GFTFSTYA
SEQ ID NO: 43	HCDR2 (IMGT)	ISDAGSYS
SEQ ID NO: 44	HCDR3 (IMGT)	ARRGSRYEYYVMDY
SEQ ID NO: 45	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVR QAPGKGLEWVATISDAGSYSYYPDNVKGRTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSRYEYYVMDYWG QGTTVTVSS

SEQ ID NO: 46	ADN VH	GAAGTGCAGCTGGTGGGAATCTGGCGGCGGACTGGTC AAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCT CCGGCTTCACCTTCTCCACCTACGCCATGTCCTGGGTC CGACAGGCCCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGGC CACCATCTCCGACGCCGGCTCCTACTCCTACTACCCCG ACAACGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACA ACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCT GCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG ACGGGGCTCCAGATACGAAGAGTACTACGTGATGGA CTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGTCTC C
SEQ ID NO: 47	Cadena Pesada (DAPA, CysMab mutaciones subrayadas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVR QAPGKGLEWVATISDAGSYSYPDNVKGRTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSRYEYYVMDYWG QGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKCDKHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV <u>A</u> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL <u>A</u> APIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 48	ADN cadena pesada	GAAGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGACTGGTC AAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCT CCGGCTTCACCTTCTCCACCTACGCCATGTCTGGGTG CGACAGGCCCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGGC CACCATCTCCGACGCCGGCTCCTACTCTACTACCCCG ACAACGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACA ACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCT GCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG ACGGGGCTCCAGATACGAAGAGTACTACGTGATGGA CTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGTCTC CGCTCCACCAAGGGACCCTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACCGCCGCTC TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCTGCCCTGT GACAGTGTCTGGAATCCGGCGCTCTGACCTCCGGC GTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCC TGACTCCCTGTCCTCCGTCTGACCGTGCCTTCCCTC AGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAC CACAAGCCCTCCAACACCAAAGTGGACAAGCGGGTG GAACCCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTC CCTGCCCTGCCCTGAGCTGCTGGGAGGCCCTTCCGT GTTCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATG ATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTG GCCGTGTCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAAT TGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAATGCCAAG ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTAC CGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCAACAGGAC TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC AACAAGGCCCTGGCCGCTCCCATCGAAAAGACCATCT CCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAAGTGT ACACACTGCCTCCCAGCCGGGAAGAGATGACCAAGA ACCAAGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTA CCCCTGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGG CCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCT GACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACG TGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA CCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGC AAG
SEQ ID NO: 49	LCDR1 (Combinada)	RASQISNNLH
SEQ ID NO: 50	LCDR2 (Combinada)	YASQIS
SEQ ID NO: 51	LCDR3 (Combinada)	QQSSSWLT

SEQ ID NO: 52	LCDR1 (Kabat)	RASQSSISNNLH
SEQ ID NO: 53	LCDR2 (Kabat)	YASQSSIS
SEQ ID NO: 54	LCDR3 (Kabat)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 55	LCDR1 (Chothia)	SQSSISNN
SEQ ID NO: 56	LCDR2 (Chothia)	YAS
SEQ ID NO: 57	LCDR3 (Chothia)	SSSWL
SEQ ID NO: 58	LCDR1 (IMGT)	QSSISNN
SEQ ID NO: 59	LCDR2 (IMGT)	YAS
SEQ ID NO: 60	LCDR3 (IMGT)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 61	VL	EIVLTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSSISNNLHWYQQK PGQAPRLLIKYASQSSISGIPARFSGSGSGTDFTLTSSVEP EDFGVYFCQQSSSWLTFGQGKLEIK
SEQ ID NO: 62	ADN VL	GAGATCGTGCTGACACAGTCCCCTGCCACCCTGTCTG TGTCTCCCGGCGAGAGAGTGACCCTGTCTGCCGGG CCTCCAGTCCATCTCCAACAACCTGCACTGGTATCA GCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATTAA GTACGCCTCCAGAGCATCTCCGGCATCCCTGCCAGA TTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA CCATCTCCAGCGTGGAACCCGAGGACTTCGGCGTGT ACTTCTGCCAGCAGTCCTCCTCCTGGCTGACCTTCGG CCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 63	Cadena ligera	EIVLTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSSISNNLHWYQQK PGQAPRLLIKYASQSSISGIPARFSGSGSGTDFTLTSSVEP EDFGVYFCQQSSSWLTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 64	ADN Cadena ligera	GAGATCGTGCTGACACAGTCCCCTGCCACCCTGTCTG TGTCTCCCGCGAGAGAGTGACCCTGTCCTGCCGGG CCTCCCAGTCCATCTCCAACAACCTGCACTGGTATCA GCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATTAA GTACGCCTCCCAGAGCATCTCCGGCATCCCTGCCAGA TTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA CCATCTCCAGCGTGGAACCCGAGGACTTCGGCGTGT ACTTCTGCCAGCAGTCCTCCTCCTGGCTGACCTTCGG CCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGC CGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAG CAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTG CTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAG CCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACT CCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAA GGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGA GGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAA GAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
674J13 (Humanizado, CysMab DAPA)		
SEQ ID NO: 65	HCDR1 (Combinada)	GYSITSGYSWH
SEQ ID NO: 66	HCDR2 (Combinada)	HIHSSGSTNYNPSLKS
SEQ ID NO: 67	HCDR3 (Combinada)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 68	HCDR1 (Kabat)	SGYSWH
SEQ ID NO: 69	HCDR2 (Kabat)	HIHSSGSTNYNPSLKS
SEQ ID NO: 70	HCDR3 (Kabat)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 71	HCDR1 (Chothia)	GYSITSGY
SEQ ID NO: 72	HCDR2 (Chothia)	HSSGS
SEQ ID NO: 73	HCDR3 (Chothia)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 74	HCDR1 (IMGT)	GYSITSGYS
SEQ ID NO: 75	HCDR2 (IMGT)	IHSSGST
SEQ ID NO: 76	HCDR3 (IMGT)	ARGGVQAFAY

SEQ ID NO: 77	VH	DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSGYSWHWIR QHPGKGLEWMAHIHSSGSTNYPNPSLKSRTISRDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGVQAFAYWGQGLVT VSS
SEQ ID NO: 78	ADN VH	GACGTGCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTGGTC AAGCCCTCCCAGACCCTGTCCCTGACCTGCACCGTGT CCGGCTACTCTATCACCTCCGGCTACAGCTGGCACTG GATCCGGCAGCACCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGAT GGCCACATCCACTCCTCCGGCTCCACCAACTACAAC CCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCATCTCCCGGGACA CCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGT GACCGCCGCTGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAG AGGCGGCGTGCAGGCCTTCGCTTATTGGGGCCAGGG AACCTGGTCACCGTGTCTCC
SEQ ID NO: 79	Cadena Pesada (DAPA, CysMab mutaciones subrayadas)	DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSGYSWHWIR QHPGKGLEWMAHIHSSGSTNYPNPSLKSRTISRDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGVQAFAYWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHCTPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVVA DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 80	ADN cadena pesada	GACGTGCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTGGTC AAGCCCTCCCAGACCCTGTCCCTGACCTGCACCGTGT CCGGCTACTCTATCACCTCCGGCTACAGCTGGCACTG GATCCGGCAGCACCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGAT GGCCACATCCACTCCTCCGGCTCCACCAACTACAAC CCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCATCTCCCGGAC CCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGT GACCGCCGCTGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAG AGGCGGCGTGCAGGCCTTCGCTTATTGGGGCCAGGG AACCTGGTCACCGTGTCTCCGCCAGCACCAAGGG ACCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCAGCAAGTCCA CCTCTGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAA GGACTACTTCCCCTGCCCCGTGACCGTGTCTGGAAC TCCGGCGCTCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTG CCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCAG CGTCGTGACCGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACA CCAAAGTGGACAAGCGGGTGGAAACCAAGTCTGCG ACAAGACCCACACCTGTCCTCCCTGCCCTGCCCTGA GCTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCTGTTCCCTCCA AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTG AAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCGTGTCCCACGAGG ATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCG TGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAG GAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTG CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAA GAGTACAAGTGCAAAGTGCCAACAAGGCCCTGGCC GCTCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGC CAGCCCAGAGAGCCCCAAGTGTACACACTGCCTCCCA GCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAAGTGTCCCTGA CCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTGCGATATCGC CGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCCAGAGAACA ACTACAAGACCACCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGG CTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAG TCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCG TGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGA AGTCCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG
SEQ ID NO: 81	LCDR1 (Combinada)	SASSSVIYMH
SEQ ID NO: 82	LCDR2 (Combinada)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 83	LCDR3 (Combinada)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 84	LCDR1 (Kabat)	SASSSVIYMH

SEQ ID NO: 85	LCDR2 (Kabat)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 86	LCDR3 (Kabat)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 87	LCDR1 (Chothia)	SSSVIY
SEQ ID NO: 88	LCDR2 (Chothia)	DTS
SEQ ID NO: 89	LCDR3 (Chothia)	WSSNPL
SEQ ID NO: 90	LCDR1 (IMGT)	SSVIY
SEQ ID NO: 91	LCDR2 (IMGT)	DTS
SEQ ID NO: 92	LCDR3 (IMGT)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 93	VL	EIVLTQSPATLSASPGERVMTMCSASSSVIYMHWYQQK PGQAPRRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISS MEPEDAAVYYCQQWSSNPLTFGQGGTKLEIK
SEQ ID NO: 94	ADN VL	GAGATCGTGCTGACACAGTCCCCTGCCACCCTGTCCG CCTCTCCAGGCGAGCGCGTGACAATGTCTGCTCCGC CTCCTCCTCCGTGATCTACATGCACTGGTATCAGCAG AAGCCCGGCCAGGCCCTCGGCGGTGGATCTACGAT ACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCGCCAGATTCT CCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTACACCCTGACCAT CTCCAGCATGGAACCCGAGGACGCCGCCGTGTACTA CTGCCAGCAGTGGTCCTCCAACCCTCTGACCTTCGGC CAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 95	Cadena ligera	EIVLTQSPATLSASPGERVMTMCSASSSVIYMHWYQQK PGQAPRRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISS MEPEDAAVYYCQQWSSNPLTFGQGGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 96	ADN Cadena ligera	GAGATCGTGCTGACACAGTCCCCTGCCACCCTGTCCG CCTCTCCAGGCGAGCGCTGACAATGTCCTGCTCCGC CTCCTCCTCCGTGATCTACATGCACTGGTATCAGCAG AAGCCCGGCCAGGCCCTCGGCGGTGGATCTACGAT ACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCGCCAGATTCT CCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTACACCCTGACCAT CTCCAGCATGGAACCCGAGGACGCCGCCGTGTACTA CTGCCAGCAGTGGTCCTCCAACCCTCTGACCTTCGGC CAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGACGAGC AGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGC TGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGT GGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGC CAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTC CACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAA GGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGA GGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAA GAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
---------------	-------------------	---

Otros anticuerpos de la invención incluyen aquellos en los que los aminoácidos o ácidos nucleicos que codifican los aminoácidos se han mutado, pero tienen por lo menos 60, 70, 80, 90 o 95 por ciento de identidad con las secuencias descriptas en las Tablas 1 y 4. En algunas formas de realización, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos se han mutado en las regiones variables cuando se comparan con las regiones variables representadas en la secuencia descripta en las Tablas 1 y 4, mientras que conservan sustancialmente la misma actividad terapéutica que los anticuerpos enumerados en las tablas 1 y 4.

Como cada uno de estos anticuerpos puede unirse a CCR7, las secuencias de VH, VL, de cadena ligera de longitud completa y de cadena pesada de longitud completa (secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos) pueden "mezclarse y emparejarse" para crear otros anticuerpos de unión a CCR7 de la invención. Dichos anticuerpos de unión a CCR7 "mezclados y emparejados" pueden evaluarse utilizando los ensayos de unión conocidos en la técnica (por ejemplo, ELISA y otros ensayos descriptos en la sección de Ejemplos). Cuando estas cadenas se mezclan y se emparejan, una secuencia VH de un par VH/VL particular debe reemplazarse con una secuencia VH estructuralmente similar. Del mismo modo, una secuencia de cadena pesada de longitud completa de un par de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa particular debe reemplazarse con una secuencia de cadena pesada de longitud completa estructuralmente similar. Del mismo modo, una secuencia VL de un par VH/VL particular debe

reemplazarse con una secuencia VL estructuralmente similar. De igual modo, una secuencia de cadena ligera de longitud completa de una par de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa particular debe reemplazarse por una secuencia de cadena ligera de longitud completa estructuralmente similar. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o una región de unión a antígeno de este que tiene: una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 13, 45, 77 y 608; y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 29, 61, 93 y 624; donde el anticuerpo se une específicamente a CCR7.

En otro aspecto, la invención proporciona (i) un anticuerpo monoclonal aislado que tiene: una cadena pesada de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos que se ha optimizado para la expresión en la célula de un sistema de expresión mamífero seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID NO: 15, 47, 79 y 610; y una cadena ligera de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos que se ha optimizado para la expresión en la célula de un mamífero, seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31, 63, 95 y 626; o (ii) una proteína funcional que comprende una de sus porciones de unión a antígeno.

En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos de unión a CCR7 que comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera que se describen en las Tablas 1 y 4, o sus combinaciones. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de VH de los anticuerpos se muestran, por ejemplo, en SEQ ID NOs: 1, 4, 7, 10, 33, 36, 39, 42, 65, 68, 71 y 74. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de VH de los anticuerpos se muestran, por ejemplo, en SEQ ID NOs: 2, 5, 8, 11, 34, 37, 40, 43, 66, 69, 72 y 75. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de VH de los anticuerpos se muestran, por ejemplo, en SEQ ID NOs: 3, 6, 9, 12, 35, 38, 41, 44, 67, 70, 73 y 76. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de VL de los anticuerpos se muestran, por ejemplo, en SEQ ID NOs: 17, 20, 23, 26, 49, 52, 55, 58, 81, 84, 87 y 90. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de VL de los anticuerpos se muestran, por ejemplo, en SEQ ID Nos: 18, 21, 24, 27, 50, 53, 56, 59, 82, 85, 88 y 91. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de VL de los anticuerpos se muestran, por ejemplo, en SEQ ID NOs: 19, 22, 25, 28, 51, 54, 57, 60, 83, 86, 89 y 92.

Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a CCR7 y que la especificidad de unión al antígeno es proporcionada principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias

CDR1, CDR2 y CDR3 de VH y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de VL pueden ser "mezcladas y emparejadas" (es decir, las CDR de diferentes anticuerpos pueden mezclarse y emparejarse). Dichos anticuerpos de unión a CCR7 "mezclados y emparejados" pueden evaluarse utilizando los ensayos de unión conocidos en la técnica y los descritos en los Ejemplos (por ejemplo, ELISA). Cuando las secuencias de CDR de VH se mezclan y se emparejan, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de VH particular debe reemplazarse con secuencia de CDR estructuralmente similar. Asimismo, cuando las secuencias de CDR de VL se mezclan y se emparejan, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de VL particular debe reemplazarse con secuencia de CDR estructuralmente similar. Será fácilmente evidente para los expertos en la técnica que las nuevas secuencias de VH y VL pueden crearse sustituyendo una o más secuencias de región CDR de VH y/o VL con secuencias estructuralmente similares de las secuencias de CDR mostradas en este documento para anticuerpos monoclonales de la presente invención.

Por consiguiente, en algunas formas de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o una región de unión a antígeno de este, que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 4, 7, 10, 33, 36, 39, 42, 65, 68, 71, 74, 596, 599, 602 y 605; una CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2, 5, 8, 11, 34, 37, 40, 43, 66, 69, 72, 75, 597, 600, 603 y 606; una CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 3, 6, 9, 12, 35, 38, 41, 44, 67, 70, 73, 76, 598, 601, 604 y 607; una CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 17, 20, 23, 26, 49, 52, 55, 58, 81, 84, 87, 90, 612, 615, 618 y 621; una CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 18, 21, 24, 27, 50, 53, 56, 59, 82, 85, 88, 91, 613, 616, 619 y 622; y una CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 19, 22, 25, 28, 51, 54, 57, 60, 83, 86, 89, 92, 614, 617, 620 y 623; donde el anticuerpo se une específicamente a CCR7.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 1, una CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 2; una CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 3; una CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO:

17; una CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 18; y una CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 19.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una
5 CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 4, una CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 5; una CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 6; una CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 20; una CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 21; y una CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 22.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por
10 ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 7, una CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 8; una CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 9; una CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 23; una CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 24; y una CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 25.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por
15 ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 10, una CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 11; una CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 12; una CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 26; una CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 27; y una CDR3 de cadena ligera de SEQ ID
20 NO: 28.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por
ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 33, una CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 34; una CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 35; una CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO:
25 49; una CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 50; y una CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 51.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por
ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 36, una CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 37;
30 una CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 38; una CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 52; una CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 53; y una CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 54.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 39, una CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 40; una CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 41; una CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 55; una CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 56; y una CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 57.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 42, una CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 43; una CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 44; una CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 58; una CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 59; y una CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 60.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 65, una CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 66; una CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 67; una CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 81; una CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 82; y una CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 83.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 68, una CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 69; una CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 70; una CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 84; una CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 85; y una CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 86.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 71, una CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 72; una CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 73; una CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 87; una CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 88; y una CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 89.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 74, una CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 75;

una CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 76; una CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 90; una CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 91; y una CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 92.

5 En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 596, una HCDR2 de SEQ ID NO: 597, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 598; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 612, una LCDR2 de SEQ ID NO: 613, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 614.

10 En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 599, una HCDR2 de SEQ ID NO: 600, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 601; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 615, una LCDR2 de SEQ ID NO: 616, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 617.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 602, una HCDR2 de SEQ ID NO: 603, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 604; y una región variable de
20 cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 618, una LCDR2 de SEQ ID NO: 619, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 620.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 605, una
25 HCDR2 de SEQ ID NO: 606, y una HCDR3 de SEQ ID NO: 607; y una región variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 de SEQ ID NO: 621, una LCDR2 de SEQ ID NO: 622, y una LCDR3 de SEQ ID NO: 623.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una
30 región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 608, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 624.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95.

En una forma de realización específica, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a CCR7 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 610, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 626.

En ciertas formas de realización, un anticuerpo que se une específicamente a CCR7 es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno) que se describe en las Tablas 1 y 4.

1. Identificación de epítomos y anticuerpos que se unen al mismo epítomo.

5 La presente invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente al mismo epítomo que los anticuerpos anti-CCR7 descritos en las Tablas 1 y 4, o que compiten en forma cruzada con los anticuerpos descritos en las Tablas 1 y 4. Por lo tanto, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos adicionales (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) pueden identificarse
10 en función de su capacidad para competir de forma cruzada (por ejemplo, para inhibir competitivamente la unión, de manera estadísticamente significativa) con otros anticuerpos de la invención en ensayos de unión a CCR7, por ejemplo, a través de BIACORE o ensayos conocidos por los expertos en la técnica para medir la unión. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo,
15 fragmentos de unión a antígeno) de la presente invención a un CCR7 (por ejemplo, CCR7 humano) demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con ese anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) por la unión a CCR7; dicho anticuerpo puede, según una teoría no limitativa, unirse al mismo epítomo, o a un epítomo relacionado (por ejemplo, estructuralmente similar o espacialmente proximal o superpuesto),
20 en la proteína CCR7, que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) con el que compite. En ciertas formas de realización, los anticuerpos que se unen al mismo epítomo en CCR7 que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) descritos en las Tablas 1 y 4 son anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. Tales anticuerpos monoclonales humanos o humanizados pueden
25 prepararse y aislarse como se describe en el presente documento.

2. Alteración adicional del marco de la región Fc.

Los inmunoconjugados de la invención pueden comprender anticuerpos modificados o fragmentos de unión a antígeno de estos, que comprenden adicionalmente modificaciones de residuos de marco dentro de VH y/o VL, por ejemplo, para mejorar las propiedades del
30 anticuerpo. En algunas formas de realización, las modificaciones de marco se realizan para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es "retromutar" uno o más residuos de marco a la secuencia de línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido una mutación somática puede contener residuos de marco que

difieren de la secuencia de línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Dichos residuos pueden identificarse comparando las secuencias de marco del anticuerpo con las secuencias de línea germinal de las que se deriva el anticuerpo. A fin de retornar las secuencias de la región de marco a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas se pueden "retromutar" a la secuencia de línea germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio. Dichos anticuerpos "retromutados" también están destinados a ser abarcados por la invención.

Otro tipo de modificación de marco implica mutar uno o más residuos dentro de la región de marco, o incluso dentro de una o más regiones de CDR, para eliminar los epítomos de células T con el fin de reducir 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 los Estados Unidos Número 20030153043, de Carr et al.

En forma adicional o como alternativa a las modificaciones realizadas dentro del marco o de las regiones CDR, los anticuerpos de la invención pueden diseñarse para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida sérica, fijación del complemento, unión al receptor Fc y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno (ADCC, conforme a sus siglas en inglés). Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, uno o más restos químicos pueden unirse al anticuerpo), o modificarse para alterar su glicosilación, nuevamente, con el fin de alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas formas de realización se describe con más detalle a continuación.

En una forma de realización, la región de bisagra de CH1 se modifica de manera que se altera el número de residuos cisteína en la región de bisagra, por ejemplo, se aumenta o se disminuye. Este enfoque se describe con más detalle en la Patente de los Estados Unidos Nro. 5.677.425 de Bodmer et al. El número de residuos cisteína en la región de 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.

En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento incluye residuos de aminoácidos modificados o diseñados genéticamente, por ejemplo, uno o más residuos cisteína, como sitios para la conjugación con un resto de fármaco (Junutula JR, et al., Nat Biotechnol 2008, 26: 925–932). En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo que comprende una sustitución de uno o más aminoácidos con cisteína en las posiciones descriptas

en el presente documento. Los sitios para la sustitución de cisteína están en las regiones constantes del anticuerpo o fragmento de anticuerpo y, por lo tanto, son aplicables a una diversidad de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, y los sitios se seleccionan para proporcionar conjugados estables y homogéneos. Un anticuerpo o fragmento modificado puede tener una, dos o más sustituciones de cisteína, y estas sustituciones pueden usarse en combinación con otras modificaciones y métodos de conjugación como se describe en el presente documento. Los métodos para insertar cisteína en ubicaciones específicas de un anticuerpo son conocidos en la técnica; ver, por ejemplo, Lyons et al., (1990) *Protein Eng.*, 3: 703–708, WO 2011/005481, WO2014/124316, WO 2015/138615. En ciertas formas de realización, un anticuerpo modificado comprende una sustitución de uno o más aminoácidos con cisteína en su región constante seleccionada de las posiciones 117, 119, 121, 124, 139, 152, 153, 155, 157, 164, 169, 171, 174, 189, 191, 195, 197, 205, 207, 246, 258, 269, 274, 286, 288, 290, 292, 293, 320, 322, 326, 333, 334, 335, 337, 344, 355, 360, 375, 382, 390, 392, 398, 400 y 422 de una cadena pesada del anticuerpo, y en donde las posiciones están numeradas de acuerdo con el sistema de EU. En algunas formas de realización, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo comprende una sustitución de uno o más aminoácidos con cisteína en su región constante, seleccionada de las posiciones 107, 108, 109, 114, 129, 142, 143, 145, 152, 154, 156, 159, 161, 165, 168, 169, 170, 182, 183, 197, 199 y 203 de una cadena ligera del anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en donde las posiciones están numeradas de acuerdo con el sistema EU, y en donde la cadena ligera es una cadena ligera kappa humana. En ciertas formas de realización, un anticuerpo modificado o su fragmento de anticuerpo comprende una combinación de sustitución de dos o más aminoácidos con cisteína en sus regiones constantes, donde las combinaciones comprenden sustituciones en las posiciones 375 de una cadena pesada de anticuerpo, posición 152 de una cadena pesada de anticuerpo, posición 360 de una cadena pesada de anticuerpo, o la posición 107 de una cadena ligera de anticuerpo, y en donde las posiciones están numeradas según el sistema EU. En ciertas formas de realización, un anticuerpo modificado o su fragmento de anticuerpo comprende una sustitución de un aminoácido con cisteína en sus regiones constantes, donde la sustitución es la posición 375 de una cadena pesada de anticuerpo, la posición 152 de una cadena pesada de anticuerpo, la posición 360 de una cadena pesada de anticuerpo, posición 107 de una cadena ligera de anticuerpo, posición 165 de una cadena ligera de anticuerpo o posición 159 de una cadena ligera de anticuerpo, y en donde las posiciones están numeradas de acuerdo con el sistema EU, y en donde la cadena ligera es una cadena kappa. En formas de realización particulares, un

anticuerpo modificado o su fragmento de anticuerpo comprende una combinación de sustitución de dos aminoácidos con cisteína en sus regiones constantes, en donde las combinaciones comprenden sustituciones en las posiciones 375 de una cadena pesada de anticuerpo y la posición 152 de una cadena pesada de anticuerpo, en donde las posiciones están numeradas según el sistema EU. En formas de realización particulares, un anticuerpo modificado o su fragmento de anticuerpo comprende una sustitución de un aminoácido con cisteína en la posición 360 de una cadena pesada de anticuerpo, donde las posiciones están numeradas según el sistema EU. En otras formas de realización particulares, un anticuerpo modificado o su fragmento de anticuerpo comprende una sustitución de un aminoácido con cisteína en la posición 107 de una cadena ligera de anticuerpo, y donde las posiciones están numeradas según el sistema EU, y donde la cadena ligera es una cadena kappa.

En formas de realización adicionales, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmento de unión a antígeno) útiles en inmunoconjugados de la invención incluyen anticuerpos modificados o diseñados por ingeniería genética, tales como un anticuerpo modificado para introducir uno o más otros aminoácidos reactivos (distintos de la cisteína), incluidos Pcl, pirrolisina, etiquetas peptídicas (como las etiquetas S6, A1 e ybbR), y aminoácidos no naturales, en lugar de por lo menos un aminoácido de la secuencia nativa, de modo de proporcionar un sitio reactivo en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para conjugación a un resto de fármaco o un resto de fármaco–enlazador con reactividad complementaria. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden modificarse para incorporar Pcl o pirrolisina (W. Ou, et al., (2011) PNAS 108 (26), 10437–10442; WO2014124258) o aminoácidos no naturales (J. Y. Axup, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 109 (2012), pp. 16101–16106; para una revisión, ver C. C. Liu y P. G. Schultz (2010) Annu Rev Biochem 79, 413–444; CH Kim, et al., (2013) Curr Opin Chem Biol. 17, 412–419) como sitios para la conjugación con un fármaco. De manera similar, las etiquetas peptídicas para los métodos de conjugación enzimática se pueden introducir en un anticuerpo (Strop P., et al., Chem Biol. 2013, 20 (2): 161–7; Rabuka D., Curr Opin Chem Biol. 2010 Dec; 14 (6): 790–6; Rabuka D, et al., Nat Protoc. 2012, 7 (6): 1052–67). Otro ejemplo es el uso de 4'–fosfopanteteinil transferasas (PPTasa) para la conjugación de análogos de Co–enzima A (WO2013184514), y (Grünwald et al., (2015) Bioconjugate Chem. 26 (12), 2554–62). Los métodos para conjugar dichos anticuerpos modificados o diseñados con cargas útiles o combinaciones de enlazador–carga útil son conocidos en la técnica.

En otra forma de realización, la región de bisagra Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o más mutaciones de aminoácidos se introducen en la región de la interfaz del dominio CH₂–CH₃ del fragmento Fc–bisagra, de modo que el anticuerpo tiene una unión deficiente de proteína A de *Estafilococo* (SpA) en relación con la unión de SpA del dominio de la bisagra Fc nativo. Este enfoque se describe con más detalle en la Patente de Estados Unidos Nro.0 6.165.745 de Ward et al.

En otras formas de realización más, la región de Fc se altera reemplazando por lo menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden reemplazarse con un residuo de aminoácido diferente, de modo que el anticuerpo tiene una afinidad alterada por un ligando efector, pero retiene la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector en el que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.624.821 y 5.648.260, ambas, de Winter et al.

En otra forma de realización, uno o más aminoácidos seleccionados de residuos de aminoácidos pueden reemplazarse con un residuo de aminoácido diferente, de modo que el anticuerpo tiene alterada unión a C1q y/o reducida o nula citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque se describe, por ejemplo, en la Patentes de los Estados Unidos Nro. 6.194.551, de Idusogie et al.

En otra forma de realización, uno o más residuos de aminoácidos se alteran para alterar así la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe, por ejemplo, en la Publicación PCT WO 94/29351, de Bodmer et al. Los residuos de aminoácidos alotípicos incluyen, sin limitación, la región constante de una cadena pesada de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3, así como la región constante de una cadena ligera del isotipo kappa, como lo describen Jefferis et al., MABs. 1: 332–338 (2009).

Los complejos de proteínas de fusión de anticuerpos que contienen tales mutaciones median la reducida o nula citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En algunas formas de realización, el residuo de aminoácido N267 de la región constante de IgG1 es sustituido con A267. En algunas formas de realización, los residuos de aminoácidos D265 y P329 de la región constante de IgG1 son sustituidos con A265 y A329. En ciertas formas de realización, una cadena pesada de inmunoglobulina opcionalmente comprende una mutación o combinación de mutaciones que confieren reducida función efectora, seleccionadas de cualquiera de D265A, P329A, P329G,

N297A, D265A/P329A, D265A/N297A, L234/L235A, P329A/L234A/L235A y P329G/L234A/L235A. En formas de realización particulares, un inmunoconjugado comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una mutación o combinación de mutaciones que confieren reducida función efectora, seleccionadas de cualquiera de D265A, P329A, P329G, N297A, D265A/P329A, D265A/N297A, L234/L235A, P329A/L234A/L235A, y P329G/L234A/L235A.

En otra forma de realización, uno o más residuos de aminoácidos se alteran para alterar de este modo la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe, por ejemplo, en la Publicación PCT WO 94/29351, de Bodmer et al. En una forma de realización específica, uno o más aminoácidos de un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de la presente invención se reemplazan por uno o más residuos de aminoácidos alotípicos. Los residuos de aminoácidos alotípicos también incluyen, sin limitación, la región constante de la cadena pesada de las subclases de IgG1, IgG2 e IgG3, así como la región constante de la cadena ligera del isotipo kappa como lo describen Jefferis et al., MAbs. 1: 332–338 (2009).

En otra forma de realización más, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede producir un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el "antígeno". Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos que producen la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de marco de región variable, para eliminar así la glicosilación en ese sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dicho enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.714.350 y 6.350.861, de Co et al.

En otra forma de realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Diversos enfoques son posibles. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 6.277.375, de Ward. Alternativamente, a fin de aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o CL para contener un epítipo de unión de receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.869.046 y 6.121.022, de Presta et al.

3. Producción de los anticuerpos CCR7.

Los anticuerpos anti-CCR7 y sus fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) pueden producirse por cualquier medio conocido en la técnica, lo que incluye, entre otros, expresión recombinante, síntesis química y digestión enzimática de tetrameros de anticuerpos, mientras que los anticuerpos monoclonales de longitud completa pueden obtenerse, por ejemplo, por hibridoma o producción recombinante. La expresión recombinante puede ser de cualquier célula huésped apropiada conocida en la técnica, por ejemplo, células huéspedes de mamífero, células huéspedes bacterianas, células huéspedes de levadura, células huéspedes de insecto, etc.

La invención además proporciona polinucleótidos que codifican los anticuerpos descritos en este documento, por ejemplo, polinucleótidos que codifican regiones variables de cadena pesada o ligera o segmentos que comprenden las regiones determinantes de complementariedad como se describen en este documento. En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica las regiones variables de cadena pesada tiene por lo 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 consiste en SEQ ID NOs: 14, 46, 78 y 609. En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica las regiones variables de cadena ligera tiene por lo 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 consiste en SEQ ID NOs: 30, 62, 94 y 625.

En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica la cadena pesada tiene por lo 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 SEQ ID NO: 16, 48, 80 o 611. En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica la cadena ligera tiene por lo 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 SEQ ID NO: 32, 64, 96 o 627.

Los polinucleótidos de la invención pueden codificar solo la secuencia de la región variable de un anticuerpo anti-CCR7. También pueden codificar tanto una región variable como una región constante del anticuerpo. Algunas de las secuencias de polinucleótidos codifican un polipéptido que comprende regiones variables tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera de uno de los anticuerpos anti-CCR7 de ratón ejemplificados. Algunos otros polinucleótidos codifican dos segmentos polipeptídicos que, respectivamente, son

sustancialmente idénticos a las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de uno de los anticuerpos de ratón.

Las secuencias de polinucleótidos pueden producirse mediante una síntesis de ADN en fase sólida *de novo*, o mediante mutagénesis por PCR de una secuencia existente (por ejemplo, secuencias como las descritas en los Ejemplos a continuación) que codifica un anticuerpo anti-CCR7 o su fragmento de unión. La síntesis química directa de ácidos nucleicos se puede lograr mediante métodos conocidos en la técnica, como el método del fosfotriéster de Narang et al., Meth. Enzymol. 68: 90, 1979; el método del fosfodiéster de Brown et al., Meth. Enzymol. 68: 109, 1979; el método de dietilfosforamidita de Beaucage et al., Tetra. Lett., 22: 1859, 1981; y el método de soporte sólido de la Patente de los Estados Unidos Nro. 4.458.066. La introducción de mutaciones en una secuencia de polinucleótidos mediante PCR se puede realizar como se describe en, por ejemplo, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19: 967, 1991; y Eckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

También se proporcionan en la invención vectores de expresión y células huéspedes para producir los anticuerpos anti-CCR7 descritos anteriormente. Se pueden emplear diversos vectores de expresión para expresar los polinucleótidos que codifican las cadenas de anticuerpo anti-CCR7 o los fragmentos de unión. Se pueden usar vectores de expresión tanto de base viral como no viral para producir los anticuerpos en una célula huésped de mamífero. Los 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 et al., Nat Genet 15: 345, 1997). Por ejemplo, los vectores no virales útiles para la expresión de los polinucleótidos y polipéptidos anti-CCR7 en células de mamíferos (por ejemplo, humanos) incluyen pThioHis A, B y C, pcDNATM3.1/His, pEBVHis A, B y C (Invitrogen, San Diego, CA), vectores MPSV y muchos otros vectores conocidos en la técnica para expresar otras proteínas. Los vectores virales útiles incluyen vectores a base de retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus de herpes, vectores a base de SV40, virus de papiloma, virus HBP Epstein Barr, vectores de virus de la vacuna y virus de Semliki Forest (SFV). Ver Brent et al., Supra; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49: 807, 1995; y Rosenfeld et al., Cell 68: 143, 1992.

La elección del vector de expresión depende de las células huéspedes previstas en las que se va a expresar el vector. Típicamente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (por ejemplo, mejoradores) que están unidas operativamente a los polinucleótidos que codifican una cadena o fragmento de anticuerpo anti-CCR7. En algunas formas de realización, se emplea un promotor inducible para prevenir la expresión de secuencias insertadas excepto en condiciones de inducción. Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo, arabinosa, lacZ, promotor de metalotioneína o un promotor de choque térmico. Los cultivos de organismos transformados pueden expandirse en condiciones no inductoras, sin sesgar la población para secuencias codificadoras cuyos productos de expresión son mejor tolerados por las células huéspedes. Además de los promotores, otros elementos reguladores también pueden ser requeridos o deseados para la expresión eficiente de una cadena o fragmento de anticuerpo anti-CCR7. 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 mejorarse mediante la inclusión de mejoradores apropiados para el sistema celular en uso (ver, por ejemplo, Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20: 125, 1994; y Bittner et al., Meth. Enzymol., 153: 516, 1987). Por ejemplo, el mejorador de SV40 o el mejorador de CMV pueden usarse para aumentar la expresión en células huéspedes de mamíferos.

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 de anticuerpo anti-CCR7 insertadas. Más a menudo, las secuencias de anticuerpo anti-CCR7 insertadas se enlazan a una secuencia señal antes de la inclusión en el vector. Los vectores que se usarán para recibir secuencias que codifican dominios variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo anti-CCR7 a veces también codifican regiones constantes o partes de ellas. Dichos vectores permiten la expresión de las regiones variables como proteínas de fusión con las regiones constantes, lo que conduce a la producción de anticuerpos intactos o fragmentos de estos. Típicamente, dichas regiones constantes son humanas.

Las células huéspedes para albergar y expresar las cadenas de anticuerpo anti-CCR7 pueden ser procariotas o eucariotas. *E. coli* es un huésped procariota útil para clonar y expresar los polinucleótidos de la presente invención. Otros huéspedes microbianos adecuados para el uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Serratia* y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos huéspedes procarióticos, también se pueden preparar vectores de expresión, que típicamente contienen secuencias de

control de expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estará presente cualquier número de una diversidad de promotores bien conocidos, 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 controlan típicamente la expresión, opcionalmente con una secuencia de operador, y tienen secuencias de sitios de unión a ribosomas y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción. Otros microbios, tales como las levaduras, también pueden emplearse para expresar los polipéptidos anti-CCR7 de la invención. También pueden usarse células de insectos en combinación con vectores de baculovirus.

En algunas formas de realización preferidas, las células huéspedes de mamífero se usan para expresar y producir los polipéptidos anti-CCR7 de la presente invención. Por ejemplo, pueden ser o bien una línea celular de hibridoma que expresa genes de inmunoglobulina endógenos (por ejemplo, los clones de hibridoma de mieloma como se describe en los Ejemplos), o una línea celular de mamífero que alberga un vector de expresión exógeno (por ejemplo, las células de mieloma SP2/0 ejemplificadas a continuación). Estas incluyen cualquier célula de animal o humana, normal mortal, o normal o anormal inmortal. Por ejemplo, se han desarrollado una cantidad de líneas de células huéspedes adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas, incluidas las líneas de células CHO, diversas líneas de células Cos, células HeLa, líneas de células de mieloma, células B transformadas e hibridomas. El uso de cultivo de células de tejidos de mamíferos para expresar polipéptidos se discute en general en, por ejemplo, Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, NY, NY, 1987. Los vectores de expresión para células huéspedes de mamíferos pueden incluir secuencias de control de expresión, tales como un origen de replicación, un promotor y un mejorador (ver, por ejemplo, Queen et al., *Immunol. Rev.* 89: 49–68, 1986), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de transcripción. Estos vectores de expresión generalmente contienen promotores derivados de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Los promotores adecuados pueden ser constitutivos, específicos del tipo celular, específicos del estadio y/o modulables o regulables. Los promotores útiles incluyen, entre otros, el promotor de metalotioneína, el promotor tardío mayor de adenovirus constitutivo, el promotor de MMTV inducible por dexametasona, el promotor de SV40, el promotor polIII de MRP, el promotor de MPSV constitutivo, el promotor de CMV inducible por tetraciclina (tal como el

promotor de CMV inmediato-temprano humano), el promotor constitutivo de CMV y las combinaciones de promotor-mejorador conocidas en la técnica.

Los métodos para introducir vectores de expresión que contienen las secuencias polinucleotídicas de interés varían de acuerdo con el tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para las células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación se pueden usar para otros huéspedes celulares (ver en general Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4ª ed.). Otros métodos incluyen, por ejemplo, electroporación, tratamiento de fosfato de calcio, transformación mediada por liposomas, inyección y microinyección, métodos balísticos, virosomas, inmunoliposomas, conjugados de polimerización:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, fusión a la proteína estructural VP22 del virus del herpes (Elliot y O'Hare, *Cell* 88: 223, 1997), captación de ADN mejorada por agentes y transducción *ex vivo*. Para la producción a largo plazo y de alto rendimiento de proteínas recombinantes, a menudo se desea una expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan establemente cadenas de anticuerpos anti-CCR7 o fragmentos de unión pueden prepararse utilizando vectores de expresión de la invención que contienen orígenes virales de replicación o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Después de la introducción del vector, se puede permitir que las células crezcan durante 1–2 días en un medio enriquecido antes de que se cambien a medios selectivos. 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 de manera estable, pueden proliferar usando técnicas de cultivo de tejidos apropiadas para el tipo de célula.

Usos terapéuticos.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) y conjugados de fármacos y anticuerpos de la invención son útiles en una diversidad de aplicaciones que incluyen, sin limitación, el tratamiento o la prevención del cáncer, tales como tipos de cáncer sólidos o hemotumores malignos. En ciertas formas de realización, los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, los fragmentos de unión a antígeno) y los conjugados de fármacos y anticuerpos de la invención son útiles para inhibir el crecimiento tumoral, inducir la diferenciación, reducir el volumen tumoral y/o reducir la tumorigenicidad de un tumor. Los métodos de uso pueden ser *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

En un aspecto, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) y conjugados de fármaco y anticuerpos de la invención son útiles para detectar la presencia de CCR7 en una muestra biológica. El término "detección", como se usa en este documento, abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas formas de realización, una muestra biológica comprende una célula o un tejido. En ciertas formas de realización, dichos tejidos incluyen tejidos normales y/o cancerosos que expresan CCR7 en niveles más altos en relación con otros tejidos.

En un aspecto, la invención proporciona un método para detectar la presencia de CCR7 en una muestra biológica. En ciertas formas de realización, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-CCR7 en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo al antígeno, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y el antígeno.

En un aspecto, la invención proporciona un método para diagnosticar un trastorno asociado con el aumento de la expresión de CCR7. En ciertas formas de realización, el método comprende poner en contacto una célula de prueba con un anticuerpo anti-CCR7; determinar el nivel de expresión (cuantitativa o cualitativamente) de CCR7 en la célula de prueba al detectar la unión del anticuerpo anti-CCR7 al antígeno CCR7; y comparar el nivel de expresión de CCR7 en la célula de prueba con el nivel de expresión de CCR7 en una célula de control (por ejemplo, una célula normal del mismo origen de tejido que la célula de prueba, o una célula que expresa CCR7 en niveles comparables con dicha célula normal), en donde un mayor nivel de expresión de CCR7 en la célula de prueba en comparación con la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado con el aumento de la expresión de CCR7. En ciertas formas de realización, la célula de prueba se obtiene de un individuo que se sospecha tiene un trastorno asociado con el aumento de la expresión de CCR7. En ciertas formas de realización, el trastorno es un trastorno de proliferación celular, tal como un cáncer o un tumor. En ciertas formas de realización, el método comprende medir el número de copias del gen CCR7 en una célula de prueba.

En ciertas formas de realización, un método de diagnóstico o detección, tal como los descritos anteriormente, comprende detectar la unión de un anticuerpo anti-CCR7 a CCR7 expresado sobre la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida de una célula que expresa CCR7 en su superficie. Un ensayo ejemplar para detectar la unión de un anticuerpo anti-CCR7 a CCR7 expresado en la superficie de una célula es un ensayo "FACS" (clasificación celular activada por fluorescencia, conforme a sus siglas en inglés).

Se pueden usar ciertos métodos para detectar la unión de anticuerpos anti-CCR7 a CCR7. Tales métodos incluyen, sin limitación, ensayos de unión a antígeno que son bien conocidos en la técnica, tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo “intercalado”, ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A e inmunohistoquímica (IHC).

En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-CCR7 están etiquetados. Las etiquetas incluyen, sin limitación, etiquetas o restos que se detectan directamente (tales como etiquetas fluorescentes, cromofóricas, densas en electrones, quimioluminiscentes y radiactivas), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular.

En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-CCR7 se inmovilizan sobre una matriz insoluble. La inmovilización implica separar el anticuerpo anti-CCR7 de cualquier proteína CCR7 que permanezca libre en solución. Esto se logra convencionalmente ya sea mediante la solubilización del anticuerpo anti-CCR7 antes del procedimiento de ensayo, tal como por adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich et al, Patente de los Estados Unidos Nro. 3.720.760), ya sea por acoplamiento covalente (por ejemplo, utilizando reticulación de glutaraldehído), o mediante la insolubilización del anticuerpo anti-CCR7 después de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-CCR7 y la proteína CCR7, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.

Cualquiera de las formas de realización anteriores de diagnóstico o detección puede llevarse a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar, o además, de un anticuerpo anti-CCR7.

En una forma de realización, la invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad, que comprende administrar los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno), o conjugados de fármacos y anticuerpos de la invención a un paciente. La invención también proporciona el uso de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno), o conjugados de fármacos y anticuerpos de la invención para tratar o prevenir una enfermedad en un paciente. En algunas formas de realización, la invención proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno), o conjugados de fármacos y anticuerpos de la invención para el uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad en un paciente. En formas de realización adicionales, la invención proporciona el uso de los

anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno), o conjugados de fármacos y anticuerpos de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad en un paciente.

En ciertas formas de realización, la enfermedad tratada con los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) y conjugados de fármaco y anticuerpo de la invención es un cáncer. En ciertas formas de realización, el cáncer se caracteriza por células que expresan CCR7 a las que se unen los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) y conjugados de fármacos y anticuerpos de la invención. En ciertas formas de realización, el cáncer se caracteriza por un aumento en la expresión de CCR7 en relación con un paciente sano. En algunas formas de realización, la expresión de CCR7 puede medirse por un aumento en el ARN de CCR7. En otras formas de realización, el cáncer se caracteriza por un aumento en el número de copias de ADN de CCR7. Los expertos en la técnica conocen otros métodos para medir o determinar los niveles de expresión de CCR7. Los ejemplos de enfermedades que pueden tratarse y/o prevenirse incluyen, entre otras, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfomas de células T periféricas (PTCL) tales como leucemia/linfoma de células T del adulto (ATLL) y linfoma de células grandes anaplásicas (ALCL), linfoma no hodgkiniano (LNH) tal como el linfoma de células del manto (MCL), linfoma de Burkitt y linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), carcinoma gástrico, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma nasofaríngeo (NPC), cáncer de esófago, carcinoma colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de células renales y cáncer de cuello uterino.

La presente invención proporciona métodos para tratar o prevenir el 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 y anticuerpos de la invención. En ciertas formas de realización, el cáncer es un cáncer sólido. En ciertas formas de realización, el sujeto es un humano. En ciertas formas de realización, el cáncer es un cáncer resistente y/o un cáncer recidivante. En ciertos aspectos, por ejemplo, el cáncer resistente es resistente a los inhibidores de la tirosina quinasa, los inhibidores de EGFR, los inhibidores de Her2, los inhibidores de Her3, los inhibidores de IGFR (factor de crecimiento de tipo insulínico, conforme a sus siglas en inglés) y los inhibidores de Met.

En ciertas formas de realización, la invención proporciona métodos para inhibir el crecimiento tumoral, que comprenden 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 y anticuerpos de la invención. En ciertas formas de realización, el sujeto es un humano. En ciertas formas de realización, el sujeto tiene un tumor o se le ha extraído un tumor. En ciertas formas de realización, el tumor es resistente a otros
5 inhibidores de la tirosina quinasa, incluidos, entre otros, los inhibidores de EGFR, los inhibidores de Her2, los inhibidores de Her3, los inhibidores de IGFR y los inhibidores de Met.

En ciertas formas de realización, el tumor expresa el CCR7 al que se une el anticuerpo anti-CCR7. En ciertas formas de realización, el tumor sobreexpresa el CCR7 humano. En ciertas formas de realización, el tumor tiene un aumento en el número de copias del gen CCR7.

10 La presente invención también proporciona métodos para seleccionar pacientes para el tratamiento con anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno), o conjugados de fármaco con anticuerpos de la invención, que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dichos anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno), o conjugados de fármacos y
15 anticuerpos. En ciertos aspectos, el método comprende seleccionar pacientes con un cáncer resistente al inhibidor de la tirosina quinasa. En ciertos aspectos, se contempla que el cáncer resistente al inhibidor de tirosina quinasa es resistente a los inhibidores de EGFR, inhibidores de Her2, inhibidores de Her3, inhibidores de IGFR y/o inhibidores de Met. En ciertos aspectos se contempla que el cáncer resistente es un cáncer resistente a Her2. En ciertos aspectos, se
20 contempla que el cáncer es un cáncer resistente *de novo*, y en aún otros aspectos, se contempla que el cáncer es un cáncer recidivante. En ciertos aspectos de la invención, los métodos comprenden la selección de un paciente con un cáncer recidivante o resistente *de novo*, y la medición de la expresión de CCR7. Se contempla que, en ciertos aspectos, el cáncer o tumor recidivante no fue inicialmente un cáncer o tumor que expresa CCR7, sino que se convierte en
25 un cáncer positivo para CCR7 que es un cáncer o tumor recidivante o resistente a la tirosina quinasa, después del tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa.

Para el tratamiento o la prevención de la enfermedad, la dosificación apropiada de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) o conjugados de fármaco y anticuerpos de la presente invención depende de diversos factores,
30 como el tipo de enfermedad por tratar, la gravedad y el curso de la enfermedad, la capacidad de respuesta de la enfermedad, la terapia previa, la historia clínica del paciente, etc. El anticuerpo o agente puede administrarse una vez o durante una serie de tratamientos que duran desde varios días hasta varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución

del estado de la enfermedad (por ejemplo, reducción en el tamaño del tumor). Los esquemas óptimos de dosificación pueden calcularse a partir de las mediciones de la acumulación de fármaco en el organismo del paciente, y variarán de acuerdo con la potencia relativa de un anticuerpo individual, fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmento de unión a antígeno) o de los conjugados de fármaco y anticuerpo. El médico tratante puede estimar las tasas de repetición para la dosificación en función de los tiempos de permanencia medidos y las concentraciones del fármaco en los líquidos o tejidos corporales.

Terapia de combinación.

En ciertos casos, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno) o un conjugado de fármaco y anticuerpo de la presente invención se combina con otros agentes terapéuticos, tales como otros agentes contra el cáncer, agentes antialérgicos, agentes contra las náuseas (o antieméticos), analgésicos, agentes citoprotectores y sus combinaciones.

En una forma de realización, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno) o un conjugado de fármaco y anticuerpo de la presente invención se combina en una formulación de combinación farmacéutica, o régimen de dosificación, como terapia de combinación, con un segundo compuesto que tiene propiedades contra el cáncer. El segundo compuesto de la formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación puede tener actividades complementarias al anticuerpo o inmunconjugado de la combinación, de manera que no se afectan entre sí de manera adversa. Por ejemplo, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno) o un conjugado de fármaco y anticuerpo de la presente invención se puede administrar en combinación con, sin limitación, un agente quimioterapéutico, un inhibidor de la tirosina quinasa, un inhibidor de la vía de señalización corriente descendente de CCR7, inhibidores de IAP, inhibidores de Bcl2, inhibidores de Mcl1 y otros inhibidores de CCR7.

El término "combinación farmacéutica", como se usa en el presente documento, se refiere o bien a una combinación fija en una forma de unidad de dosificación, o una combinación no fija o un equipo de partes para la administración combinada, donde dos o más agentes terapéuticos pueden administrarse independientemente en el mismo momento o por separado dentro de intervalos de tiempo, especialmente, cuando estos intervalos de tiempo permiten que los compañeros de combinación muestren un efecto cooperativo, por ejemplo, sinérgico.

El término "terapia de combinación" se refiere a la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar o prevenir una afección o un trastorno descrito en la presente divulgación. Dicha administración abarca la administración conjunta de estos agentes terapéuticos de una manera sustancialmente simultánea, tal como en una cápsula única que
 5 tiene una relación fija de ingredientes activos. Alternativamente, dicha administración abarca la administración conjunta en recipientes múltiples o separados (por ejemplo, cápsulas, polvos y líquidos) para cada ingrediente activo. Los polvos y/o líquidos pueden reconstituirse o diluirse a una dosis deseada antes de la administración. Además, dicha administración también abarca el uso de cada tipo de agente terapéutico de manera secuencial, o bien aproximadamente
 10 al mismo tiempo, o en momentos diferentes. En cualquier caso, el régimen de tratamiento proporcionará efectos beneficiosos de la combinación de fármacos para tratar o prevenir las afecciones o los trastornos descritos en este documento.

La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y demostrar ser "sinérgica", es decir, el efecto logrado cuando los ingredientes activos usados juntos es mayor que la suma
 15 de los efectos que resultan del uso de los compuestos por separado. Se puede lograr un efecto sinérgico cuando los ingredientes activos son: (1) formulados conjuntamente y administrados o suministrados simultáneamente en una formulación de dosificación unitaria combinada; (2) suministrados por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando se administran en terapia de alternancia, se puede lograr un efecto sinérgico
 20 cuando los compuestos se administran o suministran secuencialmente, por ejemplo, mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia de alternancia, una dosificación efectiva de cada ingrediente activo se administra secuencialmente, es decir, en serie, mientras que en la terapia de combinación, las dosificaciones efectivas de dos o más ingredientes activos se administran juntas.

Los agentes quimioterapéuticos generales considerados para el uso en terapias de combinación incluyen anastrozol (Arimidex[®]), bicalutamida (Casodex[®]), bleomicina sulfato (Blenoxane[®]), busulfano (Myleran[®]), inyección de busulfano (Busulfex[®]), capecitabina (Xeloda[®]), N4-pentoxicarbonil-5-desoxi-5-fluorocitidina, carboplatino (Paraplatin[®]),
 25 carmustina (BiCNU[®]), clorambucil (Leukeran[®]), cisplatino (Platinol[®]), cladribina (Leustatin[®]), ciclofosfamida (Cytosan[®] o Neosar[®]), citarabina, citosina arabinosida (Cytosar-U[®]), citarabina, inyección liposomática (DepoCyt[®]), dacarbazina (DTIC-Dome[®]),
 30

dactinomicina (Actinomycin D, Cosmegen), daunorrubicina, clorhidrato (Cerubidine[®]), daunorrubicina, citrato, inyección liposomática (DaunoXome[®]), dexametasona, docetaxel (Taxotere[®]), doxorubicina, clorhidrato (Adriamycin[®], Rubex[®]), etoposida (Vepesid[®]), fludarabina, fosfato (Fludara[®]), 5-fluorouracilo (Adrucil[®], Efudex[®]), flutamida (Eulexin[®]),
 5 tezacitibina, Gemcitabina (difluorodesoxicitidina), hidroxiaurea (Hydrea[®]), Idarrubicina (Idamycin[®]), ifosfamida (IFEX[®]), irinotecano (Camptosar[®]), L-asparaginasa (ELSPAR[®]), leucovorina cálcica, melfalano (Alkeran[®]), 6-mercaptopurina (Purinethol[®]), metotrexato (Folex[®]), mitoxantrona (Novantrone[®]), milotarg, paclitaxel (Taxol[®]), fenoxy (Yttrium90/MX-DTPA), pentostatina, polifeprosano 20 con carmustina implante (Gliadel[®]),
 10 tamoxifeno, citrato (Nolvadex[®]), teniposida (Vumon[®]), 6-tioguanina, tiotepa, tirapazamina (Tirazone[®]), topotecano, clorhidrato para inyección (Hycamptin[®]), vinblastina (Velban[®]), vincristina (Oncovin[®]), vinorelbina (Navelbine[®]) y pemetrexed.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir el cáncer, administrando a un sujeto que lo necesita un conjugado de anticuerpo y fármaco de la
 15 presente invención en combinación con uno o más inhibidores de la tirosina quinasa, que incluyen, entre otros, inhibidores de BTK, inhibidores de EGFR, inhibidores de Her2, inhibidores de Her3, inhibidores de IGFR e inhibidores de Met.

Por ejemplo, los inhibidores de la tirosina quinasa incluyen, entre otros, Ibrutinib (PCI-32765); Erlotinib, clorhidrato (Tarceva[®]); Linifanib (N-[4-(3-amino-1H-indazol-4-il)fenil]-N'-(2-fluoro-5-metilfenil)urea, también conocido como ABT 869, disponible de
 20 Genentech); Sunitinib, malato (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 los Estados Unidos Nro. 6.780.996); Dasatinib (Sprycel[®]); Pazopanib (Votrient[®]); Sorafenib (Nexavar[®]); Zactima (ZD6474); e Imatinib o
 25 Imatinib, mesilato (Gilevec[®] y Gleevec[®]).

Los inhibidores del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) incluyen, sin limitación, Erlotinib, clorhidrato (Tarceva[®]), Gefitinib (Iressa[®]); N-[4-[(3-Cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[(3"S)-tetrahydro-3-furanil]oxi]-6-quinazolinil]-4(dimetilamino)-2-butenamida, Tovok[®]); Vandetanib (Caprelsa[®]); Lapatinib (Tykerb[®]); (3R,4R)-4-Amino-
 30 1-((4-((3-metoxifenil)amino)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)metil)piperidin-3-ol (BMS690514); Canertinib, diclorhidrato (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]-carbámico, (3S)-3-morfolinilmetil éster (BMS599626); N-(3,4-Dicloro-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[[3,4,5,6-tetrahidro-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).

Los anticuerpos de EGFR incluyen, sin limitación, Cetuximab (Erbix®); Panitumumab (Vectibix®); Matuzumab (EMD-72000); Nimotuzumab (hR3); Zalutumumab; TheraCIM h-R3; MDX0447 (CAS 339151-96-1); y ch806 (mAb-806, CAS 946414-09-1).

Los inhibidores del receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (receptor Her2) (también conocido como Neu, ErbB-2, CD340, o p185) incluyen, sin limitación, Trastuzumab (Herceptin®); Pertuzumab (Omnitarg®); trastuzumab emtansina (Kadcyla®); 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 descrito en la Publicación PCT Nro. 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, (3S)-3-morfolinilmetil éster (BMS 599626, CAS 714971-09-2); Canertinib diclorhidrato (PD183805 o CI-1033); y N-(3,4-Dicloro-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[[3,4,5,6-tetrahidro-2-metilciclopenta[c]pirrol-5-il]metoxi]-4-quinazolinamina (XL647, CAS 781613-23-8).

Los inhibidores de Her3 incluyen, sin limitación, LJM716, MM-121, AMG-888, RG7116, REGN-1400, AV-203, MP-RM-1, MM-111 y MEHD-7945A.

Los inhibidores de MET incluyen, sin limitación, Cabozantinib (XL184, CAS 849217-68-1); Foretinib (GSK1363089, anteriormente, XL880, CAS 849217-64-7); Tivantinib (ARQ197, CAS 1000873-98-2); 1-(2-Hidroximetilpropil)-N-(5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)piridin-2-il)-5-metil-3-oxo-2-fenil-2,3-dihidro-1H-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).

Los inhibidores de IGF1R incluyen, sin limitación, BMS-754807, XL-228, OSI-906, GSK0904529A, A-928605, AXL1717, KW-2450, MK0646, AMG479, IMCA12, MEDI-573 y BI836845. Ver, por ejemplo, Yee, JNCI, 104; 975 (2012), para una reseña.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de tratamiento o prevención de un cáncer, mediante la administración a un sujeto que lo necesita, de un conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención en combinación con uno o más inhibidores de la vía de señalización corriente descendente de CCR7, incluidos, entre otros, inhibidores de β -arrestina, inhibidores de GRK, inhibidores de MAPK, inhibidores de PI3K, inhibidores de JAK, etc.

Por ejemplo, los inhibidores de fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) incluyen, sin limitación, Idelalisib (Zydelig, GS-1101, Cal-101), 4-[2-(1H-Indazol-4-il)-6-[[4-(metilsulfonil)piperazin-1-il]metil]tieno[3,2-d]pirimidin-4-il]morfolina (también conocida como GDC 0941 y descripta en las Publicaciones PCT Nros. WO 09/036082 y WO 09/055730); 2-Metil-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 descripto en la Publicación PCT Nro. WO 06/122806); 4-(trifluorometil)-5-(2,6-dimorfolinopirimidin-4-il)piridin-2-amina (también conocido como BKM120 o NVP-BKM120, y descripto en la Publicación PCT Nro. 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]naphtho[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).

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir el cáncer, administrando a un sujeto que lo necesita un conjugado de fármaco y anticuerpo de la presente invención en combinación con uno o más agentes pro-apoptosis, que incluyen, sin limitación, inhibidores de IAP, inhibidores de Bcl2, inhibidores de Mcl1, agentes Trail, inhibidores de Chk.

Por ejemplo, los inhibidores de IAP incluyen, sin limitación, LCL161, GDC-0917, AEG-35156, AT406 y TL32711. Otros ejemplos de inhibidores de IAP incluyen, sin limitación, aquellos divulgados en los documentos 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 este documento por referencia.

Los inhibidores de BCL-2 incluyen, sin limitación, Venetoclax (también conocido como GDC-0199, ABT-199, RG7601); 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 conocido como ABT-263 y descrito en la Publicación PCT Nro. WO 09/155386); Tetrocarcina A; Antimicina; Gossypol ((-)-BL-193); Obatoclax; Etil-2-amino-6-ciclopentil-4-(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetil)-4Hcromono-3-carboxilato (HA14-1); Oblimersen (G3139, Genasense®); Bak BH3 péptido; (-)-Gossypol ácido acético (AT-101); 4-[4-[(4'-Cloro[1,1'-bifenil]-2-il)metil]-1-piperazinil]-N-[[4-[(1R)-3-(dimetilamino)-1-[(fenilthio)metil]propil]amino]-3-nitrofenil]sulfonil]-benzamida (ABT-737, CAS 852808-04-9); y Navitoclax (ABT-263, CAS 923564-51-6).

Los agonistas del receptor proapoptótico (PARA), que incluyen DR4 (TRAILR1) y DR5 (TRAILR2), incluyen, sin limitación, 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, disponibles de Daiichi Sankyo).

Los inhibidores de la quinasa de punto de control (CHK) incluyen, sin limitación, 7-Hidroxiestaurosporina (UCN-01); 6-Bromo-3-(1-metil-1H-pyrazol-4-il)-5-(3R)-3-piperidinil-pyrazolo[1,5-a]pirimidin-7-amina (SCH900776, CAS 891494-63-6); ácido 5-

(3-Fluorofenil)-3-ureidotiofeno-2-carboxílico, N-[(S)-piperidin-3-il]amida (AZD7762, CAS 860352-01-8); 4-[(3S)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-il]amino]-3-(1H-benzimidazol-2-il)-6-cloroquinolin-2(1H)-ona (CHIR 124, CAS 405168-58-3); 7-Aminodactinomicina (7-AAD), Isogranulatimida, debromohimenialdisina; N-[5-Bromo-4-metil-2-[(2S)-2-morfolinilmetoxi]-fenil]-N'-(5-metil-2-pirazinil)urea (LY2603618, CAS 911222-45-2); Sulforafano (CAS 4478-93-7, 4-Metilsulfinilbutil isotiocianato); 9,10,11,12-Tetrahydro-9,12-epoxi-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocina-1,3(2H)-dionea (SB-218078, CAS 135897-06-2); y TAT-S216A (YGRKKRRQRRRLYRSPAMPENL (SEQ ID NO: 629)), y CBP501 ((d-Bpa)sws(d-Phe-F5)(d-Cha)rrrqr).

En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir el cáncer administrando a un sujeto que lo necesita un conjugado de fármaco y anticuerpo de la presente invención en combinación con uno o más inmunomoduladores (por ejemplo, uno o más de: un activador de una molécula coestimuladora o un inhibidor de una molécula de punto de control inmunitario).

En ciertas formas de realización, el inmunomodulador es un activador de una molécula coestimuladora. En una forma de realización, el agonista de la molécula coestimuladora se selecciona de un agonista (por ejemplo, un anticuerpo agonista o un fragmento de unión a antígeno de este, o una fusión soluble) de OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, STING, o ligando CD83.

En ciertas formas de realización, el inmunomodulador es un inhibidor de una molécula del punto de control inmunitario. En una forma de realización, el inmunomodulador es un inhibidor de PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y/o TGFR beta. En una forma de realización, el inhibidor de una molécula de punto de control inmunitario inhibe PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 o CTLA4, o cualquiera de sus combinaciones. El término “inhibición” o “inhibidor” incluye una reducción en un cierto parámetro, por ejemplo, una actividad, de una determinada molécula, por ejemplo, un inhibidor del punto de control inmunitario. A modo de ejemplo, se incluye en este término la inhibición de una actividad, por ejemplo, una actividad de PD-1 o PD-L1, de por lo menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más. Por lo tanto, no es necesario que la inhibición sea del 100%.

La inhibición de una molécula inhibitoria se puede realizar en el nivel de ADN, ARN o de proteína. En algunas formas de realización, se puede usar un ácido nucleico inhibidor (por

ejemplo, un ARNds, ARNsi o ARNsh), para inhibir la expresión de una molécula inhibitoria. En otras formas de realización, el inhibidor de una señal inhibitoria es un polipéptido, por ejemplo, un ligando soluble (por ejemplo, PD-1-Ig o CTLA-4 Ig), o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno este, que se une a la molécula inhibidora; por ejemplo, un anticuerpo o
 5 fragmento de este (también denominado aquí como "una molécula de anticuerpo") que se une a PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y/o TGFR beta, o una combinación de los anteriores.

En una forma de realización, la molécula de anticuerpo es un anticuerpo completo o un fragmento de este (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv o un fragmento Fv de una sola
 10 cadena (scFv)). En otras formas de realización más, la molécula de anticuerpo tiene una región constante de cadena pesada (Fc) seleccionada de, por ejemplo, las regiones constantes de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE; particularmente, seleccionada de, por ejemplo, las regiones constantes de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 e
 15 IgG4, más particularmente, la región constante de cadena pesada de IgG1 o IgG4 (por ejemplo, IgG1 o IgG4 humana). En una forma de realización, la región constante de la cadena pesada es IgG1 humana o IgG4 humana. En una forma de realización, la región constante se altera, por ejemplo, se muta, para modificar las propiedades de la molécula de anticuerpo (por ejemplo, para aumentar o disminuir uno o más de: la unión al receptor Fc, la glicosilación del anticuerpo, el número de residuos cisteína, la función de las células efectoras, o la función de
 20 complemento).

En ciertas formas de realización, la molécula de anticuerpo se presenta en forma de una molécula de anticuerpo biespecífica o multiespecífica. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo biespecífica tiene una primera especificidad de unión a PD-1 o PD-L1 y una segunda especificidad de unión, por ejemplo, una segunda especificidad de unión a TIM-
 25 3, LAG-3 o PD-L2. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo biespecífica se une a PD-1 o PD-L1 y TIM-3. En otra forma de realización, la molécula de anticuerpo biespecífica se une a PD-1 o PD-L1 y LAG-3. En otra forma de realización, la molécula de anticuerpo biespecífica se une a PD-1 y PD-L1. En otra forma de realización más, la molécula de anticuerpo biespecífica se une a PD-1 y PD-L2. En otra forma de realización, la molécula
 30 de anticuerpo biespecífica se une a TIM-3 y LAG-3. Cualquier combinación de las moléculas mencionadas anteriormente se puede hacer en una molécula de anticuerpo multiespecífica, por ejemplo, un anticuerpo triespecífico que incluye una primera especificidad de unión a PD-1 o

PD-1, y una segunda y tercera especificidades de unión a dos o más de: TIM 3, LAG-3, o PD-L2.

En ciertas formas de realización, el inmunomodulador es un inhibidor de PD-1, por ejemplo, PD-1 humano. En otra forma de realización, el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1, por ejemplo, PD-L1 humano. En una forma de realización, el inhibidor de PD-1 o PD-L1 es una molécula de anticuerpo para PD-1 o PD-L1. El inhibidor de PD-1 o PD-L1 se puede administrar solo o en combinación con otros inmunomoduladores, por ejemplo, en combinación con un inhibidor de LAG-3, TIM-3 o CTLA4. En una forma de realización ejemplar, el inhibidor de PD-1 o PD-L1, por ejemplo, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 o PD-L1, se administra en combinación con un inhibidor de LAG-3, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-LAG-3. En otra forma de realización, el inhibidor de PD-1 o PD-L1, por ejemplo, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 o PD-L1, se administra en combinación con un inhibidor de TIM-3, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-TIM-3. En otras formas de realización más, el inhibidor de PD-1 o PD-L1, por ejemplo, la molécula de anticuerpo anti-PD-1, se administra en combinación con un inhibidor de LAG-3, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-LAG-3, y un inhibidor de TIM-3, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-TIM-3. Otras combinaciones de inmunomoduladores con un inhibidor de PD-1 (por ejemplo, uno o más de PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y/o TGFR) también se encuentran dentro de la presente invención. Cualquiera de las moléculas de anticuerpo conocidas en la técnica o descritas en el presente documento se pueden usar en las combinaciones anteriormente mencionadas de inhibidores de la molécula de punto de control.

En una forma de realización, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 seleccionado de Nivolumab, Pembrolizumab o Pidilizumab. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es Nivolumab. Los nombres alternativos para Nivolumab incluyen MDX-1106, MDX-1106-04, ONO-4538 o BMS-936558. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es Nivolumab (Número de registro CAS: 946414-94-4). Nivolumab es un anticuerpo monoclonal IgG4 completamente humano que bloquea específicamente PD1. El nivolumab (clon 5C4) y otros anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a PD1 se describen en la Patente de los Estados Unidos Nro. 8.008.449 y en la publicación PCT Nro. WO2006/121168.

En otras formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es Pembrolizumab. Pembrolizumab (denominación comercial KEYTRUDA, anteriormente, Lambrolizumab,

también conocido como Merck 3745, MK-3475 o SCH-900475), es un anticuerpo monoclonal IgG4 humanizado que se une a PD1. Pembrolizumab se divulga, por ejemplo, en Hamid, O. *et al.* (2013) *New England Journal of Medicine* 369 (2): 134-44, la Publicación PCT Nro. WO 2009/114335, y la Patente de los Estados Unidos Nro. 8.354.509.

5 En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es Pidilizumab. Pidilizumab (CT-011; Cure Tech) es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1k que se une a PD1. Pidilizumab y otros anticuerpos monoclonales humanizados anti-PD-1 se divulgan en la Publicación PCT Nro. WO2009/101611. Otros anticuerpos anti-PD1 se divulgan en la Patente de los Estados Unidos Nro. 8.609.089, la Publicación US Nro. 2010028330, y/o la Publicación
10 US Nro. 20120114649. Otros anticuerpos anti-PD1 incluyen AMP 514 (Amplimmune).

 En algunas formas de realización, el inhibidor de PD-1 es PDR001 o cualquier otro anticuerpo anti-PD-1 divulgado en el documento WO 2015/112900.

 En algunas formas de realización, el inhibidor de PD-1 es una inmunoadhesina (por ejemplo, una inmunoadhesina que comprende una porción de unión a PD-1 o extracelular de
15 PD-L1 o PD-L2 fusionada a una región constante (por ejemplo, una región Fc de una secuencia de inmunoglobulina). En algunas formas de realización, el inhibidor de PD-1 es AMP-224.

 En algunas formas de realización, el inhibidor de PD-L1 es anticuerpo anti-PD-L1. En algunas formas de realización, el inhibidor anti-PD-L1 se selecciona de YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, o MDX-1105MSB-0010718C (también denominado A09-246-
20 2), divulgado, por ejemplo, en el documento WO 2013/0179174, y que tiene una secuencia descrita en esta solicitud (o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a ella, por ejemplo, una secuencia por lo menos 85%, 90%, 95% o más idéntica a la secuencia especificada).

 En una forma de realización, el inhibidor de PD-L1 es MDX-1105. MDX-1105,
25 también conocido como BMS-936559, es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en la Publicación PCT Nro. WO2007/005874.

 En una forma de realización, el inhibidor de PD-L1 es YW243.55.S70. El anticuerpo YW243.55.S70 es un anti-PD-L1 descrito en la Publicación PCT Nro. WO 2010/077634 (secuencias de región variable de cadena pesada y ligera expuestas en SEQ ID Nros. 20 y 21,
30 respectivamente).

 En una forma de realización, el inhibidor de PD-L1 es MDPL3280A (Genentech/Roche). MDPL3280A es un anticuerpo monoclonal IgG1 optimizado Fc humano que se une a PD-L1. MDPL3280A y otros anticuerpos monoclonales humanos para PD-L1 se

divulgan en la Patente de los Estados Unidos Nro.: 7.943.743 y en la Publicación US Nro.: 20120039906.

En otras formas de realización, el inhibidor de PD-L2 es AMP-224. AMP-224 es un receptor soluble de fusión Fc de PD-L2 que bloquea la interacción entre PD1 y B7-H1 (B7-DCIg; Amplimmune; por ejemplo, descrito en las Publicaciones PCT Nros. WO 2010/027827 y WO 2011/066342).

En una forma de realización, el inhibidor de LAG-3 es una molécula de anticuerpo anti-LAG-3. En una forma de realización, el inhibidor de LAG-3 es BMS-986016.

Composiciones farmacéuticas.

A fin de preparar composiciones farmacéuticas o estériles que incluyen inmunoconjugados, los inmunoconjugados de la invención se mezclan con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener adicionalmente uno o más agentes terapéuticos adecuados para tratar o prevenir un tipo de cáncer que expresa CCR7 (incluidos, entre otros, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfomas de células T periféricas (PTCL) tales como la leucemia/linfoma de células T del adulto (ATLL) y linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), linfoma no hodgkiniano (NHL), como el linfoma de células de manto (MCL), linfoma de Burkitt y linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), carcinoma gástrico, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma nasofaríngeo (NPC), cáncer de esófago, carcinoma colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de células renales y cáncer de cuello uterino).

Las formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico pueden prepararse mezclando con portadores, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables en forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, suspensiones espesas, soluciones acuosas, lociones o suspensiones (ver, por ejemplo, Hardman *et al.*, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y., 2001; Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y., 2000; Avis, *et al.* (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY, 1993; Lieberman, *et al.* (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: tablets, Marcel Dekker, NY, 1990; Lieberman, *et al.* (eds.) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY, 1990; Weiner and Kotkoskie, Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 2000).

La selección de un régimen de administración para un tratamiento terapéutico depende de varios factores, entre ellos, la tasa de recambio de suero o tejido de la entidad, el nivel de los síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células objetivo en la matriz biológica. En ciertas formas de realización, un régimen de administración maximiza la cantidad de agente terapéutico administrado al paciente de acuerdo con un nivel aceptable de efectos secundarios. En consecuencia, la cantidad de agente biológico suministrado depende, en parte, de la entidad en particular y de la gravedad de la afección que se está tratando. Se dispone de orientación para seleccionar las dosis adecuadas de anticuerpos, citoquinas y moléculas pequeñas (ver, por ejemplo, Wawrzynczak, *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK, 1996; Kresina (ed.), *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1991; Bach (ed.), *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1993; Baert *et al.*, *New Engl. J. Med.* 348:601–608, 2003; Milgrom *et al.*, *New Engl. J. Med.* 341:1966–1973, 1999; Slamon *et al.*, *New Engl. J. Med.* 344:783–792, 2001; Beniaminovitz *et al.*, *New Engl. J. Med.* 342:613–619, 2000; Ghosh *et al.*, *New Engl. J. Med.* 348:24–32, 2003; Lipsky *et al.*, *New Engl. J. Med.* 343:1594–1602, 2000).

La determinación de la dosis apropiada es realizada por el médico, por ejemplo, utilizando parámetros o factores conocidos o que se sospecha en la técnica que afectan el tratamiento o la prevención, o que se predice que afectarán el tratamiento o la prevención. En general, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima, y se aumenta en pequeños incrementos a partir de ese momento hasta lograr el efecto deseado u óptimo en relación con cualquier efecto secundario negativo. Las medidas de diagnóstico importantes incluyen aquellas de síntomas de, por ejemplo, la inflamación o el nivel de citoquinas inflamatorias producidas.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar de manera de obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un particular paciente, composición y modo de administración, sin ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o su éster, sal o amida, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la

edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y los antecedentes médicos del paciente que se está tratando, y factores similares conocidos en las artes médicas.

Las composiciones que comprenden anticuerpos o fragmentos de estos de la invención pueden proporcionarse mediante la infusión continua, o mediante dosis en intervalos de, por ejemplo, un día, una semana o 1–7 veces por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas o una vez cada ocho semanas. Las dosis se pueden administrar por vía intravenosa, subcutánea, tópica, oral, nasal, rectal, intramuscular, intracerebral o por inhalación. Un protocolo de dosis específico es aquel que involucra la máxima dosis o frecuencia de dosis que evita efectos secundarios significativos no deseados.

Para los inmunoconjugados de la invención, la dosificación administrada a un paciente puede ser 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosificación puede ser entre 0,0001 mg/kg y 30 mg/kg, 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 y 0,25 mg/kg, 0,0001 y 0,15 mg/kg, 0,0001 y 0,10 mg/kg, 0,001 y 0,5 mg/kg, 0,01 y 0,25 mg/kg o 0,01 y 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosificación del anticuerpo o sus fragmentos de la invención puede calcularse usando el peso del paciente en kilogramos (kg), multiplicado por la dosis que se va a administrar en mg/kg.

Las dosis de los inmunoconjugados de la invención pueden repetirse, y las administraciones pueden estar separadas por menos de 1 día, 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, 4 meses, 5 meses o por lo menos 6 meses. En algunas formas de realización, los inmunoconjugados de la invención se pueden administrar dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas o con menos frecuencia. En una forma de realización específica, las dosis de los inmunoconjugados de la invención se repiten cada 2 semanas.

Una cantidad efectiva para un paciente particular puede variar de acuerdo con factores tales como la afección que se trata, la salud general del paciente, el método, la vía y la dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios (ver, por ejemplo, Maynard et al. al., A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Florida, 1996; Dent, Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., Londres, Reino Unido, 2001).

La vía de administración puede ser, por ejemplo, por aplicación tópica o cutánea, inyección o infusión por administración subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intracerebral,

intramuscular, intraocular, intraarterial, intracerebroespinal, intralesional o por sistemas de liberación sostenida o un implante (ver, por ejemplo, Sidman et al., Biopolymers 22: 547–556, 1983; Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 167–277, 1981; Langer, Chem. Tech. 12: 98–105, 1982; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688–3692, 1985; Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030–4034, 1980; Patentes de los Estados Unidos Números 6.350.466 y 6.316.024). Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante, o un anestésico local, como la lidocaína para aliviar el dolor en el lugar de la inyección, o ambos. Además, también se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de aerosolización. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nro. 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 las Publicaciones PCT Nros. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Una composición de la presente invención también se puede administrar a través de una o más vías de administración usando uno o más de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciarán los expertos en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán de acuerdo con los resultados deseados. Las vías de administración seleccionadas para los inmunoconjugados de la invención incluyen las vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras parenterales de administración, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La administración parenteral puede representar modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente, por inyección, e incluye, sin limitación, la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. Alternativamente, una composición de la invención puede administrarse por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica. En una forma de realización, los inmunoconjugados de la invención se administran por infusión. En otra forma de realización, los inmunoconjugados de la invención se administran por vía subcutánea.

Si los inmunoconjugados de la invención se administran en un sistema de liberación controlada o liberación sostenida, se puede usar una bomba para lograr una liberación controlada o sostenida (ver 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). Pueden usarse materiales poliméricos para lograr la liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (ver, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer and 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 and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61, 1983; ver, además, Levy *et al.*, Science 228:190, 1985; During *et al.*, Ann. Neurol. 25:351, 1989; Howard *et al.*, J. Neurosurg. 71:105, 1989; Patente de los Estados Unidos Nro. 5.679.377; Patente de los Estados Unidos Nro. 5.916.597; Patente de los Estados Unidos Nro. 5.912.015; Patente de los Estados Unidos Nro. 5.989.463; Patente de los Estados Unidos Nro. 5.128.326; la Publicación PCT Nro. WO 99/15154; y la Publicación PCT Nro. WO 99/20253. Ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, sin limitación, poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-vinil acetato), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(vinil alcohol), poliacrilamida, poli(etilenglicol), poliláctidos (PLA), poli(láctido-co-glicólidos) (PLGA) y poliortoésteres. En una forma de realización, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixibibles, estable con el almacenamiento, estéril y biodegradable. Un sistema de liberación controlada o sostenida puede colocarse en proximidad del objetivo profiláctico o terapéutico, de modo de requerir solo una fracción de la dosis sistémica (ver, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138, 1984).

Los sistemas de liberación controlada se describen en la reseña de Langer, Science 249:1527-1533, 1990). Cualquier técnica conocida por el experto en la técnica puede usarse para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más inmunos conjugados de la invención. Ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nro. 4.526.938, Publicación PCT WO 91/05548, Publicación PCT WO 96/20698, Ning *et al.*, Radiotherapy & Oncology 39: 179-189, 1996; Song *et al.*, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50: 372-397, 1995; Cleek *et al.*, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24: 853-854, 1997; y Lam *et al.*, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, 1997, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia, en su totalidad.

Si los inmunos conjugados de la invención se administran tópicamente, pueden formularse en forma de una pomada, crema, un parche transdérmico, una loción, un gel, una

pulverización, un aerosol, una solución, una emulsión, u otra forma bien conocida para el experto en la técnica. Ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para formas de dosificación tópicas no pulverizables, se emplean típicamente formas viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un portador o uno o más excipientes compatibles con la aplicación
 5 tópica y que tienen una viscosidad dinámica, en algunos casos, mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, ungüentos y similares, que, si se desea, se esterilizan o se mezclan con agentes auxiliares (por ejemplo, conservantes, estabilizantes, humectantes,
 10 tampones, o sales) para afectar diversas propiedades, como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópica adecuadas incluyen preparaciones de aerosol pulverizables en las que el ingrediente activo, en algunos casos, en combinación con un portador inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un producto volátil presurizado (por ejemplo, un propelente gaseoso, como freón) o en una botella exprimible. También, si se desea, se pueden
 15 agregar humectantes o agentes de humedad a las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación. Ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

Si las composiciones que comprenden los inmunoconjugados se administran por vía intranasal, se pueden formular en forma de aerosol, pulverización, niebla o en forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para el uso de acuerdo con la presente
 20 invención pueden administrarse convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad
 25 medida. Las cápsulas y los cartuchos (compuestos, por ejemplo, de gelatina) para usar en un inhalador o insuflador pueden formularse de modo de contener una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada, como lactosa o almidón.

Los métodos para la administración conjunta o el tratamiento con un segundo agente terapéutico, por ejemplo, una citoquina, un esteroide, un agente quimioterapéutico, un
 30 antibiótico o una radiación, son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Hardman *et al.*, (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th 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 and Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.). Una cantidad eficaz del agente terapéutico puede disminuir los síntomas en por lo menos 10%; por lo menos 20%; por lo menos alrededor de 30%; por lo menos 40%, o por lo menos 50%.

5 Las terapias adicionales (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos), que pueden administrarse en combinación con los inmunoconjugados de la invención pueden suministrarse con menos de 5 minutos de separación, menos de 30 minutos de separación, 1 hora de separación, alrededor de 1 hora de separación, alrededor de 1 a alrededor de 2 horas de separación, alrededor de 2 horas a alrededor de 3 horas de separación, alrededor de 3 horas a
10 alrededor de 4 horas de separación, alrededor de 4 horas a alrededor de 5 horas de separación, alrededor de 5 horas a alrededor de 6 horas de separación, alrededor de 6 horas a alrededor de 7 horas de separación, alrededor de 7 horas a alrededor de 8 horas de separación, alrededor de 8 horas a alrededor de 9 horas de separación, alrededor de 9 horas a alrededor de 10 horas de separación, alrededor de 10 horas a alrededor de 11 horas de separación, alrededor de 11 horas
15 a alrededor de 12 horas de separación, alrededor de 12 horas a 18 horas de separación, 18 horas a 24 horas de separación, 24 horas a 36 horas de separación, 36 horas a 48 horas de separación, 48 horas a 52 horas de separación, 52 horas a 60 horas de separación, 60 horas a 72 horas de separación, 72 horas a 84 horas de separación, 84 horas a 96 horas de separación, o 96 horas a 120 horas de separación, de los inmunoconjugados de la invención. Las dos o más terapias
20 pueden administrarse dentro de una misma visita del paciente.

En ciertas formas de realización, los inmunoconjugados de la invención pueden formularse para asegurar una distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB, conforme a sus siglas en inglés) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen
25 la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, ver, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nros. 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente a células u órganos específicos, de modo de mejorar así la administración del fármaco dirigido (ver, por ejemplo, Ranade, (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685). Ejemplos de
30 restos de direccionamiento incluyen folato o biotina (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nro. 5.416.016, concedida a Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (Bloeman *et al.*, (1995) FEBS Lett. 357:140; Owais *et al.*, (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor de proteína A

surfactante (Briscoe *et al.*, (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p 120 (Schreier *et al.*, (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); ver, además, K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4: 273.

La invención proporciona protocolos para la administración de una composición farmacéutica que comprende inmunoconjugados de la invención solos o en combinación con otras terapias para un sujeto que la necesita. Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación de la presente invención pueden administrarse concomitantemente o secuencialmente a un sujeto. La terapia (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación de la presente invención también se puede administrar cíclicamente. La terapia cíclica implica la administración de una primera terapia (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo, seguida de la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo y la repetición esta administración secuencial, es decir, el ciclo, para 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.

Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación de la invención pueden administrarse a un sujeto en forma concurrente.

El término "concurrentemente" no se limita a la administración de terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) exactamente al mismo tiempo, sino que, en cambio, significa que una composición farmacéutica que comprende anticuerpos o sus fragmentos de la invención se administra a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de manera tal que los conjugados de fármacos y anticuerpos de la invención pueden actuar junto con las otras terapias, para proporcionar un beneficio mayor que si se administraran de otro modo. Por ejemplo, cada terapia puede administrarse a un sujeto al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes momentos; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse lo suficientemente cerca en el tiempo para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada terapia puede administrarse a un sujeto por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada. En diversas formas de realización, las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) se administran a un sujeto con menos de 5 minutos de diferencia, con menos de 15 minutos de diferencia, con menos de 30 minutos de diferencia, con menos de 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora de diferencia, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas de diferencia, de

aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, 24 horas de diferencia, 48 horas de diferencia, 72 horas de diferencia o 1 semana de diferencia. En otras formas de realización, se administran dos o más terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) dentro de la misma visita del paciente.

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

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos anti-CCR7.

Generación de construcciones de expresión para CCR7 de humano, rata, ratón y macaco.

Se sintetizaron genes CCR7 humanos, de macaco y de ratón de longitud completa sobre la base de las secuencias de aminoácidos de las bases de datos GenBank o Uniprot (SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101). El patrón de ADNc de CCR7 de rata se sintetizó genéticamente sobre la base de la información de la secuencia de aminoácidos generada utilizando ARNm aislado de diversos tejidos de rata (SEQ ID NO: 103). Todos los fragmentos de ADN sintetizados se clonaron en vectores de expresión apropiados.

Tabla 2: Información sobre la secuencia de aminoácidos y nucleótidos para CCR7.

CCR7 humano	
SEQ ID NO: 97	MDLGKPMKSVLVVALLVIFQVCLCQDEVTDYIGDNTTVDYTLFESLCSKKDVRNFK AWFLPIMYSIICFVGLLGNGLVLTYYFKRLKMTDTYLLNLAVADILFLLTLPFWAYS AAKSWVFGVHFCKLIFAIYKMSFFSGMLLLLCISIDRYVAIVQAVSAHRHRARVLLISK LSCVGIWILATVLSIPELLYSDLQRSSEQAMRCSLITEHVEAFITIQVAQMVIGFLVPL LAMSFCYLVII RTLLQARNFERNKAIKVIIAVVVVFIVFQLPYNGVVLAQTVANFNITSS TCELSKQLNIAYDVTYSLACVRCCVNPFLYAFIGVKFRNDLFKLFKDLGCLSQEQLRQ WSSCRHIRRSSMSVEAETTTTFSP
SEQ ID NO: 98	ATGGACCTGGGGAAACCAATGAAAAGCGTGCTGGTGGTGGCTCTCCTTGTCATT TTCCAGGTATGCCTGTGTCAAGATGAGGTCACGGACGATTACATCGGAGACAAC ACCACAGTGGACTACACTTTGTTGAGTCTTTGTGCTCCAAGAAGGACGTGCGG AACTTTAAAGCCTGGTTCCTCCCTATCATGTACTCCATCATTTGTTTCGTGGGCCT ACTGGGCAATGGGCTGGTCGTGTTGACCTATATCTATTTCAAGAGGCTCAAGAC CATGACCGATACCTACCTGCTCAACCTGGCGGTGGCAGACATCCTCTTCTCCTG ACCCTTCCCTTCTGGGCTACAGCGCGGCCAAGTCCTGGGTCTTCGGTGTCCACT TTTGCAAGCTCATCTTTGCCATCTACAAGATGAGCTTCTTCAGTGGCATGCTCCTA CTTCTTTGCATCAGCATTGACCGCTACGTGGCCATCGTCCAGGCTGTCTCAGCTC ACCGCCACCGTGCCCGCGTCTTCTCATCAGCAAGCTGTCTGTGTGGGCATCTG GATACTAGCCACAGTGCTCTCCATCCCAGAGCTCCTGTACAGTGACCTCCAGAGG AGCAGCAGTGAGCAAGCGATGCGATGCTCTCTCATCACAGAGCATGTGGAGGC CTTTATCACCATCCAGGTGGCCAGATGGTGATCGGCTTTCTGGTCCCCCTGCTG GCCATGAGCTTCTGTTACCTTGTATCATCCGCACCCTGCTCCAGGCACGCAACT TTGAGCGCAACAAGGCCATCAAGGTGATCATCGCTGTGGTCTGTGGTCTTCATAG TCTTCCAGCTGCCCTACAATGGGGTGGTCTGGCCAGACGGTGGCCAACTTCA ACATCACCAGTAGCACCTGTGAGCTCAGTAAGCAACTCAACATCGCCTACGACG TCACCTACAGCCTGGCCTGCGTCCGCTGCTGCGTCAACCCTTTCTGTACGCCTTC ATCGGCGTCAAGTTCCGCAACGATCTCTTCAAGCTCTTCAAGGACCTGGGCTGCC TCAGCCAGGAGCAGCTCCGGCAGTGGTCTTCTGTCGGCACATCCGGCGCTCCT CCATGAGTGTGGAGGCCGAGACCACCACCTTCTCCCCA
CCR7 macaco	
SEQ ID NO: 99	MDLGKPMKSVLVVALLVIFQVCLCQDEVTDYIGDNTTVDYTLFESLCSKKDVRNFK AWFLPIMYSIICFVGLLGNGLVLTYYFKRLKMTDTYLLNLAVADILFLLTLPFWAYS AAKSWVFGVHFCKLIFAIYKMSFFSGMLLLLCISIDRYVAIVQAVSAHRHRARVLLISK LSCVGIWILATVLSIPELLYSGLQRSSEQAMRCSLITEHVEAFITIQVAQMVIGFLVPL LAMSFCYLVII RTLLQARNFERNKAIKVIIAVVVVFIVFQLPYNGVVLAQTVANFNITSS TCELSKQLNIAYDVTYSLACVRCCVNPFLYAFIGVKFRNDLFKLFKDLGCLSQEQLRQ WSSCRHIRRSSMSVEAETTTTFSP
SEQ ID NO: 100	ATGGACCTGGGGAAACCAATGAAAAGCGTGCTGGTGGTGGCTCTCCTTGTCATT TTCCAGGTATGCCTGTGTCAAGATGAGGTCACGGACGATTACATCGGAGACAAC ACCACAGTGGACTACACTTTGTTGAGTCTTTGTGCTCCAAGAAGGACGTGCGG AACTTTAAAGCCTGGTTCCTCCCTATCATGTACTCCATCATTTGTTTCGTGGGCCT ACTGGGCAATGGGCTGGTCGTGTTGACCTATATCTATTTCAAGAGGCTCAAGAC CATGACCGATACCTACCTGCTCAACCTGGCGGTGGCAGACATCCTCTTCTCCTG ACCCTTCCCTTCTGGGCTACAGCGCGGCCAAGTCCTGGGTCTTCGGTGTCCACT TTTGCAAGCTCATCTTTGCCATCTACAAGATGAGCTTCTTCAGTGGCATGCTCCTA

	CTTCTTTGCATCAGCATTGACCGCTACGTGGCCATCGTCCAGGCTGTCTCAGCTC ACCGCCACCGTGCCCGCGTCTTCTCATCAGCAAGCTGTCTGTGTGGGCATCTG GATACTAGCCACAGTGCTCTCCATCCCAGAGCTCCTGTACAGTGGCCTCCAGAG GAGCAGCAGTGAGCAAGCGATGCGATGCTCTCTCATCAGAGCATGTGGAGG CCTTTATCACCATCCAGGTGGCCAGATGGTGATCGGCTTTCTGGTCCCCCTGCT GGCCATGAGCTTCTGTTACCTTGTATCATCCGCACCCTGCTCCAGGCACGCAAC TTTGAGCGCAACAAGGCCATCAAGGTGATCATCGCTGTGGTCGTGGTCTTCATA GTCTTCCAGCTGCCCTACAATGGGGTGGTCCTGGCCCAGACGGTGGCCAACTTC AACATCACCAGTAGCACCTGTGAGCTCAGTAAGCAACTCAACATCGCCTACGAC GTCACCTACAGCCTGGCCTGCGTCCGCTGCTGCGTCAACCCTTTCTGTACGCCTT CATCGGCGTCAAGTTCGCAACGATCTCTTCAAGCTCTTCAAGGACCTGGGCTGC CTCAGCCAGGAGCAGCTCCGGCAGTGGTCTTCTGTCGGCACATCCGGCGCTCC TCCATGAGTGTGGAGGCCGAGACCACCACCACCTTCTCCCCA
CCR7 ratón	
SEQ ID NO: 101	MDPGKPRKNVLVALLVIFQVCFQDEVTDYIGENTTVDYTLYESVCFKKDVRNFK AWFLPLMYSVICFVGLLGNGLVILTYIYFKRLKMTDTYLLNLAVADILFLILPFWAYS EAKSWIFGVYLCGIFGIYKLSFFSGMLLLLCISIDRYVAIVQAVSAHRHRARVLLISKLS CVGIWMLALFLSIPELLYSGLQKNSGEDTLRCSLVSAQVEALITIQVAQMVFGFLVP MLAMSFCYLIIRTLQARNFERNKAIKVIIAVVVVFIVQLPYNGVVLAQTVANFNIT NSSCETSKQLNIAYDVTYSLASVRCCVNPFLYAFIGVKFRSDLFKLFDLGLSQRRLR HWSSCRHVRNASVSMEAEETTTTFSP
SEQ ID NO: 102	ATGGACCCAGGGAAACCCAGGAAAAACGTGCTGGTGGTGGCTCTCCTTGTCATT TTCCAGGTGTGCTTCTGCCAAGATGAGGTCACCGATGACTACATCGGCGAGAAT ACCACGGTGGACTACACCTGTACGAGTCGGTGTGCTTCAAGAAGGATGTGCGG AACTTTAAGGCCTGGTTCCTGCCTCTCATGTATTCTGTATCTGCTTCGTGGGCCT GCTCGGCAACGGGCTGGTGATACTGACGTACATCTATTTCAAGAGGCTCAAGAC CATGACGGATACCTACCTGCTCAACCTGGCCGTGGCAGACATCCTTTTCTCCTG ATTCTTCCCTTCTGGGCCTACAGCGAAGCCAAGTCCTGGATCTTTGGCGTCTACC TGTGTAAGGGCATCTTTGGCATCTATAAGTTAAGCTTCTTACGCGGGATGCTGCT GCTCCTATGCATCAGCATTGACCGCTACGTAGCCATCGTCCAGGCCGTGTGCGCT CATCGCCACCGCGCCCCGCTGCTTCTCATCAGCAAGCTGTCCTGTGTGGGCATCT GGATGCTGGCCCTCTTCTCTCCATCCCGGAGCTGCTCTACAGCGGCCTCCAGAA GAACAGCGGCGAGGACACGCTGAGATGCTCACTGGTCAGTGCCCAAGTGGAGG CCTTGATCACCATCCAAGTGGCCCAGATGGTTTTTGGGTTCTAGTGCCTATGCT GGCTATGAGTTTCTGCTACCTCATTATCATCCGTACCTTGCTCCAGGCACGCAACT TTGAGCGGAACAAGGCCATCAAGGTGATCATTGCCGTGGTGGTAGTCTTCATAG TCTTCCAGCTGCCCTACAATGGGGTGGTCCTGGCTCAGACGGTGGCCAACTTCA ACATCACCATAAGCAGCTGCGAAACCAGCAAGCAGCTCAACATTGCCTATGACG TCACCTACAGCCTGGCCTCCGTCCGCTGCTGCGTCAACCCTTTCTGTATGCCTTC ATCGGCGTCAAGTTCGCGAGCGACCTCTTCAAGCTCTTCAAGGACTTGGGCTGTC TCAGCCAGGAACGGCTCCGGCACTGGTCTTCTGCGGCATGTACGGAACGCGT CGGTGAGCATGGAGGCGGAGACCACCACAACCTTCTCCCCG
CCR7 rata	
SEQ ID NO: 103	MDLGKPTKNVLVALLVIFQVCFQDEVTDYIGENTTVDYTLYESVCFKKDVRNFK AWFLPLMYSVICFVGLLGNGLVVLTYIYFKRLKMTDTYLLNLAVADILFLMILPFWA

	YSEAKSWIFGAYLCKSIFGIYKLSFFSGMLLLLCISIDRYVAIVQAVSAHRHRARVLLISK LSCIGIWTLAFLSIPELLYSLQKNSGEDTWRCSLVSAQVEALIAIQVAMVVGFL PMLAMSFCYLVII RTLLQARNFERNKAIKVIIAVVVVFVFLPYNGVVLAQTVANFN ITNSSCEASKQLNIAYDVTYSLASVRCCVNPFLYAFIGVKFRSDLFKLFDLGCLSQERL RQWSSCRHVRHTSVSMEAEETTTTFSP
SEQ ID NO: 104	ATGGACCTGGGGAAGCCCACGAAAAACGTGCTGGTGGTGGCTCTCCTGGTCATT TTCCAGGTGTGCTTCTGCCAAGATGAGGTCACAGACGACTACATCGGCGAGAAC ACCACCGTGGACTACACCCTGTATGAGTCGGTGTGCTTCAAGAAGGATGTGCGG AACTTTAAGGCCTGGTTCCTCCCTCTCATGTACTCAGTCATTGCTTCGTGGGCCT GCTAGGCAATGGGCTGGTGGTGTGCTGACATACATCTATTTCAAGAGACTGAAGAC CATGACGGATACCTACCTGCTCAACCTGGCCGTGGCAGACATCCTCTTCTCATG ATCCTTCCCTTCTGGGCCTACAGCGAAGCCAAGTCCTGGATCTTTGGTGCCTACC TGTGTAAGAGCATCTTTGGCATCTACAAGTTAAGCTTCTTCAGCGGGATGTTGCT GCTCCTGTGTATCAGCATTGACCGCTATGTGGCCATCGTCCAGGCCGTGTCAGCC CACCGGCACCGCGCCCGCTGCTTCTCATCAGCAAGCTGTCCTGTATAGGCATCT GGACGCTGGCCTTTTTCTTTCTATCCCTGAGCTGCTCTACAGCGGCCTCCAGAA GAACAGCGGCGAGGACACGTGGAGATGCTCCCTGGTCAAGTGCCTAAGTGGAGG CCTTGATCGCCATCCAAGTGGCCAGATGGTTGTTGGGTTTGTACTGCCTATGCT GGCTATGAGTTTCTGCTACCTGGTTATCATCCGCACTCTGCTCCAGGCGCGAAAC TTCGAGCGGAACAAGGCCATCAAGGTGATCATCGCTGTGGTCGTAGTGTTTCGTC GTCTTCCAGCTGCCCTACAATGGGGTGGTCCTGGCCCAGACCGTGGCCAATTTTC AACATCACCAATAGCAGCTGCGAAGCCAGCAAGCAGCTCAACATTGCCTATGAC GTCACCTACAGCCTGGCCTCCGTCGCTGCTGTGTCAACCTTTCTTGTATGCCTT CATCGGCGTCAAGTTCCGCGAGCGACCTCTTCAAGCTCTTCAAGGACTTGGGCTGC CTCAGCCAGGAACGGCTCCGGCAGTGGTCTTCTGCCGCCATGTACGGCACACG TCCGTGAGCATGGAGGCGGAGACTACCACCACCTTCTCCCCG

Generación de líneas celulares que expresan en forma estable CCR7.

Se generaron líneas celulares estables que expresaban CCR7 usando transducción retroviral. Las células 293T se cotransfectaron con un vector de expresión retroviral CCR7 y un vector de empaquetamiento pCL-Eco o pCL-10A1 (Novus, USA, Nro. de cat. NBP2-29540 o NBP2-2952) utilizando reactivo de transfección Eugene 6 (Promega, USA, Nro. de cat. E2692) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células se incubaron en una incubadora de CO₂ humedecida a 37°C, y el sobrenadante viral se recogió 48 horas después de la transfección. Se cultivaron células NIH/3T3 y 300.19 hasta una monocapa casi confluyente. Se eliminaron los medios de crecimiento de las células, y se añadió sobrenadante viral en presencia de 8 µg de polibreno/ml (concentración final) (EMD Millipore, Nro. de cat. TR-1003-G). Después de la incubación durante 3–6 horas a 37°C, se agregaron medios nuevos. Las células se cultivaron luego en condiciones de selección apropiadas para producir líneas celulares estables que expresaban CCR7.

Generación, expresión y purificación de partículas de tipo viral (VLP).

Las células HEK293T o NIH/3T3 se mantuvieron en DMEM con FBS al 10%. Para hacer las VLP, las células se intercambiaron en DMEM con 4% de FBS, luego se cotransfectaron con un plásmido de expresión CCR7 y un plásmido de expresión Gag retroviral en una relación de μg de 3:2. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se recogió el sobrenadante celular, y se aclaró por centrifugación a $2500 \times g$ durante 5 minutos en una centrífuga de mesa, y se mantuvo en hielo. Las VLP se purificaron mediante ultracentrifugación a $100.000 \times g$ a través de un almohadón de sacarosa al 20% en tubos de centrifugación Beckman Ultra–Clear de 38 ml (número de catálogo 344058) en un rotor Beckman Coulter SW 32 Ti en una ultracentrífuga Sorvall RC 6+. Los pellets resultantes se resuspendieron en $300 \mu\text{l}$ de PBS estéril frío y se cuantificaron utilizando un ensayo BCA (catálogo Pierce Nro. 23225).

Generación derivada de la estructura, de andamio inmunógeno CCR7.

Los miembros de la familia de receptores de proteínas acopladas a G son proteínas de membrana que contienen siete hélices de transmembrana (TM1 ... TM7), cada una, conectada mediante secuencias de enlace de longitud variable. El término amino de la proteína se encuentra en el lado ecto de la superficie celular, lo que indica que 4 regiones de la proteína están potencialmente expuestas sobre la superficie de la célula, el término amino (término N) y 3 regiones de bucle extracelulares (EC1, EC2 y EC3). Estas regiones están así disponibles como antígenos para anticuerpos.

Se contempla que una combinación de una o más de estas 4 entradas podría insertarse en un andamio de proteína soluble para aproximar estructuralmente la región expuesta extracelularmente de CCR7.

Para determinar las regiones extracelulares óptimas de CCR7, se construyó un modelo utilizando la estructura cristalina del homólogo cercano CXCR4 (Wu et al., "Estructuras de la quimioquina GPCR CXCR4 con antagonistas peptídicos cíclicos y de molécula pequeña" (2010) Science 330: 1066–1071) utilizando una combinación de estructura CXCR4 con entradas del banco de datos de proteínas (3ODU, 3OE0, 3OE6, 3OE8, 3OE9) y soporte lógico de modelado. Los aminoácidos que eran intersticiales a las hélices transmembrana de conexión se infirieron del modelo para ser expuestos en la superficie de la proteína. Estas regiones se identifican en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Información sobre la secuencia de aminoácidos y nucleótidos para el andamio de inmunógeno CCR7.

SEQ ID NO:	Descripción		Observaciones
105	CCR7 (NP_001829.1 C-C tipo receptor de quimioquina 7)	MDLGKPMKSVLVVALLVIFQVCLC <u>QDEVTD</u> <u>DIYIGDNTTV</u> <u>VDYTLFESLCSKKDVR</u> NFKAWFLPI MYSIICFVGLLGNGLVVLTYYFKRLKTMDDTYL LNLAVADILFLLTLPFWAYSAAK <u>SWVFGVHFC</u> KLIFAIYKMSFFSGMLLLCISIDRYVAIVQAVSA HRHRARVLLISKLSVGIWILATVLSIPELL <u>YSDL</u> <u>QRSSEQAMRCSLIT</u> EHVEAFITIQVAMVIG FLVPLLAMSFCYLVIIRTLQARNFERNKAIVII AVVVVFIVFQLPYNGVLAQTVAN <u>FNITSSTCE</u> LSKQLNIAYDVTYSLACVRCCVNPFLYAFIGVKF RNDLFKLFKDLGCLSQEQLRQWSSCRHIRRSS MSVEAETTTTFSP	CCR7, precursor. Las regiones extracelulares están resaltadas en negritas. Las regiones de inserción o sus derivados están en negritas y subrayadas
106	Término N	<u>QDEVTD</u> <u>DIYIGDNTTV</u> <u>VDYTLFESLCSKKDVR</u>	Secuencia extracelular N-terminal CCR7
107	EC1	<u>KSWVFGVH</u>	Bucle 1 CCR7 extracelular
108	EC2	<u>YSDLQRSSEQAMRCSLIT</u>	Bucle 2 CCR7 extracelular
109	EC3	<u>FNITSST</u>	Bucle 3 CCR7 extracelular
110	EC2_C24S	<u>YSDLQRSSEQAMRSSLIT</u>	
111	H_MGFTX1	EVQLVESGGGLVKGPGGSLKLSAASGFTFSDY GMLWVRQAPKGLWIAIYSSGSSTIYYADRV KGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYC STGTFAIWGQGTPVTVSSAKTTPPSVYPLAPG SAAQTNSMVTGLCLVKGYFPEPVTVTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSE TVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDC	Cadena Pesada de andamio Fab de ratón
112	L_MGFTX1	DVVMVTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLIYNN GNTYLHWYRQKPGQSPKLLIYKVSNRFGVDP RFGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTH VPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTS GGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNG VLNSWTDQDSKDYMSSTLTTLTKDEYERHN SYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	Cadena ligera de andamio Fab de ratón

SEQ ID NO:	Descripción		Observaciones
113	H_FabCCR7M1	<u>QDEV</u>DDYIGDNTTVDYTLFESLCSKKDVREV QLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDYGM LWVRQAPEKGLEWIAISSGSSTIYYADRVKGR FTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCSTG <u>TYS</u>DLQRSSEQAMRSSLITFAYWGQGTPVT VSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTGLCLV KGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDL YTLSSSVTPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVD KKIVPRDC	Cadena Pesada de Fab con término N y EC2 insertado. Secuencias insertadas subrayadas y en negritas
114	H_FabCCR7M1	CAAGATGAGGTCACGGACGATTACATCGGA GACAACACCACAGTGGACTACACTTTGTTCTG AGTCTTTGTGCTCCAAGAAGGACGTGCGGga ggtgcagctggtggagtctggtggtggtctggtcaagcct ggaggttcctgaaactgagttgtgccgcatctgggtttac attctctgactacggaatgctgtgggtgaggcaggcacca gagaagggcctggaatggatcgcttatattccagcggat ctagtactatctactatgcagacagggtcaaggccggtt caccattagcagagataacgcaaaaataacctgtttctg cagatgacatcactgaggtccgaggataccgctatgtatt attgctccacagggactTACAGTGACCTCCAGAGG AGCAGCAGTGAGCAAGCGATGCGATCCTCT CTCATCACAttgcttactggggacaggggacacccgt gaccgtcagctcagccaagaccacccccccagcgtgtac cctctggcccctggctctgccgcccagaccaacagcatgg tgaccctgggctgcctggtgaagggtacttccccgagcc cgtgaccgtgacctggaacagcggcagcctgagcagcgg cgtgcacaccttccccgccgtgctgcagagcgacctgtac acctgagcagctctgtgacctgcccagcagcacctggc ccagcgagaccgtgacatgcaacgtggcccacccgccca gctccaccaaggtggacaagaaaatcgtgccccgggact gc	Secuencia de ADN de HFabCCR7M1 Cadena Pesada. Secuencia insertada en mayúsculas
115	L_MGFTX1	atgtcgtgatgactcagaatccactgtccctgcctgtgtcc ctgggcatcaggcttccattagctgtcgttctctcagtcc ctgatctacaacaatggtaacacctacctgactggtata gacagaagcccggccagtcccctaagctgctgatctaca agtgagtaataggttctcaggagtcccagaccggtttccg gcagcggatctgggaccgattcacactgaaaatctctag ggtggaggccgaagacctgggcgtctactttgtagttag agcactcacgtccccttcaccttcggcagcgaacaaaac tggaatatcaagcgcgtgatgccgccctaccgtgagcat cttccccccagcagcgagcagctgaccagcggcggagc cagcgtggtgtgcttctgaacaacttctacccaaggac	Secuencia de ADN de L_MGFTX1

SEQ ID NO:	Descripción		Observaciones
		atcaacgtgaagtggaagatcgacggcagcgagcggca gaacggcgtgctgaacagctggaccgaccaggacagca aggactccacctacagcatgagcagcaccctgaccctgac caaggacgagtacgagcggcacaacagctacacctgcg aggccaccacaagaccagcaccagcccatcgtgaaga gcttcaaccggaacgagtgc	

El pequeño tamaño de los bucles EC1 y EC3 y la separación espacial de EC3 de las otras tres regiones priorizaron el uso del término N y el bucle EC2 como epítomos candidatos.

El modelado de la fusión de la secuencia del término N en la estructura cristalina de un Fab de ratón con la secuencia EC2 insertada en diversas regiones de bucle del Fab, tal como en el Marco 1, CDR–H3 o CDR3–H1, mostró que si se asumía un grado de flexibilidad en las dos secuencias, entonces estas podrían ser aproximaciones razonables a la estructura de estas regiones en CCR7.

Generación de andamios de inmunógenos para la inmunización de ratón.

Se generaron construcciones injertadas para la inmunización de ratón mediante la fusión de la secuencia N–terminal de la Tabla 3 al término N de la cadena pesada de un andamio Fab de ratón (designado MGFTX1) y el injerto de una versión modificada de la secuencia EC2 con el residuo cisteína en la posición 24 mutada a una serina (Tabla 3 y secuencias subrayadas + en negritas de la SEC ID NO: 113), en CDR3 del andamio MGFTX1, luego se produjeron cadenas de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera para generar construcciones de proteínas finales. Las construcciones, designadas como FabCCR7M1, contenían así un marco de ratón que debería ser inmunorresistente combinado con la secuencia humana a la que se dirigió la respuesta inmunitaria del ratón.

La secuencia del término N se fusionó directamente con la cadena pesada del andamio MGFTX1. Los puntos de inserción para EC2 se seleccionaron para ser el punto medio del bucle CDR en función de los datos de modelos de homología o estructurales disponibles. Las proteínas injertadas con Fab se produjeron utilizando una metodología de biología molecular estándar que utiliza ADN recombinante que codifica las secuencias pertinentes.

Por ejemplo, se insertó una región variable de cada anticuerpo que contenía EC2 en la cadena pesada CDR3. El ADN que codificaba la región variable se amplificó mediante PCR, y el fragmento resultante se subclonó en un vector que contenía o bien la región constante de la cadena ligera o la constante de la cadena pesada y las regiones Fc. De esta manera, las proteínas FabCCR7M1 se hicieron correspondientes a la fusión del término N y la inserción de

EC2 en H3. Las construcciones resultantes se muestran en la Tabla 3. Las transfecciones de la combinación apropiada de vectores de cadena pesada y ligera dan como resultado la expresión de un Fab recombinante que contiene un término N y una molécula EC2.

La selección de la CDR elegida para el injerto se determina sobre la base de los parámetros de exposición del bucle y la proximidad al N-terminal. En este momento, el soporte lógico de modelado solo es parcialmente útil para predecir qué CDR y qué ubicación dentro de la CDR proporcionarán los parámetros deseados, debido a la flexibilidad de los bucles después de la fusión y el injerto. La estructura del andamio MGFTX1 en combinación con el EC2_C24S (Tabla 3, SEC ID NO: 110) mostró la secuencia por ser expuesta y flexible según se juzga por la falta de densidad electrónica para la mayoría de la secuencia.

En resumen, el punto de inserción en la CDR se eligió sobre una base estructural, con la hipótesis de que el injerto en la CDR proporcionaría algún nivel de semejanza estructural al antígeno nativo.

Generación de hibridomas.

Se inmunizaron ratones transgénicos Bcl-2 (C57BL/6-Tgn cepa (bcl-2) 22 WEHI) con antígeno usando un procedimiento que requiere la inmunización repetitiva en sitios múltiples (RIMMS, conforme a sus siglas en inglés) (McIntyre GD. Hybridoma 1997). En resumen, los ratones se inyectaron con 1–3 µg de inmunógeno CCR7 en 8 sitios específicos proximales a los ganglios linfáticos periféricos (PLN, conforme a sus siglas en inglés). Este procedimiento se repitió 8 veces durante un período de 12 días. El día 12, se recogió una muestra de sangre de prueba, y se analizó la valoración de anticuerpo en suero mediante FACS. En algunos casos, los ratones BALB/c y/o C57Bl/6 se inmunizaron con células NIH3T3 o 300.19 que sobreexpresaban establemente CCR7 humano (SEQ ID NO: 97). Los animales fueron inyectados por vía subcutánea con 5×10^6 células en PBS una vez por mes durante 3 meses, seguido de un refuerzo intravenoso con 25 µg de VLP que expresaban CCR7 humano. Dos días después del refuerzo, se recogió una muestra de sangre de prueba, y se analizó la valoración de anticuerpos en suero mediante FACS. Los bazo y los PLN combinados se eliminaron de los ratones de valoración alta. Para recoger linfocitos, los bazo y los PLN se lavaron dos veces con DMEM y luego se disociaron mediante el pasaje a través de una pantalla de 70 micrones (Falcon # 352350). Los linfocitos resultantes se lavaron 2 veces más antes de la fusión en medios de Cytofusion (BTXpress Cytofusion® Electroporation Medium cat # 47001).

Para la fusión, las células de mieloma F0 se mezclaron con linfocitos en una relación de 1:4. La mezcla de células se centrifugó, se suspendió en medio Cytofusión y posteriormente se añadió a una cámara de electrofusión (cámara Harvard Apparatus Coaxial 9ML Parte # 470020). La electrofusión se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante utilizando el sistema Hybrimmune/Hybridoma CEEF-50B (Cyto Pulse Sciences, Inc). Las células fusionadas se dejaron recuperar 5 min en la cámara, se diluyeron 1/10 en medio de fusión sin HAT (DMEM + 20% FBS, 1% Pen/Estrep/Glu, 1X NEAA, 0.5X HFCS) y se colocaron a 37°C durante una hora. Se agregaron medios HAT 4X (DMEM + 20% FBS, 1% Pen/Estrep/Glu, 1X NEAA, 4X HAT, 0.5X HFCS) para obtener una solución 1X, y la densidad se ajustó a 1,67 X 10⁴ células/ml. Las células se colocaron en placas de 384 pocillos a 60 µl/pocillo.

Detección de FACS.

Diez días después de la fusión, las placas de hibridoma se cribaron en busca de la presencia de anticuerpos específicos de CCR7 usando citometría de flujo para confirmar la unión específica de anticuerpos candidatos a líneas celulares que sobreexpresaban establemente o que expresaban de manera endógena CCR7. Las células se enjuagaron a fondo con PBS y se trataron con Accutase (Millipore # SCR005) para levantarlas de las placas de crecimiento y se resuspendieron en PBS frío. Las células se marcaron con biotinilación con un tinte fluorescente de acuerdo con las instrucciones del fabricante (FluoReporter Cell-Surface Biotinylation Kit, Thermo Fisher Scientific Cat. F-20650; PE-Cy7 Etapa tavidin, ThermoFisher Scientific Cat. SA1012). Las células se resuspendieron a aproximadamente 1 x 10⁶ células/ml en tampón FACS (1X DPBS, 3% FBS, 5 mM EDTA, 0,1% de azida sódica). En una placa de 384 pocillos, se sembraron 20 µL de sobrenadante de hibridoma, y se agregaron 20 µL de suspensión celular. Las células se incubaron durante 1 hora a 4°C, se lavaron dos veces con tampón FACS frío y se resuspendieron en 20 µl de 1:400 de anticuerpo secundario tampón FACS (IgG antihumana humana de cabra F(ab')₂ conjugado con aloficocianina, específica de Fcγ; Jackson Immunoresearch, Nro. de cat. 109-136-098). Después de una incubación adicional durante 45 minutos a 4°C, las células se lavaron dos veces con tampón FACS y se resuspendieron en 20 l de tampón FACS + con 2 µg/ml de yoduro de propidio (Sigma Aldrich Cat # P4864-10ML). La intensidad de fluorescencia media geométrica se calculó en células individuales vivas utilizando el soporte lógico FlowJo™.

Purificación de anticuerpos.

Se prepararon anticuerpos quiméricos que comprendían regiones variables murinas y regiones constantes humanas. Además, las versiones quiméricas que comprendían mutaciones de cisteína (por ejemplo, cisteínas en la posición K360C, o las posiciones E152C y S375C de la cadena pesada) se diseñaron para la conjugación del resto de fármaco y la preparación de ADC como se describe con más detalle en este documento. Se obtuvieron secuencias de ADN de región variable (VH y VL) de hibridomas para la generación de secuencias optimizadas (por ejemplo, humanización, características preferidas) para cada uno de los hibridomas seleccionados mAb121G12, mAb506E15, mAb674J13 y mAb684E12. El ADN de la región variable de los anticuerpos monoclonales murinos se amplificó por RACE a partir del ARN obtenido de cada línea celular de hibridoma seleccionada utilizando métodos estándares. Las secuencias de polipéptidos para cada una de las cadenas pesada/ligera variables murinas se muestran en SEQ ID NO: 128/SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 160/SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 192/SEQ ID NO: 208, y SEQ ID NO: 224/SEQ ID NO: 240, respectivamente, para cada uno de los hibridomas 674J13, 121G12, 506E15 y 684E12. Las secuencias de nucleótidos de cadena pesada/ligera variables derivadas correspondientes para cada uno de los hibridomas se muestran en SEQ ID NO: 129/SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 161/SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 193/SEQ ID NO: 209 y SEQ ID NO: 225/SEQ ID NO: 241. Para la preparación de anticuerpos quiméricos, las secuencias de ADN que codificaban para el dominio VH y VL de hibridoma se subclonaron en vectores de expresión que contenían las respectivas secuencias de región constante de cadena ligera humana y de cadena pesada de mutación D265A/P329A (DAPA) o Cys diseñada o de tipo silvestre humana (IgG1, kappa).

Humanización de anticuerpos.

Se diseñaron construcciones de región variable para la humanización y optimización de secuencias (por ejemplo, la eliminación de modificaciones postraducción, sitios no preferidos, etc.), para incluir mutaciones de cisteína (por ejemplo, cisteínas en la posición K360C o posiciones E152C y S375C de la cadena pesada) para la conjugación del resto de fármaco y la preparación de ADC como se describe con más detalle en el presente documento; así como para la modificación de mutaciones de efector de Fc (por ejemplo, mutaciones de D265A/P329A en la región Fc) para incluir construcciones que tienen una función de efector de Fc reducida, y sus combinaciones.

Las secuencias de ADN que codifican los dominios VL y VH humanizados se ordenaron en GeneArt (Life Technologies Inc. Regensburg, Alemania), incluida la optimización de codones para *Cricetulus griseus*. Las secuencias que codifican los dominios

VL y VH se subclonaron de los vectores derivados de GeneArt en vectores de expresión adecuados para la producción de proteínas en células de mamíferos. Las cadenas pesadas y ligeras se clonaron en vectores de expresión individuales para permitir la cotransfección.

Los anticuerpos recombinantes (IgG1, kappa) se produjeron mediante cotransfección de vectores en células de expresión Freestyle™ 293 (Invitrogen, USA) utilizando PEI (polietilenimina, MW 25.000 lineal, Polysciences, USA, Cat. # 23966) como reactivo de transfección. La reserva de PEI se preparó disolviendo 1 g de PEI en 900 ml de agua de grado de cultivo celular a temperatura ambiente (TA). Para facilitar la disolución de PEI, la solución se acidificó mediante la adición de HCl a pH 3–5, seguido de neutralización con NaOH a un pH final de 7,05. Finalmente, el volumen se ajustó a 1 L, y la solución se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22 µm, se dividió en alícuotas y se congeló a –80°C hasta su uso posterior.

Se cultivaron células Freestyle™ 293 (Gibco™, ThermoFisher scientific, USA Nro. de cat. R79007) en medio Freestyle™ 293 (Gibco™, ThermoFisher scientific, USA, Nro. de cat. 12338018) en matraces de agitación (Corning, Tewksbury, MA) en un agitador orbital (100–120 rpm) en una incubadora humedecida a 37°C a 5% de CO₂. Para las transfecciones transitorias, las células se cultivaron hasta una densidad o aproximadamente 3 x 10⁶ células/ml, y luego se agregó 1 ug de ADN esterilizado por filtro/ml de cultivo (0,5 ug de cadena pesada + 0,5 ug de cadena ligera) a 2 ug de PEI/1 ug de ADN en solución OptiMem (ThermoFisher Scientific, USA, Nro. 11058021), y se incubó a temperatura ambiente durante 8 minutos. La mezcla se añadió a las células Freestyle™ 293 gota a gota con torbellino suave. Después de la transfección, las células se cultivaron durante una a dos semanas antes de la purificación del anticuerpo del sobrenadante. A fin de generar líneas celulares estables para la producción de anticuerpos, los vectores se cotransfectaron mediante nucleofección (Nucleofector™ 96–well shuttle™; Lonza) en células CHO utilizando las recomendaciones del fabricante, y se cultivaron en condiciones de selección durante hasta cuatro semanas en matraces de agitación. Las células se recogieron por centrifugación, y el sobrenadante se recuperó para la purificación del anticuerpo. El anticuerpo se purificó utilizando columnas de proteína A, proteína G o MabSelect SuRe (GE Healthcare Life Sciences). Antes de cargar el sobrenadante, la resina se equilibró con PBS. Después de la unión de la muestra, la columna se lavó con PBS, y el anticuerpo se eluyó con Thermo (Pierce) IgG pH 2,8 (cat. # 21004). Las fracciones de eluato se neutralizaron con tampón de dehidrato tribásico de citrato de sodio, pH 8,5 (Sigma Aldrich, nro. de cat. S4641–1Kg), y luego se dializaron durante la noche en PBS, pH 7,2.

Resumen de anticuerpos.

La Tabla 4 muestra la información de secuencia pertinente para los anticuerpos anti-CCR7 parentales y humanizados derivados de hibridomas murinos. A lo largo de esta solicitud, cuando se describen los anticuerpos, los términos "Hibridoma" y "Parental" se usan indistintamente y se refieren al Ab que se deriva del hibridoma.

Tabla 4: Información sobre secuencia de aminoácidos y nucleótidos para los hibridomas y los anticuerpos anti-CCR7 humanizados.

Parental 674J13 hlgG1		
SEQ ID NO: 116	HCDR1 (Combinada)	GYSITSGYSWH
SEQ ID NO: 117	HCDR2 (Combinada)	HIHSSGSTNYPNPSLKS
SEQ ID NO: 118	HCDR3 (Combinada)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 119	HCDR1 (Kabat)	SGYSWH
SEQ ID NO: 120	HCDR2 (Kabat)	HIHSSGSTNYPNPSLKS
SEQ ID NO: 121	HCDR3 (Kabat)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 122	HCDR1 (Chothia)	GYSITSGY
SEQ ID NO: 123	HCDR2 (Chothia)	HSSGS
SEQ ID NO: 124	HCDR3 (Chothia)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 125	HCDR1 (IMGT)	GYSITSGYS
SEQ ID NO: 126	HCDR2 (IMGT)	IHSSGST
SEQ ID NO: 127	HCDR3 (IMGT)	ARGGVQAFAY
SEQ ID NO: 128	VH	DVQLQESGPD LVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYSWHWIR QFPGNKLEWMAHIHSSGSTNYPNPSLKSRIIRDTSKNL FFLQLNSVTTEDTATYYCARGGVQAFAYWGQGTLVTV SA
SEQ ID NO: 129	ADN VH	GATGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTG AAACCTTCTCAGTCACTTTCACTCACCTGCACTGTCAC TGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGG ATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGTGGATG GCCACATCCACTCCAGTGGTAGCACTAACTACAACC

		CATCTCTCAAAAAGTCGCATCTCTATCATTTCGAGACAC ATCCAAGAACCTGTTCTTCCTGCAGTTGAATTCTGTG ACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGA GGGGGGGTACAGGCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGG GACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
SEQ ID NO: 130	Cadena Pesada (WT Fc)	DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFP GNKLEWMAHIHSSGSTNYNPSLKSRSIIRDTSKNLFFLQLNS VTTEDTATYYCARGGVQAFAYWGQGLTVTSAASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 131	ADN cadena pesada	gatgtgcagcttcaggagtcaggacctgacctggtgaaaccttctcagtcact ttcactcacctgcactgtcactggctactccatcaccagtggttatagctggca ctggatccggcagtttccaggaaacaaactggagtggtgagggccacatcca ctccagtggttagcactaactacaacccatctctcaaaagtcgcactctatca ttcgagacacatccaagaacctgttcttctcagtgtaattctgtgactactg aggacacagccacatattactgtgaagaggggggtacaggcctttgctta ctggggccaagggactctggtcactgtctctgcaGCTAGCACCAAGGG CCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGTCTACTT CCGGCGGAAGTCTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACT ACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGGGC TCTGACTTCCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAG AGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTG CCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT GGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCC TGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCC TGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAG GACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCA CGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGA GCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACC GTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAG TGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAA AGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCC AGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCA AGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTA CCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCA GCCCCGAGAACAATAAGACCAACCCCCCAGTGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGG ACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAAGTGC GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA GTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG

SEQ ID NO: 132	LCDR1 (Combinada)	SASSSVIYMH
SEQ ID NO: 133	LCDR2 (Combinada)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 134	LCDR3 (Combinada)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 135	LCDR1 (Kabat)	SASSSVIYMH
SEQ ID NO: 136	LCDR2 (Kabat)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 137	LCDR3 (Kabat)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 138	LCDR1 (Chothia)	SSSVIY
SEQ ID NO: 139	LCDR2 (Chothia)	DTS
SEQ ID NO: 140	LCDR3 (Chothia)	WSSNPL
SEQ ID NO: 141	LCDR1 (IMGT)	SSVIY
SEQ ID NO: 142	LCDR2 (IMGT)	DTS
SEQ ID NO: 143	LCDR3 (IMGT)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 144	VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVIYMHWYQQ KSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSM EAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTTLELK
SEQ ID NO: 145	ADN VL	CAAATTGTCCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGC ATCTCCAGGGGAGAAAGGTCACCATGACCTGCAGTGC CAGTTCAAGTGTAATTTACATGCACTGGTACCAGCAG AAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACA CATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAG TGGTAGTGGGTCTGGGACCTCTACTCTCTCACAATC AGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTAC TGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGT GCTGGGACCACGTTGGAGCTGAAA
SEQ ID NO: 146	Cadena ligera	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVIYMHWYQQ KSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSM EAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTTLELKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 147	ADN Cadena ligera	CAAATTGTCCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGC ATCTCCAGGGGAGAAAGGTCACCATGACCTGCAGTGC CAGTTCAAGTGTAATTTACATGCACTGGTACCAGCAG

		AAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACA CATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAG TGGTAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATC AGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTAC TGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGT GCTGGGACCACGTTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGC AGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGC TGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGT GGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGC CAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTC CACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAA GGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGA GGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAA GAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
Parental 121G12 hlgG1		
SEQ ID NO: 148	HCDR1 (Combinada)	GFTFSTYAMS
SEQ ID NO: 149	HCDR2 (Combinada)	TISDGGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 150	HCDR3 (Combinada)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 151	HCDR1 (Kabat)	TYAMS
SEQ ID NO: 152	HCDR2 (Kabat)	TISDGGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 153	HCDR3 (Kabat)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 154	HCDR1 (Chothia)	GFTFSTY
SEQ ID NO: 155	HCDR2 (Chothia)	SDGGSY
SEQ ID NO: 156	HCDR3 (Chothia)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 157	HCDR1 (IMGT)	GFTFSTYA
SEQ ID NO: 158	HCDR2 (IMGT)	ISDGGSYS
SEQ ID NO: 159	HCDR3 (IMGT)	ARRGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 160	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSTYAMSWVR QTPEKRLEWVATISDGGSYSYYPDNVKGFRFTISRDNAL NNLYLQMSHLKSEDTAMYYCARRGSRYEEYYVMDYW GQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 161	ADN VH	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACTTTCAGTACCTATGCCATGTCTTGGG TTCGCCAGACTCCGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTCTG CAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTATTCGTACTATCC AGACAATGTAAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA CAATGCCAAGAACAACCTATACCTGCAAATGAGCCAT CTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAA GACGAGGTAGTAGGTACGAAGAGTACTATGTTATGG ACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTC A
SEQ ID NO: 162	Cadena Pesada (WT Fc)	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSTYAMSWVR QTPEKRLEWVATISDGGSYSYYPDNVKGRTISRDNK NNLYLQMSHLKSEDTAMYYCARRGSRYEYYVMDYW GQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 163	ADN cadena pesada	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACTTTCAGTACCTATGCCATGTCTTGGG TTCGCCAGACTCCGGAAGAGAGGCTGGAGTGGGTGCG CAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTATTCGTACTATCC AGACAATGTAAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CAATGCCAAGAACAACCTATACCTGCAAATGAGCCAT CTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAA GACGAGGTAGTAGGTACGAAGAGTACTATGTTATGG ACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTC AGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTTCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCC TGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACAGTGTCTTGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGC CTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCC AGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGA ACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAG TGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCC CCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTC CGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTG ATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTG GTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC AAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACC TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCCAG GACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACA ATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCA GGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGG CTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAACGGCCAGCCCGAGAACAATAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTAC AGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCA GGGCAACGTGTTCACTGCTGACGCTGATGCACGAGGC CCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTG AGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 164	LCDR1 (Combinada)	RASQISNNLH
SEQ ID NO: 165	LCDR2 (Combinada)	YASQIS
SEQ ID NO: 166	LCDR3 (Combinada)	QQSNSWLT

SEQ ID NO: 167	LCDR1 (Kabat)	RASQSSISNNLH
SEQ ID NO: 168	LCDR2 (Kabat)	YASQSSIS
SEQ ID NO: 169	LCDR3 (Kabat)	QQSNSWLT
SEQ ID NO: 170	LCDR1 (Chothia)	SQSSISNN
SEQ ID NO: 171	LCDR2 (Chothia)	YAS
SEQ ID NO: 172	LCDR3 (Chothia)	SNSWL
SEQ ID NO: 173	LCDR1 (IMGT)	QSSISNN
SEQ ID NO: 174	LCDR2 (IMGT)	YAS
SEQ ID NO: 175	LCDR3 (IMGT)	QQSNSWLT
SEQ ID NO: 176	VL	DIVLTQSPATLSVTPGDSVLSCLASQSSISNNLHWYQQK SHESPKLLIKYASQSSISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETE DFGMVFCQQSNSWLTFGAGTKLGLK
SEQ ID NO: 177	ADN VL	GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGT GACTCCAGGAGATAGCGTCAGTCTTTCCTGCAGGGC CAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAA CAGAAATCACATGAGTCTCCAAAACCTCTCATCAAGT ATGCTTCCAGTCCATCTCTGGGATCCCCTCCAGGTTC AGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGT ATCAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGAATGTATT TCTGTCAACAGAGTAACAGCTGGCTCACGTTCTGGTGC TGGGACCAAGCTGGGGCTGAAA
SEQ ID NO: 178	Cadena ligera	DIVLTQSPATLSVTPGDSVLSCLASQSSISNNLHWYQQK SHESPKLLIKYASQSSISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETE DFGMVFCQQSNSWLTFGAGTKLGLKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 179	ADN Cadena ligera	GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGT GACTCCAGGAGATAGCGTCAGTCTTTCCTGCAGGGC CAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAA CAGAAATCACATGAGTCTCCAAAACCTCTCATCAAGT ATGCTTCCCAGTCCATCTCTGGGATCCCCTCCAGGTTT AGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGT ATCAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGAATGTATT TCTGTCAACAGAGTAACAGCTGGCTCACGTTTCGGTGC TGGGACCAAGCTGGGGCTGAAACGTACGGTGGCCG CTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCA GCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCT GAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTG GAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCC AGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCC ACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAG GCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAG GTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG AGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
Parental 506E15 hlgG1		
SEQ ID NO: 180	HCDR1 (Combinada)	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 181	HCDR2 (Combinada)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 182	HCDR3 (Combinada)	RASTVVGTDGFDV
SEQ ID NO: 183	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
SEQ ID NO: 184	HCDR2 (Kabat)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 185	HCDR3 (Kabat)	RASTVVGTDGFDV
SEQ ID NO: 186	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID NO: 187	HCDR2 (Chothia)	SSGGSF
SEQ ID NO: 188	HCDR3 (Chothia)	RASTVVGTDGFDV
SEQ ID NO: 189	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 190	HCDR2 (IMGT)	ISSGGSFT
SEQ ID NO: 191	HCDR3 (IMGT)	ARRASTVVGTDGFDV

SEQ ID NO: 192	VH	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWIR QTPEKRLEWVATISSGGSFTYYPDSVKGRFTISRDNVKN TLYLQMSSLRSEDAMYYCARRASTVVGTDVDFVWGAG TTVTVSS
SEQ ID NO: 193	ADN VH	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGA TTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGACTGGAGTGGGTGCG CAACCATCAGTAGTGGTGGTAGTTTCACCTACTATCC AGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATTTCTAGAGA CAATGTCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGT CTGAGGTCTGAAGACACGGCCATGTATTACTGTGCA AGACGGGCTTCTACGGTAGTAGGTACGGACTTCGAT GTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 194	Cadena Pesada (WT Fc)	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWIR QTPEKRLEWVATISSGGSFTYYPDSVKGRFTISRDNVKN TLYLQMSSLRSEDAMYYCARRASTVVGTDVDFVWGAG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 195	ADN cadena pesada	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGG TTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGACTGGAGTGGGTG CAACCATCAGTAGTGGTGGTAGTTTCACCTACTATCC AGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATTTCTAGAGA CAATGTCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGT CTGAGGTCTGAAGACACGGCCATGTATTACTGTGCA AGACGGGCTTCTACGGTAGTAGGTACGGACTTCGAT GTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA GCTAGCACCAAGGGGCCAAGTGTGTTTCCCTGGCCC CCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAAGTGTGCCCT GGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACAGTGTCTGGAAGTCTGGGGCTCTGACTTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGC CTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCTCC AGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGA ACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAG TGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCC CCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTC CGTGTTCTGTTCCTCCCCCAAGCCCAAGGACACCTG ATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTG GTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC AAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACC TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACA ATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCA GGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGG CTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAACGGCCAGCCCGAGAACAATAAGACCACCCC CCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTAC AGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCA GGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGC CCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTG AGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 196	LCDR1 (Combinada)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 197	LCDR2 (Combinada)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 198	LCDR3 (Combinada)	LQYASSPPT

SEQ ID NO: 199	LCDR1 (Kabat)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 200	LCDR2 (Kabat)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 201	LCDR3 (Kabat)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 202	LCDR1 (Chothia)	SQDIGSS
SEQ ID NO: 203	LCDR2 (Chothia)	ATS
SEQ ID NO: 204	LCDR3 (Chothia)	YASSPP
SEQ ID NO: 205	LCDR1 (IMGT)	QDIGSS
SEQ ID NO: 206	LCDR2 (IMGT)	ATS
SEQ ID NO: 207	LCDR3 (IMGT)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 208	VL	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQQ EPDGTIKRLIYATSSLDSGVPKRFGSRSGSDYSLTISSLES EDFVYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 209	ADN VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGC CTCTCTGGGAGAAAGAGTCAGTCTCACTTGTCGGGC AAGTCAGGACATTGGTAGTAGCTAAACTGGCTTCA GCAGGAACCAGATGGAACATTAAACGCCTGATCTA TGCCACATCCAGTTTAGATTCTGGTGTCCCCAAAAGG TTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTCAGATTATTCTCTCA CCATCAGCAGCCTTGAGTCTGAAGATTTTGTAGTCTA TACTGTCTACAATATGCTAGTTCGCCTCCGACGTTCCG GTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 210	Cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQQ EPDGTIKRLIYATSSLDSGVPKRFGSRSGSDYSLTISSLES EDFVYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 211	ADN Cadena ligera	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGC CTCTCTGGGAGAAAGAGTCAGTCTCACTTGTCGGGC AAGTCAGGACATTGGTAGTAGCTTAACTGGCTTCA GCAGGAACCAGATGGAACTATTAACGCCTGATCTA TGCCACATCCAGTTTAGATTCTGGTGTCCCCAAAAGG TTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTCAGATTATTCTCTCA CCATCAGCAGCCTTGAGTCTGAAGATTTTGTAGTCTA TTACTGTCTACAATATGCTAGTTCGCCTCCGACGTTG GTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGTACGGTG GCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACG AGCAGCTGAAGAGTGGCACC GCCAGCGTGGTGTGCC TGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGC AGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGGCGAGTGC
Parental 684E12 hlgG1		
SEQ ID NO: 212	HCDR1 (Combinada)	GFTFSNFAMS
SEQ ID NO: 213	HCDR2 (Combinada)	TISTGGTYTYPPDSVKG
SEQ ID NO: 214	HCDR3 (Combinada)	RGYDGVDK
SEQ ID NO: 215	HCDR1 (Kabat)	SNFAMS
SEQ ID NO: 216	HCDR2 (Kabat)	TISTGGTYTYPPDSVKG
SEQ ID NO: 217	HCDR3 (Kabat)	RGYDGVDK
SEQ ID NO: 218	HCDR1 (Chothia)	GFTFSNF
SEQ ID NO: 219	HCDR2 (Chothia)	STGGTY
SEQ ID NO: 220	HCDR3 (Chothia)	RGYDGVDK
SEQ ID NO: 221	HCDR1 (IMGT)	GFTFSNFA
SEQ ID NO: 222	HCDR2 (IMGT)	ISTGGTYT
SEQ ID NO: 223	HCDR3 (IMGT)	TRRGYDGVDK

SEQ ID NO: 224	VH	EVHLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSNFAMSWVRQTP EKRELVATISTGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAAKTLYLQM SSLRSEDAMYYCTRRGYDGVDKWGGQTTTLTVSS
SEQ ID NO: 225	ADN VH	gaagtgcactctggaggagctctggggaggcttagtgaagcctggagggtcc ctgaaactctcctgtgcagcctctggattcactttcagtaactttgccatgtctt gggttcgccagactccggagaagagactggagtgggtcgcaaccattagta ctgggtgtacttacacctactatccagacagtgtaagggtcgattcaccatc tccagagacaatgccaagaaaaccctgtacctgcaaatgagcagctctgagg tctgaggacacggccatgtattactgtacaagacgggggtacgacggcgtg gacaaatggggccaaggcaccactctcacagtctcctca
SEQ ID NO: 226	Cadena Pesada (WT Fc)	EVHLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSNFAMSWVRQTP EKRELVATISTGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAAKTLYLQM SSLRSEDAMYYCTRRGYDGVDKWGGQTTTLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 227	ADN cadena pesada	GAAGTGCATCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAG CCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACTTTAGTAACCTTGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACT CCGGAGAAGAGACTGGAGTGGGTGCAACCATTAGTACT GGTGGTACTTACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTC GATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAAACCCTGTA CCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCAT GTATTACTGTACAAGACGGGGGTACGACGGCGTGGACAA ATGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAgctagcac caagggcccaagtgtgtttcccctggccccagcagcaagtctacttccggc ggaactgctgccctgggttgcttggtgaaggactacttccccgagcccgtga cagtgtcctggaactctggggctctgacttccggcgtgcacaccttccccgcc gtgtgcagagcagcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgacagtgccct ccagctctctgggaacccagacctatctgcaacgtgaaccacaagcccag caacaccaaggtggacaagagagtgaggccaagagctgagcagaagacc acacctgccccctgcccagctccagaactgctgggagggtccttccgtgttc ctgttccccccaagccaaggacacctgatgatcagcaggacccccgag gtgacctgcgtggtgggtgacgtgtcccacgaggacccagaggtgaagttc aactggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacccaagaccaagcccag agaggagcagtacaacagcacctacagggtggtgtccgtgctgaccgtgct gcaccaggactggctgaacggcaaagaatacaagtgaaggtctccaaca aggcctgccagcccaatcgaaaagacaatcagcaaggccaagggccag ccacggggagccccaggtgtacacctgccccccagccgggaggagatgacc aagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggtcttaccaccagcgata tcgccgtggagtgggagagcaacggccagcccagagaacaactacaagacc accccccaagtgtggacagcgacggcagcttcttctgtacagcaagctga ccgtggacaagtccaggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtga tgcacgaggcctgcacaaccactacaccagaagtccctgagcctgagcc ccggcaag

SEQ ID NO: 228	LCDR1 (Combinada)	KSGQSLDSDGKTYLN
SEQ ID NO: 229	LCDR2 (Combinada)	LVSKLDS
SEQ ID NO: 230	LCDR3 (Combinada)	WQGTHFPQT
SEQ ID NO: 231	LCDR1 (Kabat)	KSGQSLDSDGKTYLN
SEQ ID NO: 232	LCDR2 (Kabat)	LVSKLDS
SEQ ID NO: 233	LCDR3 (Kabat)	WQGTHFPQT
SEQ ID NO: 234	LCDR1 (Chothia)	GQSLDSDGKTY
SEQ ID NO: 235	LCDR2 (Chothia)	LVS
SEQ ID NO: 236	LCDR3 (Chothia)	GTHFPQ
SEQ ID NO: 237	LCDR1 (IMGT)	QSLDSDGKTY
SEQ ID NO: 238	LCDR2 (IMGT)	LVS
SEQ ID NO: 239	LCDR3 (IMGT)	WQGTHFPQT
SEQ ID NO: 240	VL	DVVMQTPLTSLVTIGQPASISCKSGQSLDSDGKTYLNWFL QRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGKLEIK
SEQ ID NO: 241	ADN VL	gatgttgatgaccagactccactcactttgtcggttaccattggacaacc agcctcatctcttgcaagtcaggtcagagcctcttagatagtgatggaaag acatatttgaattgggttttacagaggccaggccagctctcaaagcgcta ctatctggtgtctaaactggactctggagtcctgacaggttactggcagtg gatcaggacagatttcacactgaaaatcagcagagtgaggctgaggatt tgaggatttattattgctggcaaggtacacatttctcagacgttcggtgga ggcaccaagctggaaatcaaa
SEQ ID NO: 242	Cadena ligera	DVVMQTPLTSLVTIGQPASISCKSGQSLDSDGKTYLNWFL QRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
SEQ ID NO: 243	ADN Cadena ligera	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTAC CATTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAGGTCAG AGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGGT TTTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTA TCTGGTGTCTAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTT ACTGGCAGTGATCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCA GCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCT

		GGCAAGGTACACATTTTCCTCAGACGTTCCGGTGGAGGCAC CAAGCTGGAAATCAAACgtacggtggccgctcccagcgtgtcatctt ccccccagcgagcagcagctgaagagtggcaccgccagcgtggtgtgcct gctgaacaacttctaccccgggaggccaagggtgcagtggaagggtggaca cgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggacagca aggactccacctacagcctgagcagcacctgaccctgagcaaggccgact acgagaagcataagggtgtacgcctgcgaggtgaccaccagggcctgtcca gccccgtgaccaagagcttcaacaggggagtg
Parental 674J13 hlgG1 CysMab		
SEQ ID NO: 244	HCDR1 (Combinada)	GYSITSGYSWH
SEQ ID NO: 245	HCDR2 (Combinada)	HIHSSGSTNYPNPSLKS
SEQ ID NO: 246	HCDR3 (Combinada)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 247	HCDR1 (Kabat)	SGYSWH
SEQ ID NO: 248	HCDR2 (Kabat)	HIHSSGSTNYPNPSLKS
SEQ ID NO: 249	HCDR3 (Kabat)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 250	HCDR1 (Chothia)	GYSITSGY
SEQ ID NO: 251	HCDR2 (Chothia)	HSSGS
SEQ ID NO: 252	HCDR3 (Chothia)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 253	HCDR1 (IMGT)	GYSITSGYS
SEQ ID NO: 254	HCDR2 (IMGT)	IHSSGST
SEQ ID NO: 255	HCDR3 (IMGT)	ARGGVQAFAY
SEQ ID NO: 256	VH	DVQLQESGPDLVKPSQSLTCTVTGYISITSGYSWHWIR QFPGNKLEWMAHIHSSGSTNYPNPSLKSRIIRDTSKNL FFLQLNSVTTEDTATYYCARGGVQAFAYWGQGLTVT SA
SEQ ID NO: 257	ADN VH	GATGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTG AAACCTTCTCAGTCACTTTCACTCACCTGCACTGTCAC TGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGG ATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGTGGATG GCCCACATCCACTCCAGTGGTAGCACTAACTACAACC CATCTCTCAAAAGTCGCATCTCTATCATTGAGACAC ATCCAAGAACCTGTTCTTCTCCTGCAGTTGAATTCTGTG

		ACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGA GGGGGGGTACAGGCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGG GACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
SEQ ID NO: 258	Cadena Pesada (Cys Mab mutaciones subrayadas)	DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYSWHWIR QFPGNKLEWMAHIHSSGSTNYPNPSLKSIRSIIRDTSKNL FFLQLNSVTTEDTATYYCARGGVQAFAYWGQGLVTV SAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 259	ADN cadena pesada	GATGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTG AAACCTTCTCAGTCACTTTCACTCACCTGCACTGTCAC TGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGG ATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGTGGATG GCCCACATCCACTCCAGTGGTAGCACTAACTACAACC CATCTCTCAAAAGTCGCATCTCTATCATTGAGACAC ATCCAAGAACCTGTTCTTCTGCAGTTGAATTCTGTG ACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGA GGGGGGGTACAGGCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGG GACTCTGGTCACTGTCTCTGCAgctagcaccaaggcccaa gtgtgtttccctggccccagcagcaagtctacttccggcggaactg ctgccctgggttgctgtgaaggactacttccctgtcccgtgacagt gtcctggaactctggggctctgacttccggcgtgcacacctccccgcc gtgctgcagagcagcggtgtacagcctgagcagcgtggtgacagt gccctccagctcttgggaaccagacctatatctgcaactgaacca caagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtggaagcccaagag ctgcgacaagaccacactgccccctgcccagctccagaactgct gggagggccttccgtgttctgttccccccaagcccaaggacacct gatgatcagcaggacccccgagtgactgcgtggtggtggacgtgt cccacgaggaccagaggtgaagttcaactggtacgtggacggcgtg gaggtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggagcagtacaac agcacctacaggggtggtgtccgtgctgacctgctgcaccaggactg gctgaacggcaagaataacaagtgaagttccaacaaggccctg ccagccccaatcgaaaagacaatcagcaaggccaagggccagccac gggagccccaggtgtacacctgccccccagccgggaggagatgac caagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctacctg tgatatcgccgtggagtgaggagcaacggccagcccagagaacaac tacaagaccacccccagtgctggacagcgacggcagcttcttctg tacagcaagctgacctggacaagtcaggtggcagcagggcaacg tgttcagctgcagcgtgatgcagaggccctgcacaacctacacc cagaagtcctgagcctgagccccggcaag

SEQ ID NO: 260	LCDR1 (Combinada)	SASSSVIYMH
SEQ ID NO: 261	LCDR2 (Combinada)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 262	LCDR3 (Combinada)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 263	LCDR1 (Kabat)	SASSSVIYMH
SEQ ID NO: 264	LCDR2 (Kabat)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 265	LCDR3 (Kabat)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 266	LCDR1 (Chothia)	SSSVIY
SEQ ID NO: 267	LCDR2 (Chothia)	DTS
SEQ ID NO: 268	LCDR3 (Chothia)	WSSNPL
SEQ ID NO: 269	LCDR1 (IMGT)	SSVIY
SEQ ID NO: 270	LCDR2 (IMGT)	DTS
SEQ ID NO: 271	LCDR3 (IMGT)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 272	VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVIYMHWYQQ KSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSM EAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTTLELK
SEQ ID NO: 273	ADN VL	CAAATTGTCCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGC ATCTCCAGGGGAGAAAGGTCACCATGACCTGCAGTGC CAGTTCAAGTGTAATTTACATGCACTGGTACCAGCAG AAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACA CATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAG TGGTAGTGGGTCTGGGACCTCTACTCTCTCACAATC AGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTAC TGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGT GCTGGGACCACGTTGGAGCTGAAA
SEQ ID NO: 274	Cadena ligera	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVIYMHWYQQ KSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSM EAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTTLELKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 275	ADN Cadena ligera	CAAATTGTCCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGC ATCTCCAGGGGAGAAAGGTCACCATGACCTGCAGTGC CAGTTCAAGTGTAATTTACATGCACTGGTACCAGCAG

		AAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACA CATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAG TGGTAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATC AGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTAC TGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGT GCTGGGACCACGTTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGC AGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGC TGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGT GGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGC CAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTC CACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAA GGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGA GGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAA GAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
Parental 674J13 hIgG1 DAPA CysMab		
SEQ ID NO: 276	HCDR1 (Combinada)	GYSITSGYSWH
SEQ ID NO: 277	HCDR2 (Combinada)	HIHSSGSTNYPNPSLKS
SEQ ID NO: 278	HCDR3 (Combinada)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 279	HCDR1 (Kabat)	SGYSWH
SEQ ID NO: 280	HCDR2 (Kabat)	HIHSSGSTNYPNPSLKS
SEQ ID NO: 281	HCDR3 (Kabat)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 282	HCDR1 (Chothia)	GYSITSGY
SEQ ID NO: 283	HCDR2 (Chothia)	HSSGS
SEQ ID NO: 284	HCDR3 (Chothia)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 285	HCDR1 (IMGT)	GYSITSGYS
SEQ ID NO: 286	HCDR2 (IMGT)	IHSSGST
SEQ ID NO: 287	HCDR3 (IMGT)	ARGGVQAFAY
SEQ ID NO: 288	VH	DVQLQESGPGPLVKPSQTLSTCTVSGYSITSGYSWHWIR QHPGKGLEWMAHIHSSGSTNYPNPSLKSRLTISRDTSKN

		QFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGVQAFAYWGQGLVT VSS
SEQ ID NO: 289	ADN VH	GACGTGCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTGGTG AAACCCTCCCAGACCCTGTCCCTGACCTGCACCGTGT CCGGCTACTCCATCACCTCCGGCTACAGCTGGCACTG GATCCGGCAGCACCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGAT GGCCACATCCACTCCTCCGGCTCCACCAACTACAAC CCCAGCCTGAAGTCCAGAATCACCATCAGCCGGGAC ACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCTCCG TGACCGCCGCTGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAG AGGCGGCGTGCAGGCCTTCGCTTATTGGGGCCAGGG CACCTGGTGACAGTGTCTCC
SEQ ID NO: 290	Cadena Pesada (DAPA, CysMab mutaciones subrayadas)	DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSGYSWHWIR QHPGKGLEWMAHIHSSGSTNYPNPSLKSRTISRDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGVQAFAYWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVVAVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 291	ADN cadena pesada	GACGTGCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTGGTG AAACCTCCCAGACCCTGTCCCTGACCTGCACCGTGT CCGGCTACTCCATCACCTCCGGCTACAGCTGGCACTG GATCCGGCAGCACCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGAT GGCCACATCCACTCCTCCGGCTCCACCAACTACAAC CCCAGCCTGAAGTCCAGAATCACCATCAGCCGGGAC ACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCTCCG TGACCGCCGCTGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAG AGGCGGCGTGCAGGCCTTCGCTTATTGGGGCCAGGG CACCTGGTGACAGTGTCTCCGCTAGCACCAAGGG CCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGTCT ACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTG AAGGACTACTTCCCCTGTCCCGTGACAGTGTCTGGA ACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGACACCTTCCC CGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAG CAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAAC CCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAG CTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCT CCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTTC CCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGA CCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCGTGTCCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCA GAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTG TCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAAC GGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCC CTGGCTGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCC AAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTG CCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTGTG ATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCC GAGAACAACATAAGACCACCCCCCAGTGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACC GTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC AGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 292	LCDR1 (Combinada)	SASSSVIYMH
SEQ ID NO: 293	LCDR2 (Combinada)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 294	LCDR3 (Combinada)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 295	LCDR1 (Kabat)	SASSSVIYMH

SEQ ID NO: 296	LCDR2 (Kabat)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 297	LCDR3 (Kabat)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 298	LCDR1 (Chothia)	SSSVIY
SEQ ID NO: 299	LCDR2 (Chothia)	DTS
SEQ ID NO: 300	LCDR3 (Chothia)	WSSNPL
SEQ ID NO: 301	LCDR1 (IMGT)	SSVIY
SEQ ID NO: 302	LCDR2 (IMGT)	DTS
SEQ ID NO: 303	LCDR3 (IMGT)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 304	VL	EIVLTQSPATLSASPGERVMTMCSASSSVIYMHWYQQK PGQAPRRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISS MEPEDAAVYYCQQWSSNPLTFGQGGTKLEIK
SEQ ID NO: 305	ADN VL	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCTG CTAGCCCTGGCGAGCGCGTGACAATGTCCTGCTCCGC CTCCTCCTCCGTGATCTACATGCACTGGTATCAGCAG AAGCCCGGCCAGGCCCTCGGCGGTGGATCTACGAT ACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCGCCAGATTCT CCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTACACCCTGACCAT CTCCAGCATGGAACCCGAGGACGCCGCCGTGTACTA CTGCCAGCAGTGGTCCTCCAACCCCTGACCTTCGGC CAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 306	Cadena ligera	EIVLTQSPATLSASPGERVMTMCSASSSVIYMHWYQQK PGQAPRRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISS MEPEDAAVYYCQQWSSNPLTFGQGGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 307	ADN Cadena ligera	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCTGCTAGCCCTGGCGAGCGGTGACAATGTCCTGCTCCGCTCCTCCTCCGTGATCTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTCGGCGGTGGATCTACGATACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCGCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTACACCCTGACCATCTCCAGCATGGAACCCGAGGACGCCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTCCAACCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
Parental 121G12 hlgG1 CysMab		
SEQ ID NO: 308	HCDR1 (Combinada)	GFTFSTYAMS
SEQ ID NO: 309	HCDR2 (Combinada)	TISDAGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 310	HCDR3 (Combinada)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 311	HCDR1 (Kabat)	TYAMS
SEQ ID NO: 312	HCDR2 (Kabat)	TISDAGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 313	HCDR3 (Kabat)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 314	HCDR1 (Chothia)	GFTFSTY
SEQ ID NO: 315	HCDR2 (Chothia)	SDAGSY
SEQ ID NO: 316	HCDR3 (Chothia)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 317	HCDR1 (IMGT)	GFTFSTYA
SEQ ID NO: 318	HCDR2 (IMGT)	ISDAGSYS
SEQ ID NO: 319	HCDR3 (IMGT)	ARRGSRYEEYYVMDY

SEQ ID NO: 320	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSTYAMSWVRQTPEKRLEWVATISDGGSYYPDNVKGRTISRDNKNNLYLQMSHLKSEDTAMYYCARRGSRYEEYYVMDYWGGGTSVTVSS
SEQ ID NO: 321	ADN VH (CysMab mutaciones subrayadas)	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAAGAGGCTGGAGTGGGTCCGCAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTATTCGTACTATCCAGACAATGTAAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTATACCTGCAAATGAGCCATCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACGAGGTAGTAGGTACGAAGAGTACTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 322	Cadena Pesada (CysMab mutaciones subrayadas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSTYAMSWVRQTP EKRLEWVATISDGGSYYPDNVKGRTISRDNKNNLYLQ MSHLKSEDTAMYYCARRGSRYEEYYVMDYWGGGTSVTVSS astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpCpvtvswnsгалtsghvf pavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkt htcppcpapellggpsvflfpkpkdtlmsirtpvctvvvdvshedpevk fnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvs nkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvslclvkgfypC diavewesngqpennyktpvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscs vmhealhnhytqkslspsgk
SEQ ID NO: 323	ADN cadena pesada	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAAGAGGCTGGAGTGGGTCCGCAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTATTCGTACTATCCAGACAATGTAAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTATACCTGCAAATGAGCCATCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACGAGGTAGTAGGTACGAAGAGTACTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAgctagcaccaagggcccaagtgtgtttcccctggccccagcagcaagtctacttccggcggaactgtgccctgggtgcctggtagaggactacttcccctgtcccgtgacagtgtcctggaactctggggctctgacttcggcggtgcacaccttccccgctgtgtgcagagcagcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgacagtgcctccagctctctgggaaccagacctatatctgaacgtgaaccacaagcccagcaacaccaaggtggaacaagagagtggagcccaagagctgcgacaagaccacacctgcccctgcccagctccagaactgtgggagggccttccgtgttcctgttcccccaagcccaaggacaccctgatgatcagcaggacccccgaggtgacctgcgtgggtgggacgtgtcccacgaggaccagaggtgaagtcaactggtagctggacggcgtggaggtgcacaacccaagaccaa

		gccagagaggagcagtacaacagcacctacaggggtggtgtccgtg ctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaagaatacaagtg caaagtctccaacaaggccctgccagcccaatcgaaaagacaatc agcaaggccaagggccagccacgggagccccaggtgtacaccctgc cccccagccgggaggagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgt ctggtgaagggttctaccctgtgatatgccgtggagtgggagagc aacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccagtgctgg acagcgacggcagcttcttctgtacagcaagctgaccgtggacaag tccaggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacga ggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgagcctgagccccg gcaag
SEQ ID NO: 324	LCDR1 (Combinada)	RASQISISNNLH
SEQ ID NO: 325	LCDR2 (Combinada)	YASQISIS
SEQ ID NO: 326	LCDR3 (Combinada)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 327	LCDR1 (Kabat)	RASQISISNNLH
SEQ ID NO: 328	LCDR2 (Kabat)	YASQISIS
SEQ ID NO: 329	LCDR3 (Kabat)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 330	LCDR1 (Chothia)	SQISISNN
SEQ ID NO: 331	LCDR2 (Chothia)	YAS
SEQ ID NO: 332	LCDR3 (Chothia)	SSSWL
SEQ ID NO: 333	LCDR1 (IMGT)	QISISNN
SEQ ID NO: 334	LCDR2 (IMGT)	YAS
SEQ ID NO: 335	LCDR3 (IMGT)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 336	VL	DIVLTQSPATLSVTPGDSVLSCRASQISISNNLHWYQQK SHESPKLLIKYASQISIGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETE DFGMYFCQQSNSWLTFGAGTKLGLK
SEQ ID NO: 337	ADN VL	GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGT GACTCCAGGAGATAGCGTCAGTCTTTCCTGCAGGGC CAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAA CAGAAATCACATGAGTCTCCAAACTTCTCATCAAGT ATGCTTCCAGTCCATCTCTGGGATCCCCTCCAGGTTCC AGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGT

		ATCAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGAATGTATT TCTGTCAACAGAGTAACAGCTGGCTCACGTTCTGGTGC TGGGACCAAGCTGGGGCTGAAA
SEQ ID NO: 338	Cadena ligera	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSSISNNLHWYQQK SHESPKLLIKYASQSSIGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETE DFGMVFCQQSNSWLTFGAGTKLGLKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 339	ADN Cadena ligera	GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGT GACTCCAGGAGATAGCGTCAGTCTTTCCTGCAGGGC CAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAA CAGAAATCACATGAGTCTCCAAAACCTCTCATCAAGT ATGCTTCCCAGTCCATCTCTGGGATCCCCTCCAGGTTC AGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCCTCTCAGT ATCAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGAATGTATT TCTGTCAACAGAGTAACAGCTGGCTCACGTTCTGGTGC TGGGACCAAGCTGGGGCTGAAACGTACGGTGGCCG CTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCA GCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCT GAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTG GAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCC AGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCC ACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAG GCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAG GTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG AGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
Parental 121G12 hIgG1 DAPA CysMab		
SEQ ID NO: 340	HCDR1 (Combinada)	GFTFSTYAMS
SEQ ID NO: 341	HCDR2 (Combinada)	TISDAGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 342	HCDR3 (Combinada)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 343	HCDR1 (Kabat)	TYAMS
SEQ ID NO: 344	HCDR2 (Kabat)	TISDAGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 345	HCDR3 (Kabat)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 346	HCDR1 (Chothia)	GFTFSTY

SEQ ID NO: 347	HCDR2 (Chothia)	SDAGSY
SEQ ID NO: 348	HCDR3 (Chothia)	RGSRYEYYVMDY
SEQ ID NO: 349	HCDR1 (IMGT)	GFTFSTYA
SEQ ID NO: 350	HCDR2 (IMGT)	ISDAGSYS
SEQ ID NO: 351	HCDR3 (IMGT)	ARRGSRYEYYVMDY
SEQ ID NO: 352	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVR QAPGKGLEWVATISDAGSYSYPDNVKGRTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSRYEYYVMDYWG QGTTVTVSS
SEQ ID NO: 353	ADN VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGAGGCCTGGT GAAACCCGGCGGATCCCTGAGACTGTCCTGCGCCGC CTCCGGCTTCACCTTCTCCACCTACGCCATGTCCTGGG TGCGGCAGGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTG GCCACCATCTCCGACGCCGGCTCCTACTCCTACTACCC CGACAACGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGA CAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCC AGACGGGGCTCCAGATACGAAGAGTACTACGTGATG GACTATTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGCC TCC
SEQ ID NO: 354	Cadena Pesada (DAPA, CysMab mutaciones subrayadas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVR QAPGKGLEWVATISDAGSYSYPDNVKGRTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSRYEYYVMDYWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV <u>A</u> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL <u>A</u> APIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 355	ADN cadena pesada	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGAGGCCTGGT GAAACCCGGCGGATCCCTGAGACTGTCCTGCGCCGC CTCCGGCTTCACCTTCTCCACCTACGCCATGTCCTGGG TGCGGCAGGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTG GCCACCATCTCCGACGCCGGCTCCTACTCCTACTACCC CGACAACGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGA CAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCC

		AGACGGGGCTCCAGATACGAAGAGTACTACGTGATG GACTATTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCC TCCGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGG CCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGC CCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCC GTGACAGTGTCTTGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCG GCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCG GCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCT CCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG AGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTG CCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCT TCCGTGTTCTGTTCCTCCCCCAAGCCCAAGGACACCC TGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGG TGGTGGCCGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACG CCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCA CCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACC AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAA GTCTCCAACAAGGCCCTGGCTGCCCAATCGAAAAG ACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCC CAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATAACAAGACCACC CCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGT ACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGC AGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGG CCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCT GAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 356	LCDR1 (Combinada)	RASQISISNNLH
SEQ ID NO: 357	LCDR2 (Combinada)	YASQISIS
SEQ ID NO: 358	LCDR3 (Combinada)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 359	LCDR1 (Kabat)	RASQISISNNLH
SEQ ID NO: 360	LCDR2 (Kabat)	YASQISIS
SEQ ID NO: 361	LCDR3 (Kabat)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 362	LCDR1 (Chothia)	SQISISNN

SEQ ID NO: 363	LCDR2 (Chothia)	YAS
SEQ ID NO: 364	LCDR3 (Chothia)	SSSWL
SEQ ID NO: 365	LCDR1 (IMGT)	QSIENN
SEQ ID NO: 366	LCDR2 (IMGT)	YAS
SEQ ID NO: 367	LCDR3 (IMGT)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 368	VL	EIVLTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSIENNHLHWYQQK PGQAPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEVP EDFGVYFCQQSSSWLTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 369	ADN VL	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCCG TGTCTCCCGGCGAGAGAGTGACCCTGTCCTGCCGGG CCTCCAGTCCATCTCCAACAACCTGCACTGGTATCA GCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATTAA GTACGCCTCCAGAGCATCTCCGGCATCCCTGCCAGA TTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA CCATCTCCAGCGTGGAACCCGAGGACTTCGGCGTGT ACTTCTGCCAGCAGTCCTCATCCTGGCTGACCTTCGG CCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 370	Cadena ligera	EIVLTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSIENNHLHWYQQK PGQAPRLLIKYASQSIGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEVP EDFGVYFCQQSSSWLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 371	ADN Cadena ligera	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCCG TGTCTCCCGGCGAGAGAGTGACCCTGTCCTGCCGGG CCTCCAGTCCATCTCCAACAACCTGCACTGGTATCA GCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATTAA GTACGCCTCCAGAGCATCTCCGGCATCCCTGCCAGA TTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA CCATCTCCAGCGTGGAACCCGAGGACTTCGGCGTGT ACTTCTGCCAGCAGTCCTCATCCTGGCTGACCTTCGG CCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGC CGCTCCAGCGTGTCATCTTCCCCCAGCGACGAG CAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTG CTGAACAACCTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAG CCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACT CCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAA GGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGA

		GGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAA GAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
Parental 506E15 hIgG1 CysMab		
SEQ ID NO: 372	HCDR1 (Combinada)	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 373	HCDR2 (Combinada)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 374	HCDR3 (Combinada)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 375	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
SEQ ID NO: 376	HCDR2 (Kabat)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 377	HCDR3 (Kabat)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 378	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID NO: 379	HCDR2 (Chothia)	SSGGSF
SEQ ID NO: 380	HCDR3 (Chothia)	RASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 381	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 382	HCDR2 (IMGT)	ISSGGSFT
SEQ ID NO: 383	HCDR3 (IMGT)	ARRASTVVGTDFDV
SEQ ID NO: 384	VH	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWIR QTPEKRLEWVATISSGGSFTYYPDSVKGRFTISRDNVKN

		TLYLQMSSLRSED TAMYYCARRASTVVG TDFDVWGAG TTVTVSS
SEQ ID NO: 385	ADN VH	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGA TTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGACTGGAGTGGGTCTG CAACCATCAGTAGTGGTGGTAGTTTCACCTACTATCC AGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATTTCTAGAGA CAATGTCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGT CTGAGGTCTGAAGACACGGCCATGTATTACTGTGCA AGACGGGCTTCTACGGTAGTAGGTACGGACTTCGAT GTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 386	Cadena Pesada (CysMab mutaciones subrayadas)	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWIRQTP EKRELVATISSGGSFTYYPD SVKGRFTISRDNVKN TLYLQM SSLRSED TAMYYCARRASTVVG TDFDVWGAGTTVTVSSastk gpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpCpvtvswngaltsgvhtfpavl qssgylssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcp pcpapellggpsvflfpkpkdltlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnw yvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnka lpapiektiskakgqprepqvylppsreemtknqvslclvkgfypCdiav ewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdkrsrwqqgnvfscsvm healhnhytqkslsispkg
SEQ ID NO: 387	ADN cadena pesada	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGA TTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGACTGGAGTGGGTCTG CAACCATCAGTAGTGGTGGTAGTTTCACCTACTATCC AGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATTTCTAGAGA CAATGTCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGT CTGAGGTCTGAAGACACGGCCATGTATTACTGTGCA AGACGGGCTTCTACGGTAGTAGGTACGGACTTCGAT GTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA gctagaccaaggcccaagtgtgtttccctggccccagcagcaa gtctacttccggcggaactgctgccctgggtgcctggtgaaggacta cttccctgtcccgtgacagtgtcctggaactctggggctctgacttcc ggcgtgcacaccttccccgccgtgctgcagagcagcggtctgacag cctgagcagcgtggtgacagtgccctccagctctctgggaaccaga cctatatctgcaacgtgaaccacaagcccagcaacaccaaggtggac aagagagtggagcccaagagctgcgacaagaccacacctgcccc cctgccagctccagaactgctgggagggccttccgtgttctgttccc cccaagcccaaggacaccctgatgatcagcaggacccccgaggtg acctgcgtggtggtggacgtgtccacgaggaccagaggtgaagtt caactggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacccaagaccaag cccagagaggagcagtacaacagcacctacaggggtggtgtccgtgct gaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaagaatacaagtgc aaagtctccaacaaggccctgccagcccaatcgaaaagacaatca

		gcaaggccaagggccagccacgggagccccaggtgtacaccctgcc ccccagccgggaggagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtc tggtgaagggcttctaccctgtgatatgccgtggagtgggagagca acggccagcccagagaacaactacaagaccacccccagtgctgga cagcgacggcagcttcttctgtacagcaagctgacctggacaagt ccaggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgag gccctgcacaaccactacaccagaagtccctgagcctgagccccgg caag
SEQ ID NO: 388	LCDR1 (Combinada)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 389	LCDR2 (Combinada)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 390	LCDR3 (Combinada)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 391	LCDR1 (Kabat)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 392	LCDR2 (Kabat)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 393	LCDR3 (Kabat)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 394	LCDR1 (Chothia)	SQDIGSS
SEQ ID NO: 395	LCDR2 (Chothia)	ATS
SEQ ID NO: 396	LCDR3 (Chothia)	YASSPP
SEQ ID NO: 397	LCDR1 (IMGT)	QDIGSS
SEQ ID NO: 398	LCDR2 (IMGT)	ATS
SEQ ID NO: 399	LCDR3 (IMGT)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 400	VL	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQQ EPDGTIKRLIYATSSLDSGVPKRFSGSRSGSDYSLTISLES EDFVYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 401	ADN VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGC CTCTCTGGGAGAAAGAGTCAGTCTCACTTGTCGGGC AAGTCAGGACATTGGTAGTAGCTTAACTGGCTTCA GCAGGAACCAGATGGAACATTAAACGCCTGATCTA TGCCACATCCAGTTTAGATTCTGGTGTCCCCAAAAGG TTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTGAGATTATTCTCTCA CCATCAGCAGCCTTGAGTCTGAAGATTTTGTAGTCTA TACTGTCTACAATATGCTAGTTCGCCTCCGACGTTTCG GTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

SEQ ID NO: 402	Cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQQ EPDGTIKRLIYATSSLD SGV PKRFSGRSGSDYSLTSSLES EDFV VYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVC LLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVT KSFNRGEC
SEQ ID NO: 403	ADN Cadena ligera	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGC CTCTCTGGGAGAAAGAGTCAGTCTCACTTGTCGGGC AAGTCAGGACATTGGTAGTAGCTTAACTGGCTTCA GCAGGAACCAGATGGA ACTATTAACGCCTGATCTA TGCCACATCCAGTTTAGATTCTGGTGTCCCCAAAAGG TTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTCAGATTATTCTCTCA CCATCAGCAGCCTTGAGTCTGAAGATTTTGTAGTCTA T TACTGTCTACAATATGCTAGTTCGCCTCCGACGTTG GTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGTACGGTG GCCGCTCCCAGCGTGTT CATCTTCCCCCCCAGCGACG AGCAGCTGAAGAGTGGCACC GCCAGCGTGGTGTGCC TGCTGAACA ACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGC AGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTG C
Parental 506E15 hlgG1 DAPA CysMab		
SEQ ID NO: 404	HCDR1 (Combinada)	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 405	HCDR2 (Combinada)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 406	HCDR3 (Combinada)	RASTVVGTD F DV
SEQ ID NO: 407	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
SEQ ID NO: 408	HCDR2 (Kabat)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 409	HCDR3 (Kabat)	RASTVVGTD F DV
SEQ ID NO: 410	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID NO: 411	HCDR2 (Chothia)	SSGGSF
SEQ ID NO: 412	HCDR3 (Chothia)	RASTVVGTD F DV

SEQ ID NO: 413	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 414	HCDR2 (IMGT)	ISSGGSFT
SEQ ID NO: 415	HCDR3 (IMGT)	ARRASTVVGTDVDV
SEQ ID NO: 416	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWIR QAPGKGLEWVATISSGGSFTYYPDSVKGRFTISRDNAL NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRASTVVGTDVDVWG QGTTVTVSS
SEQ ID NO: 417	ADN VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAACTCTGGCGGAGGCCTGGT GAAACCCGGCGGATCCCTGAGACTGTCCTGCGCCGC CTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGCCATGTCCTGGA TCCGGCAGGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTG GCCACCATCTCCTCCGGCGGCAGCTTCACCTACTACC CCGACAGCGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGG ACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTC CCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC CAGACGGGCCTCCACCGTCGTGGGAACCGACTTCGA TGTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCTC C
SEQ ID NO: 418	Cadena Pesada (DAPA, CysMab mutaciones subrayadas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWIR QAPGKGLEWVATISSGGSFTYYPDSVKGRFTISRDNAL NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRASTVVGTDVDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPC <u>P</u> PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHT CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV <u>A</u> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL <u>A</u> APIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPC <u>D</u> IA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 419	ADN cadena pesada	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGAGGCCTGGT GAAACCCGGCGGATCCCTGAGACTGTCCTGCGCCGC CTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGCCATGTCCTGGA TCCGGCAGGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTG GCCACCATCTCCTCCGGCGGCAGCTTCACCTACTACC CCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGG ACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTC CCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC CAGACGGGCCTCCACCGTCGTGGGAACCGACTTCGA TGTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCTC CGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCC TGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCCGT GACAGTGTCTGGAACCTCTGGGGCTCTGACTTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGC CTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCC AGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGA ACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAG TGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCC CCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTC CGTGTTCTGTTCACCCCCAAGCCCAAGGACACCTG ATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTG GTGGCCGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC AAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACC TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTC TCCAACAAGGCCCTGGCTGCCCCAATCGAAAAGACA ATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCA GGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGG CTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAACGGCCAGCCCGAGAACAATAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTAC AGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCA GGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGC CCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTG AGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 420	LCDR1 (Combinada)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 421	LCDR2 (Combinada)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 422	LCDR3 (Combinada)	LQYASSPPT

SEQ ID NO: 423	LCDR1 (Kabat)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 424	LCDR2 (Kabat)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 425	LCDR3 (Kabat)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 426	LCDR1 (Chothia)	SQDIGSS
SEQ ID NO: 427	LCDR2 (Chothia)	ATS
SEQ ID NO: 428	LCDR3 (Chothia)	YASSPP
SEQ ID NO: 429	LCDR1 (IMGT)	QDIGSS
SEQ ID NO: 430	LCDR2 (IMGT)	ATS
SEQ ID NO: 431	LCDR3 (IMGT)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 432	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCRASQDIGSSLNWLQQ KPGKAIKRLIYATSSLDSGVPSRFSGRSGTDYTLTISSLQ PEDFVYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 433	ADN VL	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCCG CCTCCGTGGGCGATAGAGTGACCCTGACCTGCCGGG CCTCCCAGGACATCGGCTCCTCCCTGAACTGGCTGCA GCAGAAGCCCGGCAAGGCCATCAAGCGGCTGATCTA CGCCACCTCCTCCCTGGACTCCGGCGTGCCCTCCCGG TTCTCCGGCTCTAGATCCGGCACCGACTACACCCTGA CCATCTCCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGTGGTGTA CTACTGCCTGCAGTACGCCTCCAGCCCCCCCCACCTTG GCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 434	Cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCRASQDIGSSLNWLQQ KPGKAIKRLIYATSSLDSGVPSRFSGRSGTDYTLTISSLQ PEDFVYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 435	ADN Cadena ligera	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCCG CCTCCGTGGGCGATAGAGTGACCCTGACCTGCCGGG CCTCCCAGGACATCGGCTCCTCCCTGAACTGGCTGCA GCAGAAGCCCGGCAAGGCCATCAAGCGGCTGATCTA CGCCACCTCCTCCCTGGACTCCGGCGTGCCCTCCCGG TTCTCCGGCTCTAGATCCGGCACCAGCTACACCCTGA CCATCTCCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGTGGTGTA CTACTGCCTGCAGTACGCCTCCAGCCCCCCCACCTTTG GCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTG GCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACG AGCAGCTGAAGAGTGGCACC GCCAGCGTGGTGTGCC TGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGC AGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGGCGAGTGC
Parental 684E12 hlgG1 CysMab		
SEQ ID NO: 436	HCDR1 (Combinada)	GFTFSNFAMS
SEQ ID NO: 437	HCDR2 (Combinada)	TISTGGTYTYPPDSVKG
SEQ ID NO: 438	HCDR3 (Combinada)	RGYDGVDK
SEQ ID NO: 439	HCDR1 (Kabat)	SNFAMS
SEQ ID NO: 440	HCDR2 (Kabat)	TISTGGTYTYPPDSVKG
SEQ ID NO: 441	HCDR3 (Kabat)	RGYDGVDK
SEQ ID NO: 442	HCDR1 (Chothia)	GFTFSNF
SEQ ID NO: 443	HCDR2 (Chothia)	STGGTY
SEQ ID NO: 444	HCDR3 (Chothia)	RGYDGVDK
SEQ ID NO: 445	HCDR1 (IMGT)	GFTFSNFA
SEQ ID NO: 446	HCDR2 (IMGT)	ISTGGTYT
SEQ ID NO: 447	HCDR3 (IMGT)	TRRGYDGVDK

SEQ ID NO: 448	VH	EVHLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSNFAMSWVRQTP EKRELVATISTGGTYTYPPDSVKGRFTISRDNAAKTLYLQM SSLRSEDAMYYCTRRGYDGVDKWGQGTTTLTVSS
SEQ ID NO: 449	ADN VH	GAAGTGCATCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAG CCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACTTTAGTAACCTTGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACT CCGGAGAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTACT GGTGGTACTTACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTC GATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAAACCCTGTA CCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCAT GTATTACTGTACAAGACGGGGGTACGACGGCGTGGACAA ATGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 450	Cadena Pesada (CysMab mutaciones subrayadas)	EVHLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSNFAMSWVRQTP EKRELVATISTGGTYTYPPDSVKGRFTISRDNAAKTLYLQM SSLRSEDAMYYCTRRGYDGVDKWGQGTTTLTVSSastkgpsvf plapsskstsggtaalglvdyfpCpvtvswngaltsgvhtfpavqlssgl yslssvtpssslgtqtyicvnhkpsntkvdrvepkscdkthtccppca pellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdg vevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapi ektiskakgqprepqvylppsreemtknqvsltlvkgfypCdiavewe sngqpennyktpvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmheal hnhytqkslslspgk
SEQ ID NO: 451	ADN cadena pesada (CysMab mutaciones subrayadas)	GAAGTGCATCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAG CCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACTTTAGTAACCTTGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACT CCGGAGAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTACT GGTGGTACTTACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTC GATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAAACCCTGTA CCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCAT GTATTACTGTACAAGACGGGGGTACGACGGCGTGGACAA ATGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAgtagca ccaagggcccaagtgtgttcccctggccccagcagcaagtctactt ccggcggaactgctgccctgggttgctgtgaaggactacttcccct gtcccgtgacagtgtcctggaactctggggctctgacttccggcgtgc acaccttccccgctgctgcagagcagcggtgtacagcctgagc agcgtggtgacagtgcctccagctctctgggaaccagacctatctc tgcaactgaaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaga gtggagcccaagagctgcgacaagaccacacctgccccctgccc agctccagaactgctgggagggccttccgtgttctgttccccccaa gccaaggacaccctgatgatcagcaggacccccgaggtgacctgag tggtggtggacgtgtccacgaggacccagaggtgaagttcaactgg tacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcccagag aggagcagtacaacagcacctacagggtggtgtccgtgctgaccgtg ctgcaccaggactggctgaacggcaaagaatacaagtgaagctc ccaacaaggccctgccagccccaatcgaagaagacaatcagcaaggc caagggccagccacgggagccccaggtgtacacctgccccccagc cgggaggagatgaccaagaaccaggtgtcctgacctgtctggtgaa gggcttctaccctgtgatatcgccgtggagtgaggagagcaacggcc

		agcccgagaacaactacaagaccacccccccagtgctggacagcga cggcagcttcttctgtacagcaagctgaccgtggacaagtccaggtg gcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcagaggccctgc acaaccactacaccagaagtccctgagcctgagccccggcaag
SEQ ID NO: 452	LCDR1 (Combinada)	KSGQSLDSDGKTYLN
SEQ ID NO: 453	LCDR2 (Combinada)	LVSKLDS
SEQ ID NO: 454	LCDR3 (Combinada)	WQGFHFPQT
SEQ ID NO: 455	LCDR1 (Kabat)	KSGQSLDSDGKTYLN
SEQ ID NO: 456	LCDR2 (Kabat)	LVSKLDS
SEQ ID NO: 457	LCDR3 (Kabat)	WQGFHFPQT
SEQ ID NO: 458	LCDR1 (Chothia)	GQSLDSDGKTY
SEQ ID NO: 459	LCDR2 (Chothia)	LVS
SEQ ID NO: 460	LCDR3 (Chothia)	GTHFPQ
SEQ ID NO: 461	LCDR1 (IMGT)	QSLDSDGKTY
SEQ ID NO: 462	LCDR2 (IMGT)	LVS
SEQ ID NO: 463	LCDR3 (IMGT)	WQGFHFPQT
SEQ ID NO: 464	VL	DVVMQTPLTSLVTIGQPASISCKSGQSLDSDGKTYLNWFL QRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVIYCWQGFHFPQTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 465	ADN VL	gatgtgtgatgaccagactccactcactttgtcggttaccattggacaacc agcctcatctcttgaagtcaggtcagagcctcttagatagtgaggaaag acatatttgaattggttttacagaggccagccagctctcaaagcgctaat ctatctggtgtctaaactggactctggagtcctgacaggttactggcagtg gatcagggacagatttcacactgaaaatcagcagagtgagggtgaggatt tgaggatttattattgctggcaaggtacacatttctcagacgttcggtgga ggcaccaagctggaaatcaaa
SEQ ID NO: 466	Cadena ligera	DVVMQTPLTSLVTIGQPASISCKSGQSLDSDGKTYLNWFL QRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVIYCWQGFHFPQTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVCLNNFYPRFAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
SEQ ID NO: 467	ADN Cadena ligera	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTAC CATTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAGGTCAG AGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGGT

		TTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTA TCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTT ACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTGAAAATCA GCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCT GGCAAGGTACACATTTTCCTCAGACGTTCCGGTGGAGGCAC CAAGCTGGAAATCAAACgtacggtggccgctcccagcgtgtcatctt ccccccagcgacgagcagctgaagagtggcaccgccagcgtggtgtgcct gctgaacaacttctaccccgggaggccaaggtgcagtggaaggtggacaa cgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggacagca aggactccacctacagcctgagcagcacctgaccctgagcaaggccgact acgagaagcataaggtgtacgcctgcgaggtgaccaccagggcctgtcca gccccgtgaccaagagcttcaacagggcgagtg
Parental 684E12 hlgG1 DAPA CysMab		
SEQ ID NO: 468	HCDR1 (Combinada)	GFTFSNFAMS
SEQ ID NO: 469	HCDR2 (Combinada)	TISTGGTYTYPPDSVKG
SEQ ID NO: 470	HCDR3 (Combinada)	RGYDGVDK
SEQ ID NO: 471	HCDR1 (Kabat)	SNFAMS
SEQ ID NO: 472	HCDR2 (Kabat)	TISTGGTYTYPPDSVKG
SEQ ID NO: 473	HCDR3 (Kabat)	RGYDGVDK
SEQ ID NO: 474	HCDR1 (Chothia)	GFTFSNF
SEQ ID NO: 475	HCDR2 (Chothia)	STGGTY
SEQ ID NO: 476	HCDR3 (Chothia)	RGYDGVDK
SEQ ID NO: 477	HCDR1 (IMGT)	GFTFSNFA
SEQ ID NO: 478	HCDR2 (IMGT)	ISTGGTYT
SEQ ID NO: 479	HCDR3 (IMGT)	TRRGYDGVDK
SEQ ID NO: 480	VH	EVHLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNFAMSWVRQTP EKRLEWVATISTGGTYTYPPDSVKGFRFTISRDNAAKKTLYLQM SSLRSEDAMYYCTRRGYDGVDKWVGQGTTLTVSS
SEQ ID NO: 481	ADN VH	GAAGTGCATCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAG CCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACTTTAGTAACCTTGCCATGTCTTGGGTTCCGCCAGACT CCGAGAGAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTACT GGTGGTACTTACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTC

		GATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAAACCCTGTA CCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCAT GTATTACTGTACAAGACGGGGGTACGACGGCGTGACAA ATGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 482	Cadena Pesada (DAPA, CysMab mutaciones subrayadas)	EVHLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSNFAMSWVRQTP EKRELVATISTGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAAKKTLYLQM SSLRSEDAMYYCTRRGYDGVDKWGGQTTLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVIVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPC DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 483	ADN cadena pesada	GAAGTGCATCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAG CCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACTTTCAGTAACTTGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACT CCGGAGAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTACT GGTGGTACTTACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTC GATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAAACCCTGTA CCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCAT GTATTACTGTACAAGACGGGGGTACGACGGCGTGACAA ATGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGctagca ccaagggcccaagtgtgttcccctggccccagcagcaagtctactt ccggcggaactgctgccctgggttgctggtgaaggactacttcccct gtcccgtgacagtgtcctggaactctggggctctgacttccggcgtgc acaccttccccgctgtgctgagagcagcggtgtacagcctgagc agcgtggtgacagtgtcctccagctctctgggaaccagacctatctc tgcaactgaaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaga gtggagcccaagagctgcgacaagaccacacctgccccctgccc agctccagaactgctgggagggccttccgtgttctgttccccccaa gccaaggaacacctgatgatcagcaggacccccgaggtgacctgcg tggtggtggcctgtcccacgaggacccagaggtgaagttcaactgg tacgtggacggcgtggaggtgcacaacccaagaccaagcccagag aggagcagtacaacagcacctacagggtggtgtcctgctgacctg ctgcaccaggactggctgaacggcaaagaatacaagtgaagctt ccaacaaggccctggctgccccaatcgaaaagacaatcagcaaggc caagggccagccacgggagccccaggtgtacacctgccccccagc cgggaggagatgaccaagaaccaggtgtcctgacctgtctggtgaa gggcttctaccctgtgatatcgccgtggagtgggagagcaacggcc agcccgagaacaactacaagaccacccccagtgctggacagcga cggcagcttcttctgtacagcaagctgacctggacaagtccaggtg gcagcagggcaactgttctcagctgcagcgtgatgcagaggccctgc acaaccactacaccagaagtcctgagcctgagccccgggaag
SEQ ID NO: 484	LCDR1 (Combinada)	KSGQSLDSDGKTYLN

SEQ ID NO: 485	LCDR2 (Combinada)	LVSKLDS
SEQ ID NO: 486	LCDR3 (Combinada)	WQGTHFPQT
SEQ ID NO: 487	LCDR1 (Kabat)	KSGQSLDSDGKTYLN
SEQ ID NO: 488	LCDR2 (Kabat)	LVSKLDS
SEQ ID NO: 489	LCDR3 (Kabat)	WQGTHFPQT
SEQ ID NO: 490	LCDR1 (Chothia)	GQSLDSDGKTY
SEQ ID NO: 491	LCDR2 (Chothia)	LVS
SEQ ID NO: 492	LCDR3 (Chothia)	GTHFPQ
SEQ ID NO: 493	LCDR1 (IMGT)	QSLDSDGKTY
SEQ ID NO: 494	LCDR2 (IMGT)	LVS
SEQ ID NO: 495	LCDR3 (IMGT)	WQGTHFPQT
SEQ ID NO: 496	VL	DVVMQTPLTSLVTIGQPASISCKSGQSLDSDGKTYLNWFL QRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGDFTLKISRVEA EDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGKLEIK
SEQ ID NO: 497	ADN VL	gatgttgatgaccagactccactcactttgtcggttaccattggacaacc agcctcatctcttgcaagtcaggtcagagcctcttagatagtgatggaaag acatatttgaattggttttacagaggccaggccagctctcaaagcgctaat ctatctggtgtctaaactggactctggagtcctgacaggttactggcagtg gatcaggacagatttcacactgaaaatcagcagagtgagggtgaggatt tggtgatttattattgctggcaaggtacacatttctcagacgttcggtgga ggcaccaagctggaaatcaaa
SEQ ID NO: 498	Cadena ligera	DVVMQTPLTSLVTIGQPASISCKSGQSLDSDGKTYLNWFL QRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGDFTLKISRVEA EDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
SEQ ID NO: 499	ADN Cadena ligera	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTAC CATTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAGGTCAG AGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGGT TTTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTA TCTGGTGTCTAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTT ACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTGAAAATCA GCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCT GGCAAGGTACACATTTCTCAGACGTTGGTGGAGGCAC CAAGCTGGAAATCAAAcgtacggtggccgctcccagcgtgttcatctt

		ccccccagcgacgagcagctgaagagtggcaccgccagcgtggtgtgcct gctgaacaacttctacccccgggaggccaaggtgcagtggaaggtggacaa cgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggacagca aggactccacctacagcctgagcagcacctgaccctgagcaaggccgact acgagaagcataaggtgtacgcctgcgaggtgaccaccagggcctgtcca gccccgtgaccaagagcttcaacaggggagtgctgc
Humanizado 674J13 hIgG1 DAPA		
SEQ ID NO: 500	HCDR1 (Combinada)	GYSITSGYSWH
SEQ ID NO: 501	HCDR2 (Combinada)	HIHSSGSTNYNPSLKS
SEQ ID NO: 502	HCDR3 (Combinada)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 503	HCDR1 (Kabat)	SGYSWH
SEQ ID NO: 504	HCDR2 (Kabat)	HIHSSGSTNYNPSLKS
SEQ ID NO: 505	HCDR3 (Kabat)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 506	HCDR1 (Chothia)	GYSITSGY
SEQ ID NO: 507	HCDR2 (Chothia)	HSSGS
SEQ ID NO: 508	HCDR3 (Chothia)	GGVQAFAY
SEQ ID NO: 509	HCDR1 (IMGT)	GYSITSGYS
SEQ ID NO: 510	HCDR2 (IMGT)	IHSSGST
SEQ ID NO: 511	HCDR3 (IMGT)	ARGGVQAFAY
SEQ ID NO: 512	VH	DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSGYSWHWIR QHPGKGLEWMAHIHSSGSTNYNPSLKSRLTISRDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGVQAFAYWGQGTTLVT VSS
SEQ ID NO: 513	ADN VH	GACGTGCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTGGTG AAACCCTCCCAGACCCTGTCCCTGACCTGCACCGTGT CCGGCTACTCCATCACCTCCGGCTACAGCTGGCACTG GATCCGGCAGCACCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGAT GGCCACATCCACTCCTCCGGCTCCACCACTACAAC CCCAGCCTGAAGTCCAGAATCACCATCAGCCGGGAC ACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCG TGACCGCCGCTGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAG

		AGGCGGCGTGCAGGCCTTCGCTTATTGGGGCCAGGG CACCTGGTGACAGTGTCTCC
SEQ ID NO: 514	Cadena Pesada (DAPA mutaciones subrayadas)	DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSGYSWHWIR QHPGKGLEWMAHIHSSGSTNYNPSLKSRTISRDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGVQAFAYWGQGTTLV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVA <u>a</u> VSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL <u>a</u> APIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 515	ADN cadena pesada	GACGTGCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTGGTG AAACCTCCCAGACCCTGTCCCTGACCTGCACCGTGT CCGGCTACTCCATCACCTCCGGCTACAGCTGGCACTG GATCCGGCAGCACCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGAT GGCCACATCCACTCCTCCGGCTCCACCAACTACAAC CCCAGCCTGAAGTCCAGAATCACCATCAGCCGGGAC ACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCTCCG TGACCGCCGCTGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAG AGGCGGCGTGCAGGCCTTCGCTTATTGGGGCCAGGG CACCTGGTGACAGTGTCTCCGCTAGCACCAAGGG CCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGTCT ACTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTG AAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGG AACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTTCC CCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGA GCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAA CCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGA GCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCAGC TCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTTC CCCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAGG ACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCGTGTCC CACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCC AGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGC CCTGGCTGCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCT GCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGC GATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCC CGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGA CAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACC GTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC AGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 516	LCDR1 (Combinada)	SASSSVIYMH
SEQ ID NO: 517	LCDR2 (Combinada)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 518	LCDR3 (Combinada)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 519	LCDR1 (Kabat)	SASSSVIYMH

SEQ ID NO: 520	LCDR2 (Kabat)	DTSKLAS
SEQ ID NO: 521	LCDR3 (Kabat)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 522	LCDR1 (Chothia)	SSSVIY
SEQ ID NO: 523	LCDR2 (Chothia)	DTS
SEQ ID NO: 524	LCDR3 (Chothia)	WSSNPL
SEQ ID NO: 525	LCDR1 (IMGT)	SSVIY
SEQ ID NO: 526	LCDR2 (IMGT)	DTS
SEQ ID NO: 527	LCDR3 (IMGT)	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 528	VL	EIVLTQSPATLSASPGERVMTMCSASSSVIYMHWYQQK PGQAPRRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISS MEPEDAAVYYCQQWSSNPLTFGQGGTKLEIK
SEQ ID NO: 529	ADN VL	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCTG CTAGCCCTGGCGAGCGCGTGACAATGTCCTGCTCCGC CTCCTCCTCCGTGATCTACATGCACTGGTATCAGCAG AAGCCCGGCCAGGCCCTCGGCGGTGGATCTACGAT ACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCGCCAGATTCT CCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTACACCCTGACCAT CTCCAGCATGGAACCCGAGGACGCCGCCGTGTACTA CTGCCAGCAGTGGTCCTCCAACCCCTGACCTTCGGC CAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 530	Cadena ligera	EIVLTQSPATLSASPGERVMTMCSASSSVIYMHWYQQK PGQAPRRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISS MEPEDAAVYYCQQWSSNPLTFGQGGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 531	ADN Cadena ligera	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCTGCTAGCCCTGGCGAGCGGTGACAATGTCCTGCTCCGCTCCTCCTCCGTGATCTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTCGGCGGTGGATCTACGATACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCGCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTACACCCTGACCATCTCCAGCATGGAACCCGAGGACGCCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTCCAACCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
Humanizado 121G12 hIgG1 DAPA		
SEQ ID NO: 532	HCDR1 (Combinada)	GFTFSTYAMS
SEQ ID NO: 533	HCDR2 (Combinada)	TISDAGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 534	HCDR3 (Combinada)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 535	HCDR1 (Kabat)	TYAMS
SEQ ID NO: 536	HCDR2 (Kabat)	TISDAGSYSYYPDNVKG
SEQ ID NO: 537	HCDR3 (Kabat)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 538	HCDR1 (Chothia)	GFTFSTY
SEQ ID NO: 539	HCDR2 (Chothia)	SDAGSY
SEQ ID NO: 540	HCDR3 (Chothia)	RGSRYEEYYVMDY
SEQ ID NO: 541	HCDR1 (IMGT)	GFTFSTYA
SEQ ID NO: 542	HCDR2 (IMGT)	ISDAGSYS
SEQ ID NO: 543	HCDR3 (IMGT)	ARRGSRYEEYYVMDY

SEQ ID NO: 544	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVR QAPGKGLEWVATISDAGSYSYPDNVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSRYEYYVMDYWG QGTTVTVSS
SEQ ID NO: 545	ADN VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGCCTGGT GAAACCCGGCGGATCCCTGAGACTGTCCTGCGCCGC CTCCGGCTTCACCTTCTCCACCTACGCCATGTCCTGGG TGCGGCAGGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTG GCCACCATCTCCGACGCCGGCTCCTACTCCTACTACCC CGACAACGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGA CAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCC AGACGGGGCTCCAGATACGAAGAGTACTACGTGATG GACTATTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCC TCC
SEQ ID NO: 546	Cadena Pesada (DAPA mutaciones subrayadas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVR QAPGKGLEWVATISDAGSYSYPDNVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSRYEYYVMDYWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV <u>a</u> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL <u>a</u> APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 547	ADN cadena pesada	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGAGGCCTGGT GAAACCCGGCGGATCCCTGAGACTGTCCTGCGCCGC CTCCGGCTTCACCTTCTCCACCTACGCCATGTCCTGGG TGCGGCAGGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTG GCCACCATCTCCGACGCCGGCTCCTACTCCTACTACCC CGACAACGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGA CAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCC AGACGGGGCTCCAGATACGAAGAGTACTACGTGATG GACTATTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCC TCCGCTAGACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGG CCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGC CCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGGGCTCTGACTTCCG GCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCG GCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCT CCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGT GAACCAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG AGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTG CCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCT TCCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCC TGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGG TGGTGGCCGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACG CCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCA CCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACC AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAA GTCTCCAACAAGGCCCTGGCTGCCCAATCGAAAAG ACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCC CAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAACGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACC CCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGT ACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGC AGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGG CCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCT GAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 548	LCDR1 (Combinada)	RASQISNNLH
SEQ ID NO: 549	LCDR2 (Combinada)	YASQIS
SEQ ID NO: 550	LCDR3 (Combinada)	QQSSSWLT

SEQ ID NO: 551	LCDR1 (Kabat)	RASQSSISNNLH
SEQ ID NO: 552	LCDR2 (Kabat)	YASQSSIS
SEQ ID NO: 553	LCDR3 (Kabat)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 554	LCDR1 (Chothia)	SQSSISNN
SEQ ID NO: 555	LCDR2 (Chothia)	YAS
SEQ ID NO: 556	LCDR3 (Chothia)	SSSWL
SEQ ID NO: 557	LCDR1 (IMGT)	QSSISNN
SEQ ID NO: 558	LCDR2 (IMGT)	YAS
SEQ ID NO: 559	LCDR3 (IMGT)	QQSSSWLT
SEQ ID NO: 560	VL	EIVLTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSSISNNLHWYQQK PGQAPRLLIKYASQSSISGIPARFSGSGSGTDFTLTSSVEP EDFGVYFCQQSSSWLTFGQGGTKLEIK
SEQ ID NO: 561	ADN VL	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCCG TGTCTCCCGGCGAGAGAGTGACCCTGTCTGCCGGG CCTCCCAGTCCATCTCCAACAACCTGCACTGGTATCA GCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATTAA GTACGCCTCCCAGAGCATCTCCGGCATCCCTGCCAGA TTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA CCATCTCCAGCGTGGAACCCGAGGACTTCGGCGTGT ACTTCTGCCAGCAGTCCTCATCCTGGCTGACCTTCGG CCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 562	Cadena ligera	EIVLTQSPATLSVSPGERVTLSRASQSSISNNLHWYQQK PGQAPRLLIKYASQSSISGIPARFSGSGSGTDFTLTSSVEP EDFGVYFCQQSSSWLTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 563	ADN Cadena ligera	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCCG TGTCTCCCGGCGAGAGAGTGACCCTGTCCTGCCGGG CCTCCCAGTCCATCTCCAACAACCTGCACTGGTATCA GCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATTAA GTACGCCTCCCAGAGCATCTCCGGCATCCCTGCCAGA TTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA CCATCTCCAGCGTGGAACCCGAGGACTTCGGCGTGT ACTTCTGCCAGCAGTCCTCATCCTGGCTGACCTTCGG CCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGC CGTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAG CAGCTGAAGAGTGGCACC GCCAGCGTGGTGTGCCTG CTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAG CCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACT CCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAA GGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGA GGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAA GAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
Humanizado 506E15 hIgG1 DAPA		
SEQ ID NO: 564	HCDR1 (Combinada)	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 565	HCDR2 (Combinada)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 566	HCDR3 (Combinada)	RASTVVGTD FDV
SEQ ID NO: 567	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
SEQ ID NO: 568	HCDR2 (Kabat)	TISSGGSFTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 569	HCDR3 (Kabat)	RASTVVGTD FDV
SEQ ID NO: 570	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID NO: 571	HCDR2 (Chothia)	SSGGSF
SEQ ID NO: 572	HCDR3 (Chothia)	RASTVVGTD FDV
SEQ ID NO: 573	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 574	HCDR2 (IMGT)	ISSGGSFT
SEQ ID NO: 575	HCDR3 (IMGT)	ARRASTVVGTD FDV

SEQ ID NO: 576	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWIR QAPGKGLEWVATISSGGSFTYYPDSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRASTVVGTDVDFVWG QGTTVTVSS
SEQ ID NO: 577	ADN VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGCCTGGT GAAACCCGGCGGATCCCTGAGACTGTCCTGCGCCGC CTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGCCATGTCCTGGA TCCGGCAGGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTG GCCACCATCTCCTCCGGCGGCAGCTTCACCTACTACC CCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGG ACAACGCCAAGAAGTCCCTGTACCTGCAGATGAACTC CCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC CAGACGGGCCTCCACCGTCGTGGGAACCGACTTCGA TGTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCTC C
SEQ ID NO: 578	Cadena Pesada (DAPA mutaciones subrayadas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWIR QAPGKGLEWVATISSGGSFTYYPDSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRASTVVGTDVDFVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKCDKHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV <u>a</u> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL <u>a</u> APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 579	ADN cadena pesada	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGCCTGGT GAAACCCGGCGGATCCCTGAGACTGTCCTGCGCCGC CTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGCCATGTCCTGGA TCCGGCAGGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTG GCCACCATCTCCTCCGGCGGCAGCTTCACCTACTACC CCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGG ACAACGCCAAGAAGTCCCTGTACCTGCAGATGAACTC CCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC CAGACGGGCCTCCACCGTCGTGGGAACCGACTTCGA TGTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCTC CGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAAGTCTGCCC TGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTCCCCGAGCCCGT GACAGTGTCTGGAAGTCTGGGGCTCTGACTTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGC CTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCC AGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGA ACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAG

		TGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCC CCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTC CGTGTTCTGTTCCTCCCCCAAGCCCAAGGACACCTG ATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTG GTGGCCGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC AAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACC TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTC TCCAACAAGGCCCTGGCTGCCCCAATCGAAAAGACA ATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCA GGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGG CTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAACGGCCAGCCCGAGAACAATAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTAC AGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCA GGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGC CCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTG AGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 580	LCDR1 (Combinada)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 581	LCDR2 (Combinada)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 582	LCDR3 (Combinada)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 583	LCDR1 (Kabat)	RASQDIGSSLN
SEQ ID NO: 584	LCDR2 (Kabat)	ATSSLDS
SEQ ID NO: 585	LCDR3 (Kabat)	LQYASSPPT
SEQ ID NO: 586	LCDR1 (Chothia)	SQDIGSS
SEQ ID NO: 587	LCDR2 (Chothia)	ATS
SEQ ID NO: 588	LCDR3 (Chothia)	YASSPP
SEQ ID NO: 589	LCDR1 (IMGT)	QDIGSS
SEQ ID NO: 590	LCDR2 (IMGT)	ATS
SEQ ID NO: 591	LCDR3 (IMGT)	LQYASSPPT

SEQ ID NO: 592	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCRASQDIGSSLNWLQQ KPGKAIKRLIYATSSLDSGVPSRFSGRSGTDYTLTISSLQ PEDFVYYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 593	ADN VL	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCCG CCTCCGTGGGCGATAGAGTGACCCTGACCTGCCGGG CCTCCCAGGACATCGGCTCCTCCCTGAACTGGCTGCA GCAGAAGCCCGGCAAGGCCATCAAGCGGCTGATCTA CGCCACCTCCTCCCTGGACTCCGGCGTGCCCTCCCGG TTCTCCGGCTCTAGATCCGGCACCGACTACACCCTGA CCATCTCCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGTGGTGT CTACTGCCTGCAGTACGCCTCCAGCCCCCCCACCTTTG GCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 594	Cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCRASQDIGSSLNWLQQ KPGKAIKRLIYATSSLDSGVPSRFSGRSGTDYTLTISSLQ PEDFVYYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 595	ADN Cadena ligera	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCCG CCTCCGTGGGCGATAGAGTGACCCTGACCTGCCGGG CCTCCCAGGACATCGGCTCCTCCCTGAACTGGCTGCA GCAGAAGCCCGGCAAGGCCATCAAGCGGCTGATCTA CGCCACCTCCTCCCTGGACTCCGGCGTGCCCTCCCGG TTCTCCGGCTCTAGATCCGGCACCGACTACACCCTGA CCATCTCCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGTGGTGT CTACTGCCTGCAGTACGCCTCCAGCCCCCCCACCTTTG GCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTG GCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTCCCCCCCCAGCGACG AGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCC TGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGC AGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGGCGAGTGC
Humanizado 684E12 hIgG1 DAPA CysMab		
SEQ ID NO: 596	HCDR1 (Combinada)	GFTFSNFAMS
SEQ ID NO: 597	HCDR2 (Combinada)	TISTGGTYTYPPDSVKG
SEQ ID NO: 598	HCDR3 (Combinada)	RGYSGVDK

SEQ ID NO: 599	HCDR1 (Kabat)	SNFAMS
SEQ ID NO: 600	HCDR2 (Kabat)	TISTGGTYTYYPDSVKG
SEQ ID NO: 601	HCDR3 (Kabat)	RGYSGVDK
SEQ ID NO: 602	HCDR1 (Chothia)	GFTFSNF
SEQ ID NO: 603	HCDR2 (Chothia)	STGGTY
SEQ ID NO: 604	HCDR3 (Chothia)	RGYSGVDK
SEQ ID NO: 605	HCDR1 (IMGT)	GFTFSNFA
SEQ ID NO: 606	HCDR2 (IMGT)	ISTGGTYT
SEQ ID NO: 607	HCDR3 (IMGT)	TRRGYSGVDK
SEQ ID NO: 608	VH	EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSNFAMSWVRQAP GKGLEWVSTISTGGTYTYYPDSVKGRTISRDNNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARRGYSGVDKWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 609	ADN VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGAAA CCCGGCGGATCCCTGAGACTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCT TCACCTTCTCCAACCTTCGCCATGTCCTGGGTGCGGCAGGCT CCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCACCATCTCCACCG GCGGCACCTACACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCA GATTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTA CCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGT GTACTACTGTGCCAGACGGGGCTACTCAGGCGTGGACAA ATGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCTCC
SEQ ID NO: 610	Cadena Pesada (DAPA, CysMab mutaciones subrayadas)	EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSNFAMSWVRQAP GKGLEWVSTISTGGTYTYYPDSVKGRTISRDNNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARRGYSGVDKWGQGTTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVTVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPC DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
SEQ ID NO: 611	ADN cadena pesada	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGCCTGGT GAAACCCGGCGGATCCCTGAGACTGTCCTGCGCCGC CTCCGGCTTCACCTTCTCCAACCTTCGCCATGTCCTGGG TGCGGCAGGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGT CCACCATCTCCACCGGCGGCACCTACACCTACTACCC CGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGA

		CAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCC AGACGGGGCTACTCAGGCGTGGACAAATGGGGCCA GGGCACCACCGTGACAGTGTCTCCGctagcaccaaggg cccaagtgtgtttcccctggccccagcagcaagtctacttccggcgg aactgtgtccctgggttgctggtgaaggactacttcccctgtccgtg acagtgtcctggaactctggggctctgacttccggcgtgcacaccttc ccgccgtgtgcagagcagcggcctgtacagcctgagcagcgtggtg acagtgtccctccagctctctgggaacccagacctatatctgcaacgtg aaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtggagccc aagagctgcgacaagaccacacctgccccccctgccagctccaga actgtgtggaggggccttccgtgttctgttccccccaagcccaagga caccctgatgatcagcaggacccccgaggtgacctgctggtggtg ccgtgtcccacgaggaccagaggtgaagttcaactggtacgtggac ggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggagcag tacaacagcacctacaggggtggtgtccgtgtgacctgtgtcacca ggactggctgaacggcaaagaatacaagtgaaggtctccaacaag gccctggctgcccgaatcgaaaagacaatcagcaaggccaagggcc agccacgggagccccaggtgtacacctgccccccagccgggagga gatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggttcta cccctgtgatatcgccgtggagtgggagagcaacggccagcccgaga acaactacaagaccacccccagtgctggacagcgacggcagcttc ttcctgtacagcaagctgacctgggacaagtccaggtggcagcaggg caacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccact acaccagaagtccctgagcctgagccccgggaag
SEQ ID NO: 612	LCDR1 (Combinada)	KSGQSLLDSTGKTYLN
SEQ ID NO: 613	LCDR2 (Combinada)	LVSKLDS
SEQ ID NO: 614	LCDR3 (Combinada)	WQGFHFPQT
SEQ ID NO: 615	LCDR1 (Kabat)	KSGQSLLDSTGKTYLN
SEQ ID NO: 616	LCDR2 (Kabat)	LVSKLDS
SEQ ID NO: 617	LCDR3 (Kabat)	WQGFHFPQT
SEQ ID NO: 618	LCDR1 (Chothia)	GQSLLDSTGKTY
SEQ ID NO: 619	LCDR2 (Chothia)	LVS
SEQ ID NO: 620	LCDR3 (Chothia)	GTHFPQ
SEQ ID NO: 621	LCDR1 (IMGT)	QSLLDSTGKTY

La capacidad de los anticuerpos candidatos para mediar en la ADCC se evaluó utilizando un ensayo reportero ADCC sustituto. Las células JVM2 que expresaban CCR7 y CD20 se usaron como células objetivo. Las células JVM2 se lavaron y se resuspendieron a una densidad de 8×10^4 células/ml. Las células efectoras en este ensayo fueron una línea celular Jurkat que expresaba en forma estable CD16V158 y un reportero de luciferasa dependiente de NFAT (Jurkat-V158); la expresión de luciferasa es un sustituto de la señalización de ADCC canónica a través de CD16. Brevemente, las células Jurkat-V158

cultivadas en suspensión se centrifugaron para eliminar los medios agotados, el pellet se resuspendió en medios de ensayo y se ajustó a $1,6 \times 10^6$ células/ml células/ml. Se mezclaron volúmenes iguales de células efectoras y objetivo para obtener una mezcla maestra de células de modo de producir una relación de células objetivo a efectoras de 1: 5 o 1:20. Se diluyó una valoración de anticuerpo en medios de ensayo con una concentración superior final de 50 µg/ml en el pocillo de ensayo. Se agregaron 12,5 ul de solución de Ab a una placa de fondo redondo de 384 pocillos, y luego se agregaron 12,5 ul de la mezcla celular maestra. El anticuerpo y las células se mezclaron bien mediante pipeteo y se incubaron durante 4 horas a 37°C en CO₂ al 5%. Después de la incubación, se agregaron 15 µl de sustrato Bright Glo (Promega # G7572) a cada pocillo y se agitaron durante 5 min a temperatura ambiente a 1050 rpm. La señal luminiscente se leyó en el lector de placas Envision (Perkin Elmer).

Se incluyó un anticuerpo dirigido a CD20 como control positivo, y mostró una señalización sustancial de NFAT, medida por la actividad luciferasa. De manera similar, los anticuerpos anti-CCR7 candidatos indujeron una actividad significativa de ADCC (Figura 1).

La tabla a continuación resume los resultados representativos de los diversos formatos de anticuerpos ejecutados en el ensayo ADCC utilizando células JVM2 y Jurkat-V158.

Tabla 5: Actividad ADCC de anticuerpos anti-CCR7 no humanizados y humanizados.

	Actividad ADCC; IC50 (nM)
121G12 no humanizado CysMab	0,077
506E15 no humanizado CysMab	0,131
674J13 no humanizado CysMab	1,09
684E12 no humanizado CysMab	2,63
121G12 humanizado CysMab	Sí, pero ajuste de curva insuficiente
506E15 humanizado CysMab	0,054
674J13 humanizado CysMab	Sí, pero ajuste de curva insuficiente
CD20 control ADCC	0,132

El ensayo ADCC se realizó con un anticuerpo 506E15 no humanizado como un anticuerpo anti-CCR7 capaz de ADCC representativo a través de diversas líneas celulares con un rango de números de receptores CCR7 para determinar la densidad mínima del receptor necesaria para la actividad de ADCC y si hay un margen de seguridad suficiente sobre las células T CCR7+ normales. La siguiente tabla resume algunos de los datos.

Tabla 6: Actividad ADCC del anticuerpo 506E15 no humanizado.

Línea celular	Receptor CCR7 #	506E15 IC50 (nM)	506E15 (max RLU)
JVM2	66.500	0,046	5840
MOTN-1	64.600	0,077	5387
DEL	62.000	0,074	6480
CMLT-1	29.000	0,011	4400
SR786	27.800	0,011	4067
PEER	8700	0,038	3360
ALL-SIL	6200	0,008	3720
Jurkat V158	3400	0,004	3267
DND-41	1700	0,002	3733
Células T normales	< 1,5 K	agotamiento <i>in vivo</i>	n. a.

Los datos muestran que incluso niveles de receptor CCR7 muy bajos comparables con los niveles de receptor CCR7 en células T normales eran suficientes para permitir una actividad significativa de ADCC. La ADCC también se evaluó utilizando un ensayo de viabilidad de cocultivo de células NK con células cancerosas CCR7+, y se recolectaron hallazgos similares (no se discuten aquí).

Esto se ajusta a la observación descripta a continuación de que el agotamiento de las células T se observó *in vivo*, y se encontró que era en función del mecanismo de ADCC. Estos hallazgos demuestran que la modalidad ADCC no es adecuada para CCR7 desde una perspectiva de seguridad. Como consecuencia, todos los candidatos se cambiaron al formato Fc silencioso (DAPA) para mejorar la seguridad general en el objetivo.

El ensayo reportero *in vitro* de ADCC se repitió, y confirmó la falta de actividad de ADCC para las versiones mutadas Fc DAPA de los anticuerpos anti-CCR7 no humanizados (Figura 2).

Ejemplo 3: Caracterización bioquímica de anticuerpos.

Afinidades de anticuerpos anti-CCR7 a CCR7.

La afinidad de diversos anticuerpos y ADC a CCR7 y sus ortólogos de especies se determinó usando FACS. Las IgG purificadas se valoraron para determinar los valores de EC50 para la unión a CCR7 expresado en la superficie celular.

Para este propósito, las células positivas para CCR7 se recolectaron (las células adherentes se desprendieron con Accutase), se lavaron dos veces con tampón FACS (PBS/3% FCS/0,02% de azida sódica) y se diluyeron hasta aproximadamente 2×10^6 células/ml en tampón FACS. Todos los pasos posteriores se realizaron en hielo para evitar la internalización del receptor. Se transfirieron 100 μ l de suspensión celular/pocillo a placas de 96 pocillos con fondo en U (Falcon). Se incubaron 2×10^5 células/pocillo con una dilución en serie de las concentraciones de anticuerpos del anticuerpo de interés anti-CCR7 que abarcó varios registros, comenzando a un máximo de 100 nM durante 60 minutos a 4°C, agitando suavemente. Después de la incubación, las células se centrifugaron (1200 rpm, 2 min, 4°C) y se lavaron tres veces con tampón FACS. Se añadió un anticuerpo de detección anti-hFc gamma-APC (Jackson ImmunoResearch) conjugado con fluoróforo a 1:400, y las muestras se incubaron durante 1 h en hielo en la oscuridad, agitadas suavemente. Después de un lavado final, las células se resuspendieron en 100 μ l de tampón FACS que contenía 0,2 μ g/ml de DAPI, seguido de una lectura en la máquina de citometría de flujo (BD LSRFortessa Cell Analyzer; número de catálogo 647177). La media de intensidad de fluorescencia (MFI) de las

células individuales vivas se calculó en Flowjo 10.0.8 y se exportó a Graphpad Prism6 para la determinación de EC50.

La selectividad se evaluó midiendo las afinidades de unión aparentes a los pares de células isogénicas diseñadas para sobreexpresar CCR7, así como las líneas celulares que expresaban parálogos de CCR7, por ejemplo, CCR9, CCR6, CXCR4 y CCR8. Todos los anticuerpos anti-CCR7 se unen de manera específica solo a las células que expresan CCR7, como se muestra en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7: Unión de diversos anticuerpos anti-CCR7 a células que expresan CCR7.

En un experimento similar, los anticuerpos se evaluaron para establecer la reactividad

	Unión FACS aparente (a 5ug/ml)			
Anticuerpo humanizado CysMab (Fc tipo salvaje)	121G12	506E15	674J13	684E12
Células NIH3T3	Sin unión	Sin unión	Sin unión	Sin unión
NIH3T3.hCCR7	Unión	Unión	Unión	Unión
Células PF382 (CCR7-/- CCR9+/ CCR6+)	Sin unión	Sin unión	Sin unión	Sin unión
HEK293-CXCR4	Sin unión	Sin unión	Sin unión	Sin unión
CHO-CCR8	Sin unión	Sin unión	Sin unión	Sin unión

10 cruzada utilizando conjuntos de líneas celulares pareadas isogénicas diseñadas (serie NIH3T3) y células T CD4+, que se purificaron a partir de varios lotes de PBMC de donantes sanos, así como de macacos, ratas Wistar y ratones CD-1. Se encontró que todos los anticuerpos se unían específicamente a CCR7 humano y de macaco con afinidades aparentes similares, como se muestra en las Tablas 8 y 9 a continuación. Solo el anticuerpo 121G12 no humanizado es
15 reactivo cruzado con roedor.

Tabla 8: Reactividad cruzada de diversos anticuerpos anti-CCR7 no humanizados.

	Afinidad FACS aparente; EC50 (nM)			
Anticuerpo no humanizado CysMab	121G12	506E15	674J13	684E12
Células T CD4+ humanas	22-30	4,6-9,7	0,39-1,4	n. d.
Células T CD4+ macaco	5.8-12	6,6	0,45	n. d.

Células T CD4+ ratón	48–51	Sin unión	Sin unión	n. d.
Células T CD4+ rata	18–31	Sin unión	Sin unión	n. d.
NIH3T3.humano CCR7	1,3	n. d.	3,6	>30
NIH3T3.macaco CCR7	1,3	n. d.	n. d.	Unión
NIH3T3.ratón CCR7	2,5	Sin unión	Sin unión	Sin unión
NIH3T3.rata CCR7	2,4	Sin unión	Sin unión	Sin unión
Células cancerosas Jeko–1 (CCR7+)	1,5	n. d.	n. d.	12

Tabla 9: Reactividad cruzada de diversos anticuerpos Anti-CCR7 humanizados.

	Afinidad FACS aparente; EC50 (nM)			
Anticuerpo CysMab humanizado	121G12	506E15	674J13	684E12
Células T CD4+ humanas	30–34	7,8–11	0,87–2,7	6,7
Células T CD4+ macaco	12	7	0,5	n. d.
NIH3T3.humano CCR7	1	n. d.	n. d.	n. d.
NIH3T3.macaco CCR7	0,9	n. d.	n. d.	n. d.

A fin de determinar el impacto de la densidad del receptor sobre la afinidad aparente y, por lo tanto, la contribución que la avidéz hace a la unión celular del anticuerpo, se realizaron experimentos de valoración de FACS en líneas celulares de cáncer que expresaban CCR7 humano con niveles de expresión variados, y células T derivadas de PBMC CCR7 positivo normales. La cuantificación del receptor se realizó a través de FACS utilizando microesferas de Bangs Laboratories como estándares de conteo y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados ejemplares se muestran en la Tabla 10 a continuación.

Tabla 10: Contribución de la avidéz a la afinidad aparente en la correlación con la densidad del receptor.

		Afinidad FACS aparente; EC50 (nM)			
Anticuerpo CysMab.DAPA humanizado	Densidad receptor CCR7	121G12	506E15	674J13	684E12
Células NIH3T3.hCCR7	>1.000.000	2,5	1,8	0,64	n. d.

Células cancerosas DEL	~100.000	1,78	3,09	0,47	n. d.
Células T CD4+ humanas	<2000	~30	~10	~2	~7

Todos los anticuerpos anti-CCR7 muestran una contribución sustancial de la avidez a la afinidad aparente, y la fuerza de unión disminuyó en correlación con la densidad del receptor. Especialmente, el 121G12 muestra una unión significativamente más débil en las células que expresan CCR7 bajo como lo representan las células T CD4+ normales en comparación con las células del cáncer DEL representativas de la indicación.

La afinidad relativamente débil de especialmente 121G12, que muestra el efecto de avidez más fuerte entre los anticuerpos anti-CCR7, es óptima para utilizar la diferencia de densidad de receptor entre las células normales y cancerosas como una manera de sesgar la unión del anticuerpo a las células cancerosas.

Unión a hCCR7 recombinante en ELISA.

La unión y la afinidad también se evaluaron en un ensayo sobre la base de ELISA utilizando CCR7 recombinante (Origene # TP306614). Las placas Maxisorp™ de 384 pocillos (Thermo Nunc) se recubrieron con 3,5 µg/ml de CCR7 recombinante diluido en PBS. Después de bloquear con BSA al 3% (albúmina de suero bovino, conforme a sus siglas en inglés) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, lavar las placas 3x con PBS-T (Tween 20 al 0,01% en PBS), los anticuerpos primarios se agregaron en una dilución en serie y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo, y los anticuerpos unidos se detectaron mediante incubación con gamma anti-hFc 1:5000 conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, conforme a sus siglas en inglés; Jackson ImmunoResearch, Nro. de cat. 115-035-098) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de lavado con PBS-T, y luego, la adición del sustrato SureBlue Peroxidase (KPL, # 52-00-03). Después de 15 minutos, se registró la absorbancia a 650 nM y se analizó en GraphPad Prism6.

Todos los anticuerpos anti-CCR7 evaluados son capaces de unirse a hCCR7 recombinante (Tabla 11; Figura 3).

Tabla 11: Afinidad de unión de anticuerpos anti-CCR7 humanizados a hCCR7 recombinante.

Anticuerpo CysMab humanizado	Afinidad, Kd (nM)
121G12.DAPA	0,677
506E15.DAPA	5,731

674J13.DAPA	0,006
-------------	-------

Unión a FabGraft dual.

Se realizó un ELISA FabGraft para evaluar la unión a un espacio de epítipo mínimo, que comprende el extremo N-terminal y EC2 de CCR7. En resumen, las placas Maxisorp™ de 384 pocillos (Thermo Nunc) se recubrieron con 5 µg/ml de FabGraft. De lo contrario, se siguieron las instrucciones genéricas del protocolo ELISA como se describió anteriormente. Todos los anticuerpos anti-CCR7 son capaces de unirse al FabGraft dual como se muestra en la Tabla 12 a continuación.

Tabla 12: Afinidad de unión de los anticuerpos anti-CCR7 humanizados a FabGraft.

Anticuerpo CysMab humanizado	ELISA; Kd (nM)
121G12.DAPA	0,023
506E15.DAPA	0,025
674J13.DAPA	0,023

ELISA con dependencia de pH con VLP.

Se sabe que CCL19 unido a CCR7 internaliza el complejo receptor-ligando. Sin embargo, mientras que CCR7 se recicla de nuevo a la superficie celular, CCL19 se clasifica según el lisosoma para degradación, de modo de mostrar el destino opuesto para CCR7 endocitado y su ligando (Otero et al., J Immunol 2006; 177: 2314–2323). Para un ADC anti-CCR7 exitoso, es preferible que el anticuerpo se comporte de manera similar al ligando, por ejemplo, se internalice rápidamente, pero no se recicle nuevamente fuera con CCR7. Para lograr esto, nos aseguramos de seleccionar anticuerpos dependientes del pH, que mostrarían una unión más débil a CCR7 en condiciones de pH bajo.

Para evaluar la dependencia del pH de los anticuerpos anti-CCR7, se realizó un ELISA utilizando partículas de tipo viral (VLP) que expresan CCR7. En resumen, las placas Maxisorp™ de 384 pocillos (Thermo Nunc) se recubrieron con 25 µg/ml de VLP. Los anticuerpos primarios se incubaron en tampón de pH 5,8 (1:1; dH2O: tampón de citrato 0,1 M, NaCl 150 mM) o en tampón de pH 7,4. De lo contrario, se siguieron las instrucciones genéricas del protocolo ELISA como se describió anteriormente.

Entre una serie de variantes de humanización para cada candidato, la comparación de la unión del anticuerpo a pH neutro (7,4) y ácido (5,8) mostró que todos los anticuerpos candidatos para CCR7 tienen una afinidad mejorada a pH 7,4 (Tabla 13). Las siguientes

entidades fueron elegidas en función de su superior dependencia del pH, entre otras características.

Tabla 13: Dependencia del pH de los anticuerpos anti-CCR7 humanizados para las VLP que expresan CCR7.

Anticuerpo CysMab humanizado	ELISA; Kd (nM)		
	Tampón pH 7,4	Tampón pH 5,8	Cambio en veces (pH 5,8/7,4)
121G12	0,1411	0,5207	4
506E15	0,0571	0,4942	9
674J13	0,0162	0,1657	10
684E12	0,0374	0,5041	13

Ensayo de β Arrestina.

Para determinar la funcionalidad de los anticuerpos anti-CCR7, el ensayo de β -Arrestina se realizó utilizando el equipo de detección de destello PathHunter Flash Detection Kit, de DiscoverX (# 93-0247), o bien en modo agonista para la evaluación de la función agonista, o en modo antagonista para la evaluación de la función antagonista.

En el modo agonista, CHO- β pin-hCCR7 (línea celular hecha por DiscoverX que expresa hCCR7 etiquetado con ProLink, β -arrestina-EA) se sembraron a 8×10^4 células/pocillo en 20 μ l/pocillo en medio de crecimiento (medio de Ham F-12/Glutamax; Invitrogen + 10% FBS + 0,5 mg/ml G418 + 0,2 mg/ml higromicina B; Invitrogen + 5 μ g/ml de blasticidina; Gibco) con Dox 100 ng/ml en placas de 384 pocillos, cubiertas con tapas metálicas, incubadas a 37°C, 5% CO₂ durante la noche. Al día siguiente, se realizó una dilución en serie de una solución de trabajo 5x en 1x de tampón de ensayo (HEPES 20 mM/BSA al 0,1%/HBSS 1x a pH 7,4) con anticuerpos de prueba o control positivo, utilizando el ligando hCCL19 (R&D, 361/MI -025/CF). Se añadieron 5 μ l de la solución de trabajo 5x de anticuerpos o ligando a cada pocillo, se centrifugaron brevemente y se incubaron a 37°C/5% de CO₂ durante 2 h. Después de la incubación, se agregaron 25 μ l de reactivo de detección a cada pocillo, se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad mientras se agitaban durante 20 min. Luego, la señal de luminiscencia para la actividad enzimática se midió en la máquina Envision. Finalmente, se analizó la actividad enzimática utilizando Excel.

En el modo antagonista, las células CHO–flpin–hCCR7 se sembraron como se describió anteriormente. Al día siguiente, se preparó una solución de trabajo 6x ($0,5 \mu\text{M} \times 6 = 3,0 \mu\text{M}$) en 1x de tampón de ensayo para cada anticuerpo de prueba o control positivo MAB197 (anticuerpo de referencia R&D; antagonista de ligando) o control negativo hIgG. Se añadieron 5 μl de la solución de trabajo 6x de anticuerpos o controles a cada pocillo, se centrifugaron brevemente y se incubaron a $37^\circ\text{C}/5\%$ de CO_2 durante 30 minutos. Durante la incubación, se realizaron diluciones en serie de una solución de trabajo 6x en 1x de tampón de ensayo para hCCL19. Después de la incubación, se agregaron 5 μl de la solución de trabajo 6x de hCCL19 a cada pocillo, se centrifugaron brevemente y se incubaron a $37^\circ\text{C}/5\%$ de CO_2 durante 90 min. Después de la incubación, se agregaron 25 μl de reactivo de detección a cada pocillo, se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad mientras se agitaban durante 20 min. Luego, la señal de luminiscencia para la actividad enzimática se midió en la máquina Envision y se analizó en Excel.

Ninguno de los anticuerpos anti–CCR7 parentales mostró actividad en el modelo agonista (Figura 4A). Sin embargo, cuando se ejecutaron en formato antagonista, 506E15 y 121G12 se identificaron como antagonistas fuertes, por ejemplo, anticuerpos bloqueadores de ligando (Figuras 4B, 4C). 674J12 es un anticuerpo neutral que no bloquea el ligando. 684E12 es un antagonista débil.

Ensayo de competición FACS con ligando.

Para confirmar la competencia de anticuerpos con el ligando CCR7, el ensayo FACS se realizó en presencia de una concentración en exceso de ligando. El ensayo FACS se realizó como se describe anteriormente. Se realizaron algunos cambios en el protocolo, por ejemplo, CCL19 se mantuvo a una concentración constante de $1 \mu\text{M}$, mientras que el anticuerpo primario se aplicó simultáneamente a las células DEL que abarcaban varios registros, comenzando a un máximo de 100 nM. Después de un tiempo de incubación de 30 minutos en tampón FACS helado, las células se lavaron, se aplicó un anticuerpo anti–hFc.PE secundario durante 15 minutos, y se determinó MFI como se describió anteriormente.

La Figura 5 muestra que el CysMab.DAPA 674J13 humanizado no se ve afectado por la presencia de un exceso de CCL19, lo que confirma su funcionalidad neutral. De hecho, CysMab.DAPA 121G12 y 506E15 humanizados tienen un fuerte impacto en su afinidad de unión por la presencia de un exceso de ligando.

Capacidades de internalización a través de líneas celulares con un rango de densidades de receptor.

Otro aspecto de un ADC anti-CCR7 exitoso es asegurar el uso óptimo de la distribución de expresión diferencial de CCR7. Como representante de las células que expresan CCR7 normales, se aislaron células T CD4 + a partir de PBMC de donantes sanos. Además, se eligieron varias líneas celulares de cáncer positivas para CCR7 que muestran un rango de densidades de receptor. Hemos elegido deliberadamente anticuerpos con afinidades de unión a FACS aparentes más débiles en las células T CCR7+, que en células cancerosas CCR7+. Además, el ensayo de pHrodo descrito aquí utiliza un marcador fluoróforo de bajo pH activado en los anticuerpos anti-CCR7, para evaluar si la captación de anticuerpos en las células, medida por fluorescencia, se correlaciona con la densidad del receptor. Es preferible minimizar la captación de anticuerpos en las células normales para maximizar la ventana terapéutica.

Brevemente, se realizó el etiquetado de los anticuerpos anti-CCR7 en formato CysMab con maleimida-pHrodo (ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del fabricante, de modo de producir entidades DAR = 4 (relación de fármaco, por ejemplo, fluoróforo a anticuerpo). El ensayo FACS se realizó como se describe anteriormente. Se hicieron algunos cambios al protocolo, por ejemplo, para permitir la internalización, el anticuerpo primario se incubó en una concentración de 5 µg/ml con células a 37°C en medio de cultivo durante 6 h, luego se lavó con tampón FACS helado que contenía azida sódica para detener la reacción.

La Tabla 14 a continuación resume las capacidades de internalización de tres anticuerpos en un panel de líneas celulares. Se usó un anticuerpo no dirigido etiquetado con pHrodo como control, y se encontró que hasta 400 MFI constituye un ruido de fondo de señal, por ejemplo, captación de conjugado de anticuerpo no mediada por el objetivo. Los datos muestran que los tres anticuerpos anti-CCR7 requieren niveles de receptor CCR7 en el rango que es típico para la mayoría de las líneas de cáncer CCR7+, por ejemplo, por encima de 20.000 receptores, para internalizar y acumular eficientemente la materia conjugada, mientras se conservan las células T CD4+ normales.

Tabla 14: Capacidades de internalización de diversos anticuerpos anti-CCR7.

Línea celular	Números de receptor	pHrodo (6h MFI)		
		121G12.CysMab. DAPA humanizado	506E15.CysMab. DAPA humanizado	617J13.CysMab. DAPA humanizado

Células T CD4+	2000	278	429	402
JVM3	8717	148	238	146
CMLT1	19583	301	465	561
Jeko-1	28852	450	908	1389
Mec2	50840	1340	3089	3004
L1236	61602	1237	3126	5824
MOTN1	84200	1026	2899	2539
DEL	110685	1913	3058	3777
MJ	111121	1649	3870	3259
KE97	152093	1567	2723	4416
L540	167549	6836	16117	11800

Agrupación de epítomos utilizando el sistema Octet Red96.

La agrupación de epítomos de anticuerpos parentales anti-hCCR7 se realizó utilizando el sistema Octet Red96 (ForteBio, USA), que mide la interferometría de la biocapa (BLI, conforme a sus siglas en inglés). El andamiaje de inmunógeno CCR7 se biotiniló a través de un AviTag™ utilizando la biotina ligasa de BirA de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Avidity, LLC, USA, Nro. de cat. BirA500). El andamio de inmunógeno biotinilado se cargó a 1,5 µg/ml en sensores de estreptavidina previamente equilibrados (ForteBio, USA). Luego, los sensores se transfirieron a una solución que contenía 100 nM de anticuerpo A en un tampón de cinética 1X (ForteBio, USA). Los sensores se lavaron brevemente en tampón de cinética 1X y se transfirieron a una segunda solución que contenía 100 nM de anticuerpo competidor. La cinética de unión se determinó a partir de datos sin procesar utilizando el soporte lógico de análisis de sistemas Octet Red96 (Versión 6.3, ForteBio, USA). Los anticuerpos se evaluaron en todas las combinaciones por pares, como Anticuerpo A y como anticuerpo competidor.

Tabla 15: Resultados de la agrupación de anticuerpos.

Agrupación	Anticuerpo
1	684E12; MAB197

2	674J13
3	506E15
4	121G12

Mapeo de epítomos usando mutaciones CCR7.

Se llevó a cabo un mapeo de epítomos adicional utilizando líneas celulares CCR7 mutantes. Se generaron líneas celulares NIH/3T3 que expresaban variantes mutadas de CCR7 humano. Se introdujeron mutaciones en posiciones específicas para intercambiar el residuo de CCR7 humano al correspondiente residuo de CCR7 murino. Las mutaciones generadas incluyeron D35E, F44Y, L47V, S49F, D198G, R201K, S202N, S204G, Q206D, A207T, M208L, I213V, T214S, E215A y H216Q. Las construcciones de plásmidos CCR7 mutantes se generaron por mutagénesis dirigida al sitio y se introdujeron en células NIH/3T3 para producir líneas celulares de expresión estable. La unión específica de los anticuerpos candidatos a cada línea celular CCR7 mutante se evaluó mediante citometría de flujo. Las células se enjuagaron a fondo con PBS y se trataron con Accutase (Millipore # SCR005) para levantar las placas de crecimiento y se resuspendieron a aproximadamente 1×10^5 células/90 μ l en 1x tampón FACS (2% FBS + 0,1% NaN₃ en PBS). En una placa con fondo en U de 96 pocillos, se presembraron 10 μ L de solución de anticuerpo 10x en tampón FACS, y se agregaron 90 μ L de suspensión celular. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C, se lavaron 1x con PBS frío y se resuspendieron en 100 μ L de 1:500 de anticuerpo secundario 1x tampón FACS (IgG antihumano de cabra F(ab')₂ conjugado con alofococianina, específico para Fc γ ; Jackson ImmunoResearch, Cat. # 109–136–098). Después de una incubación adicional durante 15 minutos a 4°C, las células se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 100 μ l de tampón 1xFACS + 4 μ g/ml de yoduro de propidio (Life Technologies, Nro. de catálogo P3566). La media geométrica de intensidad de fluorescencia se calculó en células individuales vivas utilizando FlowJo y se representó como % de media de intensidad de fluorescencia geométrica WT CCR7.

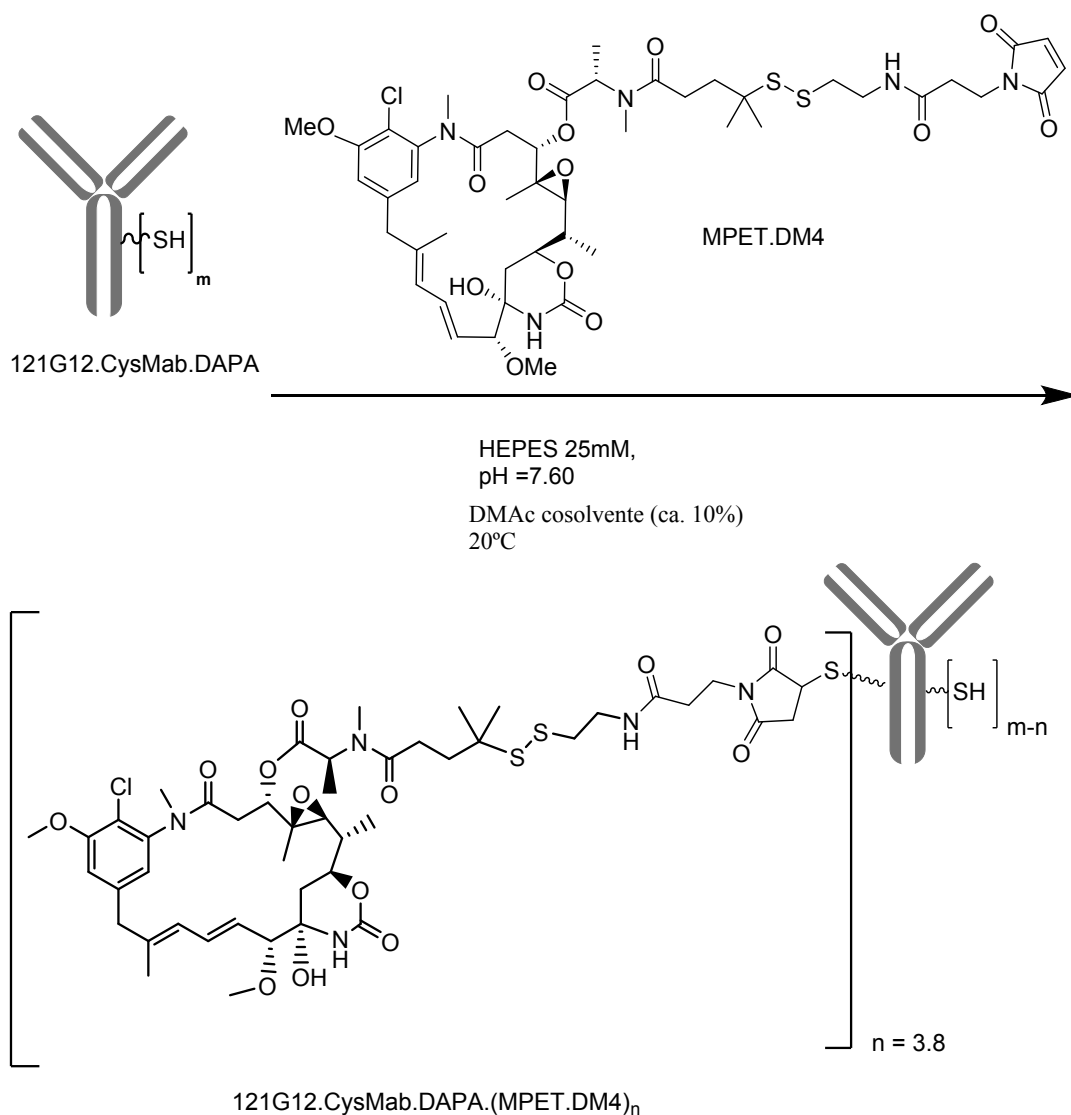
Las afinidades en función de EC₅₀ para CCR7 mutado puntual muestran que todos los anticuerpos evaluados tienen diferentes perfiles de unión, lo que implica una utilización diferente de un epítopo conformacional (Figura 6). De todos los anticuerpos mostrados, 506E15 tiene el patrón de unión más similar a MAB197, por ejemplo, ambos muestran una caída significativa en la afinidad de unión cuando los residuos F44 o L47 en el término N de CCR7 están mutados, pero no, cuando M208 o I213 en el bucle EC2 están mutados. 121G12 y

674J13 parecen utilizar un conjunto diferente de puntos de contacto cruciales dentro del espacio del epítopo conformacional, ya que difieren de MAB197 en por lo menos 4 de las 8 mutaciones puntuales evaluadas.

Ejemplo 4: Generación y caracterización de conjugados de fármaco con anticuerpo de CCR7.

En la siguiente sección, uL y µL se usan indistintamente para referirse a microlitro. De manera similar, uM y µM se usan indistintamente para referirse a microMolar; y um se usa para referirse al micrómetro.

Ejemplo 4A: Preparación de conjugado de fármaco y anticuerpo 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4.



Conjugación de 121G12.CysMab.DAPA y MPET.DM4 purificados:

El material de partida fue el anticuerpo 121G12.CysMab.DAPA a 127 mg/ml (OD280 con un coeficiente de extinción de 13,7 para una solución de IgG de 10 mg/ml) en tampón de clorhidrato de histidina 10 mM. A 7,9 ml de anticuerpo (1003 mg) se agregaron 16 ml de fosfato de sodio 0.5M pH 8 (Teknova S1280), el pH se verificó como > 7, luego el anticuerpo se absorbió en 100,3 ml de resina de proteína A RMP (GE Healthcare 1–223BPO)/I durante 25 minutos con agitación suave a temperatura ambiente. La resina, cargada a 10 mg de Ab/ml de lecho, se lavó con 15 volúmenes de lecho de tampón PBS 1x (Hyclone SH30256.02) mediante filtración al vacío a través de una unidad de filtro de 0,2 μ m de la parte superior de una botella (Nalgene 567–0020), y luego se resuspendió en 100,3 ml de 1x PBS para dar una suspensión al 50%.

A la suspensión se agregaron 4329 μ l de cisteína 0,5 M (Sigma G121–03) formulada en fosfato 0,5 M, pH 8, a la que se le había añadido NaOH (Alfa Aesar A16037) en una relación de 13,6 g/L. La suspensión se agitó ocasionalmente a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego se lavó por filtración al vacío a través de una unidad de filtro de 0,2 μ m en la parte superior de una botella con 50 volúmenes de lecho de 1xPBS en por lo menos 10 ciclos de filtración y adición. La resina lavada se resuspendió en 100,3 ml de 1xPBS (suspensión al 50%) y se agregaron 1003 μ l de CuCl_2 100 μ M (Aldrich 751944) (Cu^{2+} 500 nM netos) para iniciar la reoxidación. La reoxidación del anticuerpo se evaluó eliminando una parte alícuota de 30 μ l de la suspensión, agregando 1 μ l de una carga de 20 mM de una maleimida de referencia (Ejemplo 3, página 110 del documento WO2015/095301), que se sabe que cambia el pico de anticuerpo por RPLC, mezclando durante 1 minuto, centrifugando a 7000 xg durante 10 segundos, eliminando el sobrenadante, agregando 60 μ l de tampón de elución IgG Thermo (Thermo Scientific 21009), centrifugando a 14.000 xg durante 10 segundos, muestreando el sobrenadante y analizando los productos mediante RPLC de la siguiente manera: 2 μ l de muestra se inyectaron en una columna Agilent PLRP–S de 4,6 x 50 mm calentada (80°C) (partículas de 5 μ m, tamaño de poro de 4000 Å) equilibrada a ácido trifluoroacético al 0,1% en CH_3CN al 29%/agua (Millipore TX1280P–1, Burdick y Jackson 407–4) funcionando a 1,5 ml/min. La columna se eluyó con un gradiente de 5 minutos a 44,5% de CH_3CN /agua que se mantuvo durante 1,9 minutos, y los picos se detectaron a 280 nm. El tiempo óptimo para la conjugación se define como el tiempo en el cual el pico principal del producto es máximo, los picos de elución posteriores se minimizan, y los picos de elución anteriores aún no están aumentando.

Cuando el ensayo de RPLC indicó que la reoxidación era óptima (en este caso, 60 minutos), se agregaron 3010 µl de una carga de 20 mM de MPET.DM4 en DMSO, y la suspensión se agitó ocasionalmente a temperatura ambiente durante 30 minutos. La suspensión se lavó luego con 20 volúmenes de lecho de 1xPBS en por lo menos 10 ciclos de filtración y adición.

La suspensión se transfirió luego a una columna fritada (Pierce 7375021), eluida previamente con 0,5 volúmenes de lecho de tampón de elución Thermo IgG (desechado), luego se eluyó con 2 volúmenes de lecho del mismo tampón. El eluato completo (201 ml) se neutralizó con 20,1 ml de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8, y luego se concentró a 60 ml utilizando concentradores de centrifugado (Amicon UFC905024) a 3000 x g. El concentrado se aplicó luego a columnas de intercambio de tampón 24 x PD-10 (GE Healthcare 17-0851-01) equilibradas a 1xPBS, cargando 2,5 ml de concentrado y eluyendo con 3,5 ml de 1xPBS según las indicaciones del fabricante.

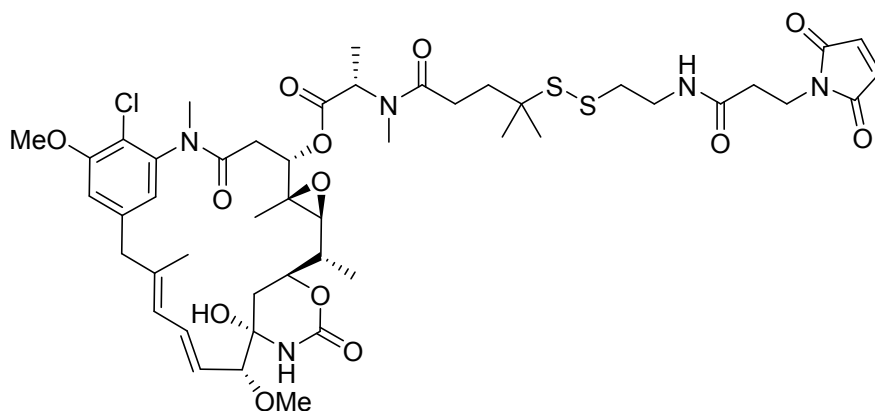
Para los estudios de estabilidad, el material se combinó con un lote preparado de forma idéntica para proporcionar 2 gramos de material de partida. El material combinado se dializó extensivamente (matraz Slidealyzer, Thermo Scientific 87762) contra un tampón de cloruro de histidina 10 mM pH 5 (histidina de JTBaker 2080-05), se concentró a ~ 30 mg/ml, luego se agregaron sacarosa (Millipore 1.00892.1003) y Tween 20 (JTBaker 4116-04) a 240 mM y 0,02% (v/v), respectivamente. El material en exceso al requerido para los estudios de estabilidad se intercambió nuevamente a 1xPBS. Las muestras se dividieron en alícuotas y se congelaron instantáneamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Las concentraciones finales fueron de 23,9 mg/ml para el material formulado para pruebas de estabilidad, y de 18,9 mg/ml, para el material formulado en 1xPBS.

Los resultados analíticos sobre las muestras resultantes son los siguientes:

Parámetro	Muestra estabilidad	Muestra 1xPBS
Concentración (mg/ml)	23,9	18,9
Pirógeno (EU/ml)	0,1	0,05
% agregado	<1	<1
DAR	3,79	3,79

Métodos analíticos: la concentración se determinó mediante OD280 con un coeficiente de extinción de 13,7 para una solución de IgG de 10 mg/ml. El pirógeno se determinó utilizando el ensayo Kinetic QCL (Lonza Walkersville 50–650H) leído en un lector de placas TECAN Safire. El porcentaje de agregados se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica en un protector Shodex KW–G (Thomson Instrument Company, nro. de cat. 6960955) y en la columna KW–803 (TIC, cat. # 6960940) equilibrada con una fase móvil [Tris a 20 mM, ~pH 7,65 (preparada previamente con Tris 10 mM pH 7,4, Tris 10 mM pH 8), NaCl 200 mM, azida sódica al 0,02%], con adquisición de datos a 280 nm. Se preparó una parte alícuota de la muestra para la determinación de DAR diluyendo la muestra a 2 mg/ml en 1xPBS, desglucosilando la muestra con PNGasaF (internamente) durante 10 minutos a 50°C, eliminando la PNGasaF uniéndose a la proteína A, lavando con 1xPBS y elución con ácido fórmico al 1%. Luego, la muestra se inyectó en una columna PLRP–S de 2,1x50 mm (partículas de 8 µm, poros de 1000 Å), se equilibró para ácido fórmico al 0,1% en CH₃CN al 20%/agua (Invitrogen) a 0,5 ml/min. La columna se lavó a 20% de CH₃CN/agua durante 3 minutos, luego se eluyó con un gradiente de 0,1 minutos a 0,1% de ácido fórmico y 90% de CH₃CN/agua, que se mantuvo durante 1,9 minutos. Los datos espectrales de masas se tomaron en un instrumento Agilent 1260 y se deconvolucionaron con el Análisis Cualitativo MassHunter B.05.00 en un rango de 110–180 kDa. Las áreas de los picos correspondientes a diversos estados DAR calculados se ponderaron de acuerdo con el DAR de cada pico, luego se sumaron, y el área ponderada del pico DAR4 se dividió por la suma de todos los picos ponderados para obtener el valor DAR.

Preparación de la carga útil del enlazador MPET.DM4:



Métodos analíticos.

A menos que se indique lo contrario, se usaron los siguientes métodos de HPLC y HPLC/MS en la preparación de los Intermediarios y los Ejemplos.

El análisis de LC/MS se realizó en un sistema Agilent 1200sl/6140.

Columna: Waters Acquity HSS T3 C18, 50 x 2,0, 1,8 um.

5 **Fase móvil: A) H₂O + 0,05% TFA; B: acetonitrilo + 0,035% TFA.**

Método de bomba:

Tiempo	A%	B%	Caudal (mL/min)
0	90	10	0,9
1,35	0	100	0,9
1,36	0	100	0,9
1,95	0	100	0,9
1,96	90	10	0,9
2,0	90	10	0,9

Detección: Matriz de diodo UV a190 nm – 400 nm.

Barrido MS: 200 – 1350 amu.

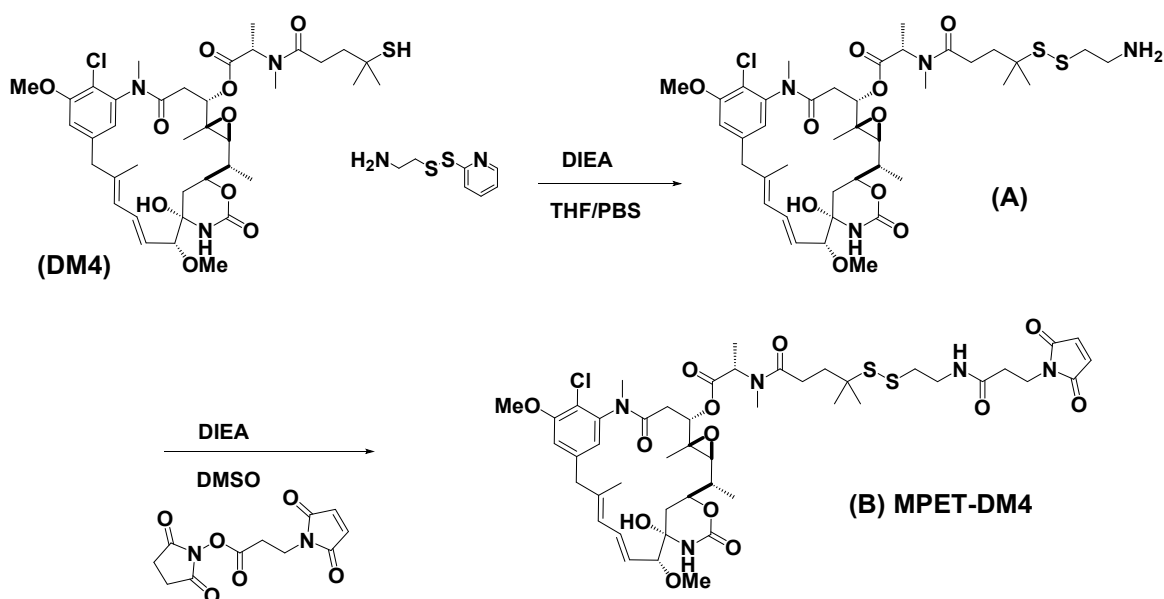
10 **ELSD: 60°C**

Parámetros de MS:

Polaridad	Positiva
Gas de secado	12
Presión de nebulizador	50
Temperatura gas de secado	350
Voltaje de capilar	3000

(14S,16S,32S,33S,2R,4S,10E,12E,14R)–86–chloro–14–hidroxi–85,14–dimetoxi–33,2,7,10–tetrametil–12,6–dioxo–7–aza–1(6,4)–oxazinana–3(2,3)–oxirana–8(1,3)–

15 bencenaciotetradecafano–10,12–dien–4–il N–(4–((2–(3–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)propanamido)etil)disulfanil)–4–metilpentanoil)–N–metil–L–alaninato



Etapa 1: Preparación de (14S,16S,32S,33S,2R,4S,10E,12E,14R)-86-cloro-14-hidroxi-85,14-dimetoxi-33,2,7,10-tetrametil-12,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il N-(4-((2-aminoetil)disulfanil)-4-metilpentanoil)-N-metil-L-alaninato.

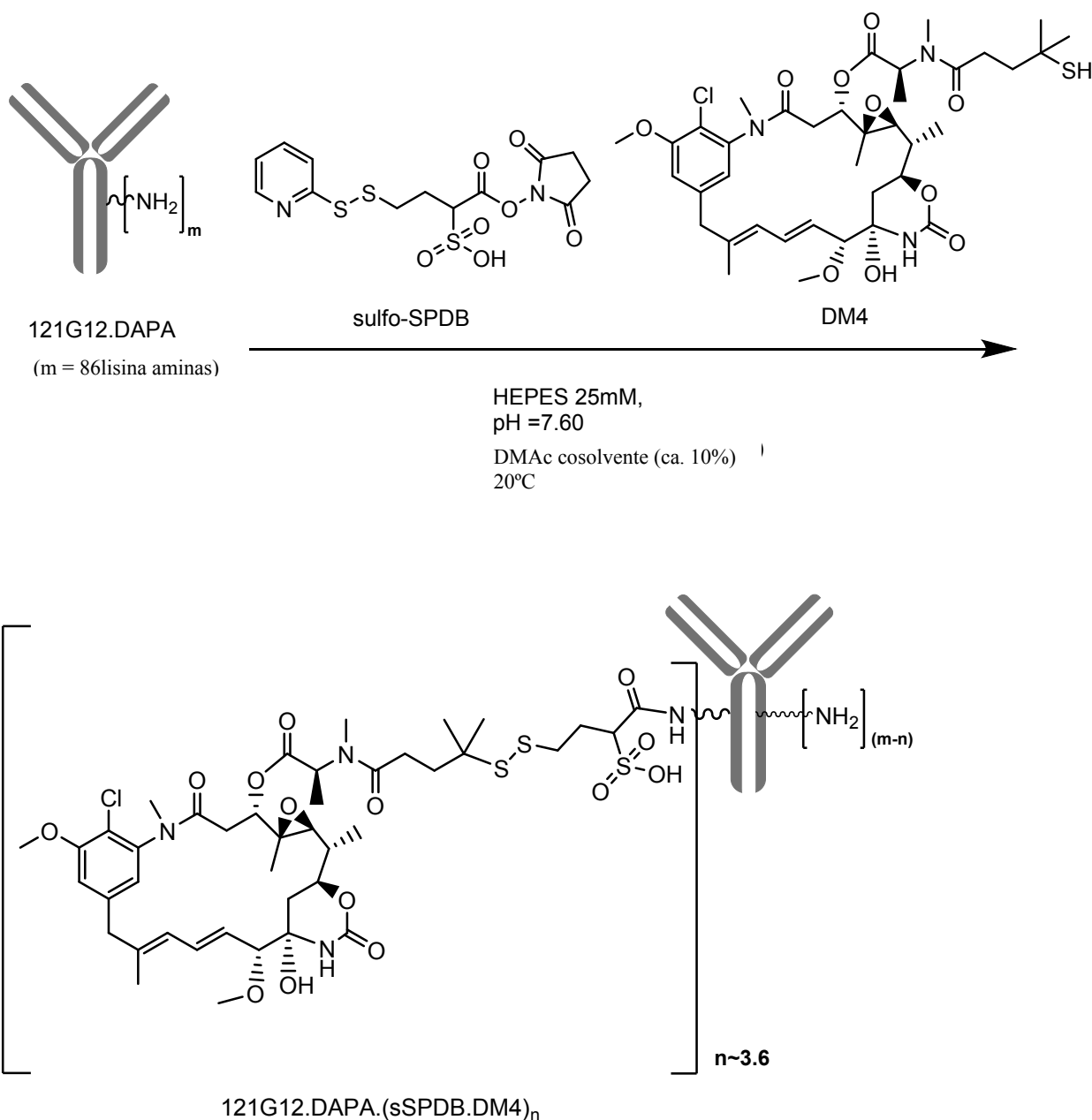
A DM4 (480 mg, 0,62 mmol) disuelto en tampón PBS (10,5 mL) y THF anhidro (21 mL) se agregaron 2-(piridin-2-ildisulfanil)etan-1-amina (151 mg, 0,68 mmol) y DIEA (0,27 mL, 1,54 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min y se concentró al vacío. El residuo acuoso se diluyó con CH₃CN (1 mL) y H₂O (2 mL) y se purificó por ISCO de fase inversa, eluido con 10-60% de acetonitrilo-H₂O con 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se liofilizaron a fin de obtener el producto deseado (555 mg, 93% de rendimiento). ¹H RMN (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ ppm 0,83 (s, 3 H) 1,21 (d, *J*=5,0 Hz, 3 H) 1,25 (s, 3 H) 1,28 (s, 3 H) 1,30 (d, *J*=5,0 Hz, 3 H) 1,45-1,55 (m, 3 H) 1,67 (s, 3 H) 1,84-1,88 (m, 1 H) 1,95 - 2,01 (m, 1 H) 2,14 (dd, *J*=5,0 y 15,0 Hz, 1 H) 2,37-2,43 (m, 1 H) 2,53-2,59 (m, 1 H) 2,64 (dd, *J*=10,0 y 15,0 Hz, 1 H) 2,82-2,89 (m, 5 H) 2,91 (d, *J*=10,0 Hz, 1 H) 3,16 (dd, *J*=5,0 y 10,0 Hz, 2 H) 3,20 (s, 3 H) 3,23 (d, *J*=10,0 Hz, 1 H) 3,35 (s, 3 H) 3,55 (d, *J*=5,0 Hz, 1 H) 3,58 (d, *J*=10,0 Hz, 1 H) 4,15-4,20 (m, 1 H) 4,64 (dd, *J*=5,0 y 10,0 Hz, 1 H) 5,43 (q, *J*=5,0 Hz, 2 H) 5,66 (dd, *J*=10,0 y 15,0 Hz, 1 H) 6,58 (dd, *J*=10,0 y 15,0 Hz, 1 H) 6,65 (d, *J*=10,0 Hz, 1 H) 6,66 (s, 1 H) 7,11 (bs, 1H) 7,28 (bs, 1H); MS *m/z* 855,3 (M+H). Tiempo de retención: 0,988 minutos.

Etapa 2: Preparación de (14S,16S,32S,33S,2R,4S,10E,12E,14R)-86-cloro-14-hidroxi-85,14-dimetoxi-33,2,7,10-tetrametil-12,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-

oxirana-8(1,3)-bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il N-(4-((2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)etil)disulfanil)-4-metilpentanoil)-N-metil-L-alaninato.

5 A (14S,16S,32S,33S,2R,4S,10E,12E,14R)-86-cloro-14-hidroxi-85,14-dimetoxi-33,2,7,10-tetrametil-12,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-bencenacicotetradecafano-10,12-dien-4-il N-(4-((2-aminoetil)disulfanil)-4-metilpentanoil)-N-metil-L-alaninato (555 mg, 0,57 mmol) disuelto en DMSO anhidro (7 mL) se agregaron 2,5-dioxopirrolidin-1-il 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoato (171 mg, 0,63 mmol) y DIEA (249 mL, 1,43 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de
10 reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 min y se neutralizó usando TFA. La mezcla se enfrió hasta 0°C con un baño de hielo, seguido de la adición de CH₃CN (2 mL) y H₂O (7 mL), y luego se purificó por ISCO de fase inversa, eluido con 10-70% de acetonitrilo-H₂O con 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se liofilizaron a fin de obtener el producto deseado (430 mg, 66 % de rendimiento). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃)
15 δ ppm 0,81 (s, 3 H) 1,23 (s, 3 H) 1,24 (s, 3 H) 1,25 (s, 1 H) 1,28 (d, J=5,0 Hz, 3 H) 1,31 (d, J=5,0 Hz, 3 H) 1,43-1,49 (m, 1 H) 1,61 (d, J=15,0 Hz, 1 H) 1,64 (s, 3 H) 1,81-1,87 (m, 1 H) 1,94 - 2,01 (m, 1 H) 2,19 (dd, J=5,0 y 15,0 Hz, 1 H) 2,30-2,36 (m, 1 H) 2,54 (t, J=5,0 Hz, 2 H) 2,61 (dd, J=10,0 y 15,0 Hz, 1 H) 2,70 (t, J=5,0 Hz, 2 H) 2,88 (s, 3 H) 3,00 (d, J=10,0 Hz, 1 H) 3,13 (d, J=10,0 Hz, 1 H) 3,21 (s, 3 H) 3,55 (s, 3 H) 3,45 (q, J=5,0 Hz, 2 H) 3,49 (d, J=5,0
20 Hz, 1 H) 3,62 (d, J=10,0 Hz, 1 H) 3,83 (t, J=5,0 Hz, 1 H) 3,98 (s, 3 H) 4,32 (m, 1 H) 4,80 (dd, J=5,0 y 10,0 Hz, 1 H) 5,28 (d, J=5,0 Hz, 1 H) 5,66 (dd, J=10,0 y 15,0 Hz, 1 H) 6,22 (bs, 1 H) 6,42 (dd, J=10,0 y 15,0 Hz, 1 H) 6,50 (s, 1 H) 6,63 (s, 1 H) 6,66 (d, J=10,0 Hz, 1 H) 6,70 (s, 2H) 6,83(s, 1H); MS m/z 988,3 (M+H-H₂O). Tiempo de retención: 1,145 minutos.

25 **Ejemplo 4B: Preparación de conjugado de fármaco y anticuerpo 121G12.DAPA.sSPDB.DM4.**



- 5 A una solución agitada de tampón 25 mM HEPES pH 7,6 (3 ml; estéril) y dimetilacetamida (DMAc; 0,12 ml) a 22°C, se agregó una solución (1,695 ml) de 121G12.DAPA; MW~ 145546 g/mol; 62 mg (0,426 µmol) en tampón de fosfato de potasio (10 mM, pH 6; estéril). Se agregó maitansinoide DM4 (2,42 mg (3,101 µmol) disuelto en 0,242 ml de DMAc. Se agregó enlazador sulfoSPDB (0,970 mg (2,386 µmol, corregido para el ensayo)
- 10 disuelto en 0,970 ml de DMAc. Después de 18 h, la mezcla de reacción se analizó para determinar la finalización de la reacción por SEC–UV y HPLC.

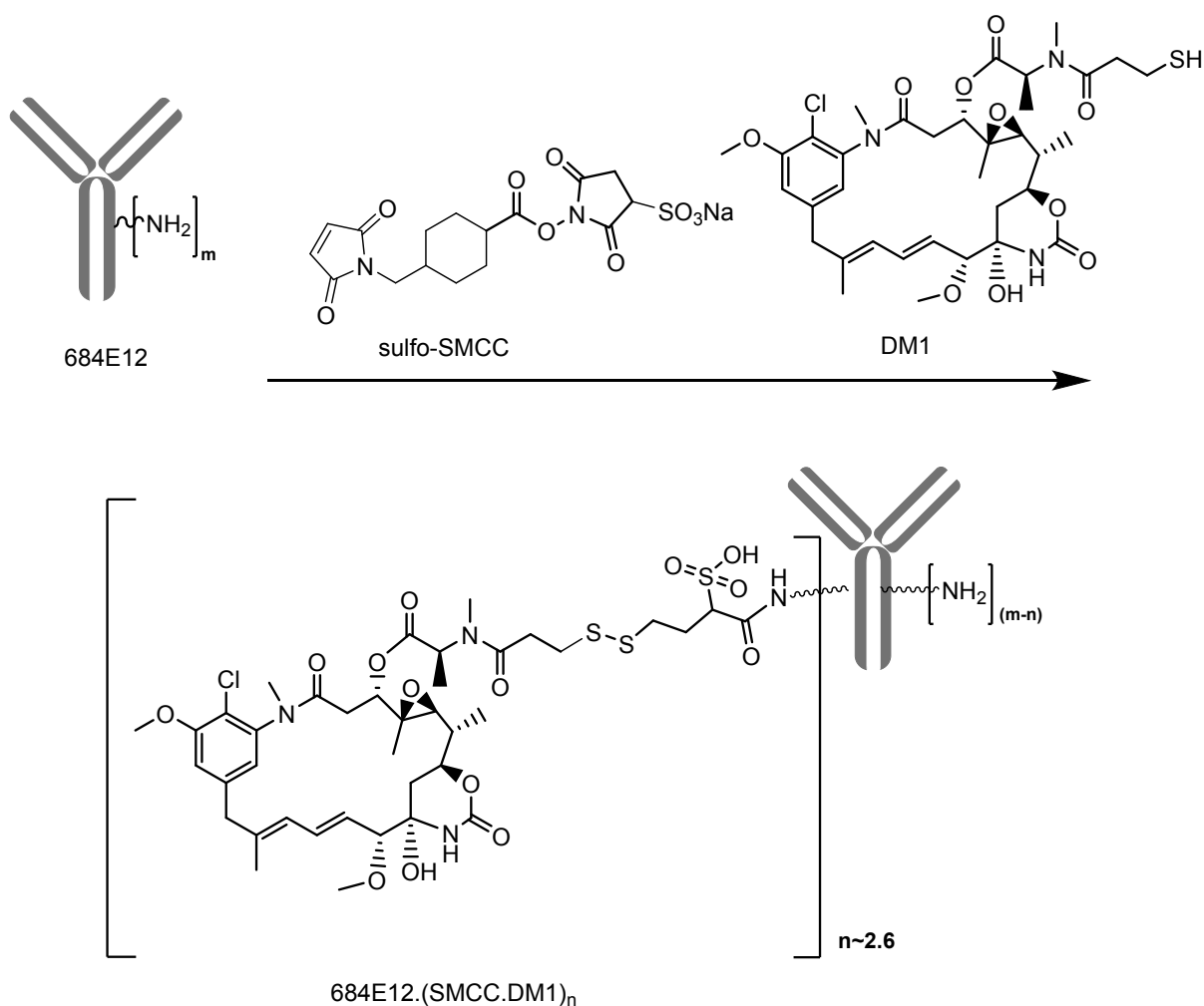
La mezcla de reacción se purificó de subproductos de molécula pequeña y se intercambié el tampón por filtración sobre células de membrana Amicon; corte de 30kDa

usando 10 mM de tampón PBS–pH 7,4 (estéril) para el lavado. La retención obtenida de Amicon se combinó y se diluyó a 10 mg/ml (UV) para obtener 2,9 ml de solución del conjugado de anticuerpo y fármaco 121G12.DAPA.sSPDB–DM4 en 10 mM de tampón PBS–pH 7,4 (49% recuperación de proteína).

- 5 Por SEC–UV, se determinó la relación de fármaco y anticuerpo como $n=3,6$, y se determinó la pureza monomérica de 98,7%. El nivel de endotoxina fue 0,14 EU/mg (prueba BET Endosafe).

Ejemplo 4C: Preparación de conjugado de anticuerpo y fármaco 684E12.SMCC.DM1.

10



- A la solución de anticuerpo (684E12 parental) (7,1 mg/mL, 3,4 mL, ca 47 μM , PBS, pH 7,4), se agregaron 100 μL de 2 mM DM1 (0,17 mg) en DMA y 50 μL de 4 mM sulfo-SMCC (0,15 mg) en DMA, y la mezcla se incubó y se agitó suavemente a 4°C durante la noche.
- 15

Después de la incubación, la mezcla de reacción se purificó mediante la desalación en una columna de desalación HiPrep 26/10 (GE Healthcare) usando PBS, pH 7,4, con el tampón de ejecución, y se filtró por esterilización. El conjugado purificado se analizó por MALDI-MS, y se estimó que el valor DAR era de 2,6. SEC analítica mostró 3,7% de agregación (o 96,3% de monómero) presente en la muestra, y la prueba LAL (PTS, Charles River Laboratories) determinó que el valor de endotoxina era de 0,36 EU/mg.

Ejemplo 4D: Preparación de conjugado de anticuerpo y fármaco 506E15.AURIX1.

El material de partida fue anticuerpo 506E15.CysMab (WT Fc) a 18,8 mg/ml (OD280 con un coeficiente de extinción de 13,7 para una solución de 10 mg/ml de solución de IgG) en solución salina tamponada con 1x fosfato (1xPBS). Se absorbieron 1,76 ml de anticuerpo en 3 ml de resina RMP Proteína A (GE Healthcare 1-223BPO/I), y a la suspensión resultante, se agregaron 240 ul de cisteína, 0,5 M (Sigma G121-03) formulada en fosfato 0,5 M pH 8, a la que se había agregado NaOH (Alfa Aesar A16037) con una relación de 13,6 g/L. La suspensión se sometió a torbellino ocasionalmente, a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego se lavó por filtración al vacío a través de una unidad de filtro de 0,2 um en la parte superior de una botella, con 50 volúmenes de lecho de 1 x PBS en por lo menos 10 ciclos de filtración y adición. La resina lavada se resuspendió en 2 ml de 1xPBS (suspensión al 50%), y se agregaron 60 ul de 100 uM CuCl₂ (Aldrich 751944) (neto 100 nM Cu²⁺) para iniciar la reoxidación. Luego de 420 minutos, se agregó una cantidad adicional de 90 ul de 100 uM CuCl₂ para acelerar aún más la reoxidación. La reoxidación del anticuerpo se evaluó eliminando una alícuota de 30 ul de suspensión, agregando 1 ul de una solución de carga de 20 mM de una maleimida de referencia (Ejemplo 3, p. 110 de WO 2015/095301), que se sabe que cambia el pico del anticuerpo por RPLC, mezclando durante 1 minuto, centrifugando a 7000 xg durante 10 segundos, eliminando el sobrenadante, agregando 60 ul de tampón de elución IgG Thermo (Thermo Scientific 21009), centrifugando a 14.000 x g durante 10 segundos, muestreando el sobrenadante y analizando los productos por RPLC de la siguiente manera: se inyectaron 2 ul de muestra en una columna calentada (80°C) de 4,6 x 50 mm Agilent PLRP-S (partículas 5 µm, tamaño de poro de 4000 Å) equilibrada a 0,1% de ácido trifluoracético en 29,5% de CH₃CN/agua (Millipore TX1280P-1, Burdick y Jackson 407-4) ejecutada a 1,5 ml/min. La columna se eluyó con un gradiente de 5 minutos a 44,5% CH₃CN/agua, que se mantuvo durante 1,9 minutos, y se detectaron los picos a 280 nm. El tiempo óptimo para la conjugación se define

como el momento en el cual el pico de producto principal es máximo, los picos de elución posteriores se minimizan, y los picos de elución anteriores aún o aumentan.

Cuando el ensayo de RPLC indicó que la reoxidación era óptima (en este caso, 565 minutos), se agregaron 220 µl de una carga de 20 mM de AURIX1 en DMSO, y la suspensión se agitó ocasionalmente a temperatura ambiente durante 70 minutos. La suspensión se lavó luego con 20 volúmenes de lecho de 1xPBS en por lo menos 10 ciclos de filtración y adición.

La suspensión se transfirió luego a una columna fritada (Pierce 7375021), eluida previamente con 0,5 volúmenes de lecho de tampón de elución IgG Thermo (desechado), luego se eluyó con 2 volúmenes de lecho del mismo tampón. El eluato completo (6 ml) se neutralizó con 0,6 ml de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8, y luego se concentró a 2,5 ml utilizando concentradores de centrifugado (Amicon UFC905024) a 3000 x g, se aplicó a una columna de intercambio de tampón PD-10 (GE Healthcare 17-0851-01) equilibrada a 1xPBS, cargando 2,5 ml de concentrado y eluyendo con 3,5 ml de 1xPBS según las indicaciones del fabricante. El rendimiento fue 22 mg (66%).

Ejemplo 4E: Preparación de conjugado de anticuerpo y fármaco 506E15.CysMab.DAPA.AURIX2

El material de partida fue anticuerpo 506E15.CysMab.DAPA a 10 mg/ml (OD280 con un coeficiente de extinción de 13,7 para una solución de 10 mg/ml de IgG) en 1x solución salina tamponada con fosfato (1xPBS). Se adsorbieron 2,0 ml de anticuerpo en 2 ml de resina RMP Proteína A (GE Healthcare 1-223BPO/I), y a la suspensión resultante se agregaron 160 µl de cisteína 0,5 M (Sigma G121-03) formulada en fosfato, 0,5 M, pH 8, a la cual se había agregado NaOH (Alfa Aesar A16037) en una relación de 13,6 g/L. La suspensión se sometió a torbellino ocasionalmente a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego se lavó por filtración al vacío a través de una unidad de filtro de 0,2 µm en la parte superior de una botella con 50 volúmenes de lecho de 1 x PBS en por lo menos 10 ciclos de filtración y adición. La resina lavada se resuspendió en 2 ml de 1 x PBS (50% suspensión), y se agregaron 10 µl de 100 µM CuCl₂ (Aldrich 751944) (neto 250 nM Cu²⁺) para iniciar la reoxidación. La reoxidación del anticuerpo se evaluó mediante la eliminación de una alícuota de 30 µl de suspensión, la adición de 1 µl de una carga 20 mM de una maleimida de referencia (Ejemplo 3, p. 110 del documento WO 2015/095301), que se sabe que cambia el pico del anticuerpo por RPLC, la mezcla durante 1 minuto, el centrifugado a 7000 x g durante 10 segundos, la eliminación del sobrenadante, la adición de 60 µl de tampón de elución IgG Thermo (Thermo Scientific 21009), el centrifugado a 14.000 x g durante 10 segundos, el muestreo del

sobrenadante y el análisis de productos por RPLC de la siguiente manera: 2 µl de muestra se inyectaron en una columna calentada (80°C) de 4,6 x 50 mm Agilent PLRP-S (partículas de 5 µm, 4000 Å de tamaño de poro) equilibrada a 0,1% de ácido trifluoracético en 29,5% CH₃CN/agua (Millipore TX1280P-1, Burdick y Jackson 407-4) ejecutada a 1,5 ml/min. La columna se eluyó con un gradiente de 5 minutos a 44,5% CH₃CN/agua, que se mantuvo durante 1,9 minutos, y se detectaron los picos a 280 nm. El tiempo óptimo para la conjugación se define como el tiempo en el cual el pico de producto principal es máximo, los picos de elución posteriores se minimizan, y los picos de elución anteriores aún no están en aumento.

Cuando el ensayo de RPLC indicó que la reoxidación era óptima (en este caso, 295 minutos), se agregaron 80 µl de una carga de 20 mM de AURIX2 en DMSO, y la suspensión se sometió a torbellino suave ocasionalmente a temperatura ambiente durante 85 minutos. La suspensión luego se lavó con 20 volúmenes de lecho de 1 x PBS en por lo menos 10 ciclos de filtración y adición.

La suspensión entonces se transfirió a una columna fritada (Pierce 7375021), eluida previamente con 0,5 volúmenes de lecho de tampón de elución IgG Thermo (descartado), luego, eluida con 2 volúmenes de lecho del mismo tampón. El eluato entero (4 ml) se neutralizó con 0,4 ml de fosfato de sodio, 0,5 M, pH 8, se aplicó a columnas de intercambio de tampón 2 x PD-10 (GE Healthcare 17-0851-01) equilibradas a 1 x PBS, cargando 2,5 ml de eluato y eluyendo con 3,5 ml de 1 x PBS según las indicaciones del fabricante. El rendimiento fue de 13,3 mg (67%).

Ejemplo 4F: Preparación de conjugado de anticuerpo y fármaco 674J13.CysMab.AURIX1.

El material de partida fue el anticuerpo 674J13.CysMab (WT Fc) a 9 mg/ml (OD280 con un coeficiente de extinción de 13,7 para una solución de 10 mg/ml IgG) en 1 x solución salina tamponada con fosfato (1 x PBS). A 57,6 ml de anticuerpo se agregó DTT a 200 mM (Invitrogen 15508-013), y la solución se incubó 75 minutos para reducir fuertemente el Ab. Los Ab reducidos luego se aplicaron a columnas de intercambio de tampón PD-10 (GE Healthcare 17-0851-01) equilibradas a 1xPBS, cargando 2,5 ml de concentrado y eluyendo con 3,5 ml de 1 x PBS según las instrucciones del fabricante. El eluato de los PD10 se reunió, y luego se volvió a aplicar a columnas nuevas PD10 a fin de eliminar el DTT en forma más completa. Obsérvese que, en experimentos separados, las columnas PD10 son más eficaces en la eliminación de DTT que lo que se observaría solo a través del mecanismo de exclusión por tamaño, siempre que las columnas sean utilizadas solo una vez.

La reoxidación del anticuerpo se evaluó mediante la eliminación de una alícuota de 30 ul de suspensión, la adición de 1 ul de una carga de 20 mM de AURIX1, que se sabe cambia el pico del anticuerpo por RPLC, la mezcla durante 1 minuto, el centrifugado a 7000 x g durante 10 segundos, la eliminación del sobrenadante, la adición de 60 ul de tampón de elución IgG Thermo (Thermo Scientific 21009), el centrifugado a 14.000 x g durante 10 segundos, el muestreado del sobrenadante y el análisis de productos por RPLC de la siguiente manera: 2 ul de muestra se inyectaron en una columna calentada (80°C) de 4,6 x 50 mm Agilent PLRP-S (partículas de 5 µm, 4000 Å tamaño de poro) equilibrada a 0,1% de ácido trifluoracético en 29,5% CH₃CN/agua (Millipore TX1280P-1, Burdick y Jackson 407-4) ejecutada a 1,5 ml/min.

La columna se eluyó con un gradiente de 5 minutos a 44,5% CH₃CN/agua, que se mantuvo durante 1,9 minutos, y se detectaron los picos a 280 nm. El tiempo óptimo para la conjugación se define como el tiempo en el cual el pico de producto principal es máximo, los picos de elución posteriores se minimizan, y los picos de elución anteriores aún no están en aumento.

Cuando el ensayo de RPLC indicó que la reoxidación era óptima (en este caso, 180 minutos), 290 ul de una carga de 20 mM de AURIX1 en DMSO se agregaron junto con 6 ml de resina RMP Proteína A (GE Healthcare 1-223BPO/I). La suspensión se sometió a torbellino suave ocasionalmente a temperatura ambiente durante 40 minutos. La suspensión luego se lavó con 20 volúmenes de lecho de 1xPBS en por lo menos 10 ciclos de filtración y adición.

La suspensión entonces se transfirió a una columna fritada (Pierce 7375021), eluida previamente con 0,5 volúmenes de lecho de tampón de elución IgG Thermo (descartado), luego, eluida con 2 volúmenes de lecho del mismo tampón. El eluato entero (11,5 ml) se neutralizó con 1,2 ml de fosfato de sodio, 0,5 M, pH 8, se concentró hasta 2,5 ml usando un concentrador de centrifugado (Amicon UFC905024) a 3000 x g, se aplicó a una columna de intercambio de tampón PD-10 (GE Healthcare 17-0851-01) equilibrada a 1 x PBS, cargando 2,5 ml de concentrado y eluyendo con 3,5 ml de 1 x PBS según las indicaciones del fabricante. El rendimiento fue de 26 mg (41%).

Ejemplo 4G: Preparación de conjugado de anticuerpo y fármaco 674J13.CysMab.DAPA.AURIX2.

El material de partida fue el anticuerpo 674J13.CysMab.DAR4.DAPA a 31,7 mg/ml (OD₂₈₀ con un coeficiente de extinción de 13,7 para una solución de 10 mg/ml IgG) en 1 x solución salina tamponada con fosfato (1 x PBS). Se absorbieron 9,5 ml de anticuerpo en 30,1 ml de resina RMP Proteína A (GE Healthcare 1-223BPO/I), y a la suspensión resultante se agregaron 1800 mg de DTT (Invitrogen 15508-013) a fin de reducir fuertemente el Ab (neto

200 mM DTT). La suspensión se sometió a torbellino a temperatura ambiente durante 20 minutos, luego se lavó mediante la filtración al vacío a través de una unidad de filtro de 0,2 μ m en la parte superior de una botella con 50 volúmenes de lecho de 1 x PBS en por lo menos 10 ciclos de filtración y adición. La resina lavada se resuspendió en 2 ml de 1 x PBS y se sometió a torbellino a temperatura ambiente –no se agregó cobre (esto aceleró la reoxidación de manera demasiado severa). La reoxidación del anticuerpo se evaluó mediante la eliminación de una alícuota de 30 μ l de suspensión, la adición de 1 μ l de una carga de 20 mM de una maleimida de referencia (Ejemplo 3, p. 110 de WO2015/095301), que se sabe cambia el pico del anticuerpo por RPLC, la mezcla durante 1 minuto, el centrifugado a 7000 x g durante 10 segundos, la eliminación del sobrenadante, la adición de 60 μ l de tampón de elución IgG Thermo (Thermo Scientific 21009), el centrifugado a 14.000 x g durante 10 segundos, el muestreado del sobrenadante y el análisis de productos por RPLC de la siguiente manera: 2 μ l de muestra se inyectaron en una columna calentada (80°C) de 4,6 x 50 mm Agilent PLRP-S (partículas de 5 μ m, tamaño de poro de 4000 Å) equilibrada a 0,1% de ácido trifluoracético en 29,5% de CH₃CN/agua (Millipore TX1280P-1, Burdick y Jackson 407-4) ejecutada a 1,5 ml/min. La columna se eluyó con un gradiente de 5 minutos a 44,5% CH₃CN/agua, que se mantuvo durante 1,9 minutos, y se detectaron los picos a 280 nm. El tiempo óptimo para la conjugación se define como el tiempo en el cual el pico de producto principal es máximo, los picos de elución posteriores se minimizan, y los picos de elución anteriores aún no están en aumento.

Cuando el ensayo de RPLC indicó que la reoxidación era óptima (en este caso, 80 minutos), se agregaron 903 μ l de una carga de 20 mM de AURIX2 en DMSO, y la suspensión se sometió a torbellino suave ocasionalmente a temperatura ambiente durante 50 minutos. La suspensión luego se lavó con 20 volúmenes de lecho de 1 x PBS en por lo menos 10 ciclos de filtración y adición.

La suspensión entonces se transfirió a una columna fritada (Pierce 7375021), eluida previamente con 0,5 volúmenes de lecho de tampón de elución IgG Thermo (descartado), luego, eluida con 2 volúmenes de lecho del mismo tampón. El eluato entero (60,2 ml) se neutralizó con 6,0 ml de fosfato de sodio, 0,5 M, pH 8, se concentró a 17,5 ml usando un concentrador de centrifugado (Amicon UFC905024) a 3000 x g, se aplicó a 7 columnas de intercambio de tampón PD-10 (GE Healthcare 17-0851-01) equilibradas a 1 x PBS, cargando 2,5 ml de concentrado y eluyendo con 3,5 ml de 1 x PBS según las indicaciones del fabricante. El rendimiento fue de 243 mg (81%).

Ejemplo 4H: Preparación de conjugado de anticuerpo y fármaco 121G12.CysMab.DAPA.AURIX1.

El material de partida fue el anticuerpo 121G12.CysMab.DAPA a 16,7 mg/ml (OD280 con un coeficiente de extinción de 13,7 para una solución de 10 mg/ml IgG) en 1 x solución salina tamponada con fosfato (1xPBS). Se absorbieron 3,6 ml de anticuerpo en 6 ml de resina RMP Proteína A (GE Healthcare 1–223BPO/I), y la suspensión resultante se sometió a torbellino a temperatura ambiente durante 125 minutos, luego se agregaron 544 ul de 0,5 M cisteína (Sigma G121–03) formulada en 0,5 M de fosfato pH 8, a la cual se había agregado NaOH (Alfa Aesar A16037) en una relación de 13,6 g/L. La suspensión se sometió a torbellino ocasionalmente a temperatura ambiente durante 60 minutos, luego se lavó mediante la filtración al vacío a través de una unidad de filtro de 0,2 um en la parte superior de una botella con 50 volúmenes de lecho de 1 x PBS en por lo menos 10 ciclos de filtración y adición. La resina lavada se resuspendió en 2 ml de 1 x PBS (suspensión al 50%), y se agregaron 16 ul de 100 uM CuCl₂ (Aldrich 751944) (neto 250 nM Cu²⁺) para iniciar la reoxidación. La reoxidación del anticuerpo se evaluó mediante la eliminación de una alícuota de 30 ul de suspensión, la adición de 1 ul de una carga de 20 mM de AURIX1 que se sabe cambia el pico del anticuerpo por RPLC, la mezcla durante 1 minuto, el centrifugado a 7000 x g durante 10 segundos, la eliminación del sobrenadante, la adición de 60 ul de tampón de elución IgG Thermo (Thermo Scientific 21009), el centrifugado a 14.000 x g durante 10 segundos, el muestreado del sobrenadante y el análisis de productos por RPLC de la siguiente manera: 2 ul de muestra se inyectaron en una columna calentada (80°C) de 4,6 x 50 mm Agilent PLRP–S (partículas de 5 µm, 4000 Å tamaño de poro) equilibrada a 0,1% de ácido trifluoracético en 29,5% CH₃CN/ agua (Millipore TX1280P–1, Burdick y Jackson 407–4) ejecutada a 1,5 ml/min. La columna se eluyó con un gradiente de 5 minutos a 44.5% CH₃CN/agua, que se mantuvo durante 1,9 minutos, y se detectaron los picos a 280 nm. El tiempo óptimo para la conjugación se define como el tiempo en el cual el pico de producto principal es máximo, los picos de elución posteriores se minimizan, y los picos de elución anteriores aún no están en aumento.

Cuando el ensayo de RPLC indicó que la reoxidación era óptima (en este caso, 170 minutos), se agregaron 67 ul de una carga de 20 mM de AURIX1 en DMSO, y la suspensión se sometió a torbellino suave ocasionalmente a temperatura ambiente durante 120 minutos. La suspensión luego se lavó con 20 volúmenes de lecho de 1 x PBS en por lo menos 10 ciclos de filtración y adición.

La suspensión entonces se transfirió a una columna fritada (Pierce 7375021), eluida previamente con 0,5 volúmenes de lecho de tampón de elución IgG Thermo (descartado), luego, eluida con 2 volúmenes de lecho del mismo tampón. El eluato entero (15 ml) se neutralizó con 1,5 ml de fosfato de sodio, 0,5 M, pH 8, se concentró a 5 ml usando un concentrador de centrifugado (Amicon UFC905024) a 3,000 x g, se aplicó a columnas de intercambio de tampón 2 x PD-10 (GE Healthcare 17-0851-01) equilibradas a 1 x PBS, cargando 2,5 ml de eluato y eluyendo con 3,5 ml de 1 x PBS según las indicaciones del fabricante. El rendimiento fue de 54 mg (92%).

Ejemplo 4I: Preparación de conjugado de anticuerpo y fármaco
121G12.CysMab.AURIX1.

El material de partida fue el anticuerpo 121G12.CysMab (Fc WT) a 12,5 mg/ml (OD280 con un coeficiente de extinción de 13,7 para una solución de 10 mg/ml IgG) en 1 x solución salina tamponada con fosfato (1 x PBS). Se absorbieron 4,8 ml de anticuerpo en 6 ml de resina RMP Proteína A (GE Healthcare 1-223BPO/I), y la suspensión resultante se sometió a torbellino a temperatura ambiente durante 125 minutos, luego se agregaron 592 ul de 0,5 M cisteína (Sigma G121-03) formulada en 0,5 M de fosfato pH 8, a la cual se había agregado NaOH (Alfa Aesar A16037) en una relación de 13,6 g/L. La suspensión se sometió a torbellino ocasionalmente a temperatura ambiente durante 60 minutos, luego se lavó mediante la filtración al vacío a través de una unidad de filtro de 0,2 um en la parte superior de una botella con 50 volúmenes de lecho de 1 x PBS en por lo menos 10 ciclos de filtración y adición. La resina lavada se resuspendió en 2 ml de 1 x PBS (suspensión al 50%), y se agregaron 16 ul de 100 uM CuCl₂ (Aldrich 751944) (neto 250 nM Cu²⁺) para iniciar la reoxidación. La reoxidación del anticuerpo se evaluó mediante la eliminación de una alícuota de 30 ul de suspensión, la adición de 1 ul de una carga de 20 mM de AURIX1 que se sabe cambia el pico del anticuerpo por RPLC, la mezcla durante 1 minuto, el centrifugado a 7000 x g durante 10 segundos, la eliminación del sobrenadante, la adición de 60 ul de tampón de elución IgG Thermo (Thermo Scientific 21009), el centrifugado a 14.000 x g durante 10 segundos, el muestreado del sobrenadante y el análisis de productos por RPLC de la siguiente manera: 2 ul de muestra se inyectaron en una columna calentada (80°C) de 4,6 x 50 mm Agilent PLRP-S (partículas de 5 µm, 4000 Å tamaño de poro) equilibrada a 0,1% de ácido trifluoracético en 29,5% CH₃CN/ agua (Millipore TX1280P-1, Burdick y Jackson 407-4) ejecutada a 1,5 ml/min. La columna se eluyó con un gradiente de 5 minutos a 44,5% CH₃CN/agua, que se mantuvo durante 1,9 minutos, y se detectaron los picos a 280 nm. El tiempo óptimo para la

conjugación se define como el tiempo en el cual el pico de producto principal es máximo, los picos de elución posteriores se minimizan, y los picos de elución anteriores aún no están en aumento.

5 Cuando el ensayo de RPLC indicó que la reoxidación era óptima (en este caso, 160 minutos), se agregaron 67 μ l de una carga de 20 mM de AURIX1 en DMSO, y la suspensión se sometió a torbellino suave ocasionalmente a temperatura ambiente durante 120 minutos. La suspensión luego se lavó con 20 volúmenes de lecho de 1 x PBS en por lo menos 10 ciclos de filtración y adición.

10 La suspensión entonces se transfirió a una columna fritada (Pierce 7375021), eluida previamente con 0,5 volúmenes de lecho de tampón de elución IgG Thermo (descartado), luego, eluida con 2 volúmenes de lecho del mismo tampón. El eluato entero (15 ml) se neutralizó con 1,5 ml de fosfato de sodio, 0,5 M, pH 8, se concentró a 5 ml usando un concentrador de centrifugado (Amicon UFC905024) a 3000 x g, se aplicó a columnas de intercambio de tampón 2 x PD-10 (GE Healthcare 17-0851-01) equilibradas a 1 x PBS, 15 cargando 2,5 ml de eluato y eluyendo con 3,5 ml de 1 x PBS según las indicaciones del fabricante. El rendimiento fue de 52 mg (89%).

Métodos analíticos: la concentración se determinó mediante OD280 con un coeficiente de extinción de 13,7 para una solución de IgG de 10 mg/ml. El pirógeno se determinó utilizando el ensayo Kinetic QCL (Lonza Walkersville 50-650H) leído en un lector de placas TECAN 20 Safire. El porcentaje de agregados se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica en un protector Shodex KW-G (Thomson Instrument Company, nro. de cat. 6960955) y en la columna KW-803 (TIC, cat. # 6960940) equilibrada con una fase móvil [Tris a 20 mM, pH 7,65 (preparada con Tris 10 mM pH 7,4, Tris 10 mM pH 8), NaCl 200 mM, azida sódica al 0,02%], con adquisición de datos a 280 nm. Se preparó una parte alícuota de la 25 muestra para la determinación de DAR diluyendo la muestra a 2 mg/ml en 1 x PBS, desglucosilando la muestra con PNGasaF (internamente) durante 10 minutos a 50°C, eliminando la PNGasaF mediante la unión a proteína A, lavando con 1 x PBS y eluyendo con ácido fórmico al 1%. La muestra se redujo agregando ¼ de volumen de acetato de amonio 5 M, pH 5,0, que contenía TCEP 0,5 M e incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos. 30 Luego, la muestra se inyectó en una columna PLRP-S de 2,1 x 50 mm (partículas de 8 μ m, tamaño de poro de 1000 Å), equilibrada a ácido fórmico al 0,1% en CH₃CN al 20%/agua (Invitrogen), con una ejecución a 0,5 ml/min. La columna se lavó a 20% de CH₃CN/agua durante 3 minutos, luego se eluyó con un gradiente de 0,1 minutos a 0,1% de ácido fórmico y

90% de CH₃CN/agua, que se mantuvo durante 1,9 minutos. Los datos espectrales de masas se tomaron en un instrumento Agilent 1260 y se desconvolucionaron con el Análisis Cualitativo MassHunter B.05.00 en un rango de 15 a 60 kDa. Las áreas de los picos correspondientes a diversos estados DAR calculados se ponderaron de acuerdo con el DAR de cada pico, luego se sumaron, y el área ponderada del pico DAR4 se dividió por la suma de todos los picos ponderados para obtener el valor DAR.

Los datos analíticos en la muestra resultante son los siguientes:

	506E15.DAPA.	506E15.	674J13.DAPA.	674J13.	121G12.	121G12.DAPA
Parámetro	AURIX2	AURIX1	AURIX2	AURIX1	AURIX1	AURIX1
Concentración (mg/ml)	1,9	6,7	9	8,4	7,5	7,8
Pirógeno (EU/ml)	0,05	0,42	0,05	<0,5	0,05	0,05
% agregado	<1	<1	2,8	<1	1,2	1,9
DAR	3,80	3,78	HC 3,93 LC 0,03	HC 3,8	3,80	3,80

10 **Ejemplo 4J: Preparación de conjugados adicionales usando otros anticuerpos CysMab.**

Los métodos que se describen en el Ejemplo 4A se usan además para producir conjugados MPET.DM4 con otros anticuerpos de diseño de cisteína.

Los métodos se usan para producir los conjugados anti-P-cadherina
 15 Ab.CysMab.MPET.DM4 usando los anticuerpos NOV169N31Q(E152C-S375C),
 NEG0012(E152C-S375C), NEG0013(E152C-S375C), NEG0016(E152C-S375C),
 NEG0064(E152C-S375C), NEG0067(E152C-S375C), NOV169N31Q(K360C(HC)-
 K107C(LC)), NEG0012(K360C(HC)-K107C(LC)), NEG0013(K360C(HC)-K107C(LC)),
 NEG0016(K360C(HC)-K107C(LC)), NEG0064(K360C(HC)-K107C(LC)) y
 20 NEG0067(K360C(HC)-K107C(LC)), divulgados en la Publicación PCT Nro. WO
 2016/203432.

Ejemplo 5: Caracterización de ADC *in vitro*.

Los conjugados de fármaco y anticuerpo (ADC) se caracterizaron por diversos métodos funcionales y analíticos. Los ADC retuvieron la unión a la proteína CCR7 objetivo en las células según lo evaluado por FACS. Para todos los ADC, la intensidad de fluorescencia media geométrica en el ensayo de unión de FACS estaba dentro del 20% del valor para el anticuerpo no conjugado. Según la SEC analítica, se demostró que los ADC eran > 95% de material con el peso molecular deseado; en los casos en que esto no se observó para los productos de reacción iniciales, el uso de SEC preparatoria logró la especificación necesaria. La relación de anticuerpo-fármaco (DAR) se evaluó mediante LCMS de la muestra de anticuerpo reducida desglicosilada, sumando las abundancias de diversas especies DAR y ponderando por el número de moléculas de fármaco en cada especie DAR (por ejemplo, un solo ion DAR2 cuenta como 2, un solo ion DAR1 cuenta como 1). Los conjugados que comprenden regiones constantes que contienen dos mutaciones de cisteína fueron por lo menos en DAR 3,4 o por encima, y más comúnmente, en DAR 3,8 o por encima. Esto fue consistente en todos los conjugados informados.

Ejemplo 6: inhibición de la proliferación celular/ensayo de viabilidad celular.

Anteriormente mostramos que las versiones conjugadas con fluoróforos de los tres anticuerpos anti-CCR7 pueden internalizar CCR7 y acumular efectivamente el fluoróforo conjugado en los compartimientos de bajo pH de las células a través de un panel de líneas celulares. Aquí mostramos la capacidad del anticuerpo para internalizar y acumular materia conjugada intracelularmente en un entorno donde la materia conjugada es una carga útil tóxica.

En un entorno de ADC a cuestas (*piggyback*) (pgADC), se estudiaron los efectos citotóxicos de los anticuerpos anti-CCR7 complejados con un fragmento de anticuerpo secundario conjugado con carga útil mediante la evaluación de la viabilidad celular después de cuatro días de tratamiento. Se prepararon diluciones triples de las IgG específicas de CCR7 y se mezclaron con una cantidad constante de fragmento Fab acoplado a la carga útil. La concentración final del fragmento Fab acoplado a la carga útil fue de 0,5 µg/ml. El reactivo Fab es un Fab dirigido Fc antirratón, conjugado o bien con MMAF o con Saporina (Advanced Targeting Systems, Fab-Zap). Después de la incubación previa durante 30 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 10 µl/pocillo del complejo de anticuerpo-carga útil a las placas blancas de fondo de 384 pocillos por triplicado. Las respectivas células CCR7(+) se sembraron de tal manera que su densidad fue inferior a 1×10^6 /ml para las células en

suspensión, y se alcanzó una confluencia del 80% para las células adherentes. Las células se recogieron (las células adherentes se separaron con Accutase) y se resuspendieron a aproximadamente 2×10^4 células/ml. Las células se agregaron a placas de 384 pocillos en la parte superior del complejo de anticuerpo–carga útil (20 μ l/pocillo). La placa se incubó durante cuatro días a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se prepararon 20 μ l/pocillo de solución CellTiter–Glo (ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter–Glo®; Promega, # G7571) y se agregaron a las células. Solo las células viables producen ATP (adenosina trifosfato), que es necesario para la reacción de luciferasa (proporcionada por CellTiter–Glo) que resulta en la luminiscencia. De acuerdo con esto, la viabilidad celular se determinó por la señal de luminiscencia, que se midió después de 10 minutos de incubación a 22°C y 400 rpm con el lector Envision 2104 Multilabel. Los valores de IC₅₀ se calcularon utilizando el soporte lógico Graphpad Prism.

La Figura 7A y la Figura 7B muestran que los cuatro anticuerpos anti–CCR7 son capaces de destruir células dependientes de la concentración, de células CCR7 + KE97 en el formato de ensayo a cuestras, utilizando el reactivo conjugado con MMAF. La siguiente tabla resume los resultados de los experimentos con MMAF o Saporina como herramienta de carga útil a cuestras.

Tabla 16: IC₅₀ y AMAX de anticuerpos anti–CCR7 en el ensayo citotóxico pgADC.

	Anti–mFc.MMAF		Fab–ZAP	
	IC ₅₀ (nM)	AMAX (%)	IC ₅₀ (nM)	AMAX (%)
121G12 Parental	0,055	104	0,064	43
506E15 Parental	0,070	95	0,135	60
674J13 Parental	0,137	102	6,12	31
684E12 Parental	0,214	80	2,60	33
MAB197 (R&D)	0,142	85	0,155	40

La especificidad de la destrucción de pgADC se evaluó usando líneas celulares negativas objetivo. Un ejemplo se muestra en la Figura 8 utilizando el reactivo FabZap. El aumento específico dependiente de CCR7 en la actividad pgADC de 121G12 se observa en las células KE97 y NIH3T3.hCCR7 en contraste con las células parentales NIH3T3 negativas a CCR7 o el anticuerpo de control mIgG.

Ejemplo 7: Impacto de anticuerpos anti-CCR7 conjugados con AURIX1 o no conjugados reactivos en forma cruzada con ratón, en células hematopoyéticas de ratón normales *in vivo*.

La expresión normal de tejido a través de las especies se restringe a las células de origen hematopoyético, incluidas las células T CD4⁺ y CD8⁺ en la sangre y los órganos linfoides, lo que presenta una posible responsabilidad de seguridad para ADC con objetivo CCR7, especialmente, en un formato de Fc de tipo salvaje que podría conducir a ADCC y el agotamiento de las células linfoides.

Para determinar el impacto de apuntar a CCR7 con un ADC en células hematopoyéticas normales *in vivo*, se evaluó un Ab parental 121G12 de reactividad cruzada de ratón, o bien no conjugado o conjugado con AURIX1, en ratones CD-1 hembras sanos de 6–8 semanas de edad, o bien en un formato de tipo salvaje o silenciado (DAPA) Fc. Los ratones recibieron un solo tratamiento IV de 121G12 parental.Cys–Mab.tipo salvaje Fc.hIgG1 (121G12.wt.Fc), 121G12 parental.Cys–Mab.DAPA.hIgG1 (121G12.DAPA.Fc), 121G12 parental.Cys–Mab.tipo silvestre Fc.hIgG1.AURIX1 (121G12.wt.Fc.AURIX1) o 121G12.parental.Cys–Mab.DAPA.hIgG1.AURIX1 (121G12.DAPA.Fc.AURIX1), en una dosis final de 10 mg/kg. Todas las dosis se ajustaron a los pesos corporales de los ratones individuales.

El día 25 postratamiento, se extirparon los bazo, y se disociaron en suspensiones de células individuales usando el disociador gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec Inc, San Diego, CA). Entonces se tiñeron 1 millón de células para cada muestra con un cóctel de Ab, que incluía anticuerpo BUV737 de rata antirratón CD8a, clon 53–6.7 (1:100) (BD Biosciences, San Jose, CA, Cat# 564297) y anticuerpo BV510 de rata antirratón CD4, clon RM4–5 (1:200) (BD Biosciences, San Jose, CA, Cat#563106), a fin de determinar el impacto de los tratamientos individuales en células T CD4⁺ y CD8a⁺. Las muestras se incubaron a 4°C durante 30 min, se lavaron en solución salina tamponada con fosfato helada HyClone (Hyclone Laboratories, Logan, Utah) y se evaluaron en el analizador de células BD LSRFortessa™ cell analyzer (BD Biosciences, San Jose, CA). Los recuentos celulares de esplenocitos totales se usaron para determinar el agotamiento de células T CD4⁺ o CD8a⁺. Se usó la prueba de la T para determinar la significación entre grupos.

Como se muestra en la Tabla 17 y la Figura 9, se observó una fuerte reducción de células T CD4⁺ (FC 0,5–0,6) y CD8a⁺ (FC 0,3–0,5) en el bazo, al día 3 del tratamiento, o bien con 121G12.wt.FC o 121G12.wt.Fc.AURIX1 Abs a 10 mg/kg, lo que sugiere que el impacto del agotamiento de células T fue independiente de la presencia de carga útil AURIX1. Estos efectos

se rescataron silenciando el Fc a través de la introducción de mutaciones DAPA. Tanto 121G12.DAPA.Fc como 121G12.DAPA.Fc.AURIX1 no impactaron en las poblaciones de células T en relación con el grupo sin tratamiento. Estos datos indican que los ADC anti-CCR7 pueden tener una responsabilidad de seguridad de agotamiento de células T que puede ser rescatada a través del silenciamiento DAPA del Fc.

Tabla 17: Impacto del Anticuerpo 121G12 en poblaciones de células T CD4+ y CD8a+ en ratones CD-1.

	Células T CD8+				
	Sin tratam.	121G12-wtFc	121G12.DAPA.Fc	121G12.wt.Fc.AURIX1	121G12.DAPA.Fc.AURIX1
Media	5833	3041	6003	2013	5317
SE	650	629	860	426	526
Cambio en veces		0.5	1.0	0.3	0.9
Valor p		<0.05	NS	<0.001	NS
	Células T CD4+				
	Sin tratam.	121G12-wtFc	121G12.DAPA.Fc	121G12.wt.Fc.AURIX1	121G12.DAPA.Fc.AURIX1
Media	20896	12512	18547	10324	19633
SE	480	2326	2004	1602	1520
Cambio en veces		0.6	0.9	0.5	0.9
Valor p		<0.05	NS	<0.001	NS

El experimento se evaluó en el Día 25 de tratamiento. Cambio en veces (FC) = media de recuentos de esplenocitos en el Día 25 para el grupo de tratamiento indicado/media de recuentos de esplenocitos para el grupo de control sin tratamiento el Día 3. Se usó la prueba de la T para determinar la significación frente al grupo sin tratamiento (* p <0,05, *** p <0,001; NS = no significativo).

Ejemplo 8: Actividad de ADC anti-CCR7 de conjugados directos.

Se estudiaron los efectos citotóxicos después de la unión de anticuerpos conjugados directamente (ADC) con diversas cargas útiles y su internalización en células CCR7(+), mediante la evaluación de la viabilidad celular después de cuatro días de tratamiento. Se añadieron diluciones triples de los ADC a placas blancas de fondo de 384 pocillos por triplicado (10 µl/ml). Las respectivas células CCR7(+) se sembraron de tal manera que su densidad fue

inferior a 1×10^6 /ml para las células en suspensión, y se alcanzó una confluencia del 80% para las células adherentes. Las células se recogieron (las células adherentes se desprendieron con Accutase) y se resuspendieron a aproximadamente 2×10^4 células/ml. Las células se agregaron a placas de 384 pocillos en la parte superior del anticuerpo (20 μ l/pocillo). Las placas se incubaron durante cuatro días a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se prepararon 20 μ l/pocillo de solución CellTiter–Glo (ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter–Glo®; Promega, # G7571) y se agregaron a las células. La viabilidad celular se determinó por la señal de luminiscencia, que se midió después de 10 minutos de incubación a 22°C y 400 rpm con el lector Envision. Los valores de IC₅₀ se calcularon utilizando el soporte lógico Graphpad Prism.

La Tabla a continuación muestra ejemplos de los efectos de la viabilidad celular medidos con anticuerpos CysMab anti–CCR7 en formato Fc de tipo salvaje o Fc silenciado (DAPA) conjugado con AURIX1 o AURIX2.

Tabla 18: IC₅₀ de ADC anti–CCR7 en el ensayo citotóxico.

Línea celular	Tipo de cáncer	Actividad ADC en ensayo de viabilidad celular; IC ₅₀ (nM)			
		506E15.CysMab.AURIX1	674J13.CysMab.AURIX1	506E15.CysMab.DAPA.AURIX2	674J13.CysMab.DAPA.AURIX2
DEL	ALCL	0,0029	0,0741	0,0084	0,1167
K E97	Mieloma múltiple	0,0031	0,03	0,0131	0,0658

Para evaluar los ADC en cuanto a la especificidad de objetivo y la dependencia del nivel de receptor, se evaluó la actividad de ADC a través de líneas celulares con diferentes niveles de receptor CCR7. La siguiente tabla muestra un ejemplo del anticuerpo 674J13 humanizado en formato CysMab.DAPA y conjugado con AURIX2. Las líneas celulares se seleccionaron en función de una sensibilidad similar a la carga útil.

Tabla 19: IC₅₀ del anticuerpo 674J13 humanizado en formato DAPA y conjugado con AURIX2.

Línea celular	Tipo de cáncer	Niveles receptor CCR7	Actividad de ADC en el ensayo de viabilidad celular; IC ₅₀ (nM)
			674J13.CysMab.DAPA.AURIX2

DEL	ALCL	~100.000	0,2417 (>95% AMAX)
KE97	Mieloma múltiple	~100.000	0,1018 (>95% AMAX)
SR786	Linfoma anaplásico de células T grandes	~28.000	2,737 (90% AMAX)
CML-T1	Leucemia de células T	~29.000	3,779 (60% AMAX)
DND-41	Leucemia de células T	1700	< 20% AMAX
NCI-H82	Cáncer de pulmón de células pequeñas	0	Sin destrucción

Como se ve en el experimento de pHrodo, la actividad de ADC requiere un mayor grado de números de receptores que la modalidad de ADCC. El corte exacto del receptor depende de diversos parámetros (por ejemplo, la avidéz del anticuerpo, la potencia de la carga útil), pero los datos que se muestran aquí describen el concepto general. El uso de un anticuerpo anti-CCR7 dependiente de la avidéz en formato DAPA sesga la actividad del ADC hacia las células cancerosas sobre las PBMC CCR7+ normales, que están representadas aquí por líneas celulares de cáncer con menos de 2000 receptores CCR7.

Ejemplo 9: Introducción de un ADC MPET.DM4 específico de sitio.

Los ADC conjugados con DM4 están bien establecidos en el campo de los ADC. Aquí describimos la generación y el uso de un MPET.DM4 conjugado específicamente para el sitio, usando la versión CysMab de los anticuerpos, que tiene la ventaja de producir un lote de ADC controlado en DAR homogéneo y reproducible, donde el DAR (relación de fármaco a anticuerpo) es alrededor de 4. Se ha descrito que los conjugados no específicos de sitio a menudo contienen poblaciones significativas con alto DAR, que se han relacionado con características biofísicas desfavorables que incluyen un aumento de la hidrofobicidad y, por consiguiente, un aclaramiento más rápido, un perfil de PK deficiente y una mayor toxicidad. A continuación mostramos diversas evaluaciones *in vitro* e *in vivo* de un ADC anti-CCR7 a base de MPET.DM4 en comparación con su contraparte sSPDB.DM4.

Ejemplo 10: Afinidad de unión FACS de ADC MPET.DM4 frente a sSPDB.DM4

Otra mejora potencial de la conjugación específica de sitio sobre la conjugación no específica de sitio podría ser una interferencia potencial de los sitios de conjugación de lisina que están estructuralmente en la vecindad de los residuos esenciales CSD. Puede esperarse que

la conjugación de carga útil a dichos sitios de Lisina tenga un impacto en la afinidad de unión del ADC. A fin de evaluar las afinidades de unión de los ADC utilizando el MPET.DM4 conjugado con CysMab descrito aquí frente a sSPDB.DM4 conjugado con lisina endógena, la afinidad de unión se determinó mediante FACS como se describe anteriormente. La siguiente

5 tabla resume algunos datos de afinidad representativos, que muestran una leve disminución en la afinidad de unión del ADC sSPDB.DM4 frente al ADC MPET.DM4.

Tabla 20: Afinidad de unión de los ADC anti-CCR7.

		Afinidad de ADC en FACS; EC50 (nM)		
Línea celular	Niveles de receptor CCR7	121G12. CysMab.DAR4 no conjugado	121G12. CysMab.DAPA. MPET.DM4 (DAR 3.8)	121G12. DAPA.sSPDB.DM4 (DAR3.9)
DEL	≥100.000	5,24	5,61	8,42

Ejemplo 11: Actividad *in vitro* de ADC MPET.DM4 frente a sSPDB.DM4.

Los efectos citotóxicos de los ADC 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 y

10 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 (DAR3.9) se evaluaron en un ensayo de viabilidad *in vitro* como se describió anteriormente. La siguiente tabla muestra una actividad similar y ligeramente mejorada del conjugado MPET.DM4 en comparación con sSPDB.DM4. Esto puede ser la consecuencia de una afinidad mejor conservada u otros factores.

Tabla 21: Actividad citotóxica *in vitro* de ADC anti-CCR7.

	Actividad de ADC en ensayo de viabilidad celular; IC50 (nM)	
Línea celular	121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	121G12.DAPA.sSPDB.DM4 (DAR3.9)
L540	2,944	3,905
DEL	2,286	2,983
KE97	2,171	3,177

15 El ADC 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 se evaluó adicionalmente en una diversidad de líneas celulares de cáncer que cubrían diversos contextos de indicación, donde logró una destrucción celular sustancial que se correlaciona con las densidades de receptor.

Tabla 22: Actividad citotóxica *in vitro* de ADC anti-CCR7 en líneas celulares.

Línea celular	Tipo de cáncer	Densidad receptor relativa (%)	121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 IC50 (nM)
SUPHD1	Linfoma de Hodgkin	310	1,69
L540	Linfoma de Hodgkin	175	4,90
KE97	Mieloma múltiple	100	2,24
JVM2	MCL	79	4,62
MOTN1	CLL	67	4,24
DEL	ALCL	67	2,28
OCI-Ly3	ABC-DLBCL	43	6,42
Toledo	DLBCL	20	n. d.
Mec-2	CLL	15	>20
PEE	T-	2	>20
R	ALL		

Ejemplo 12: Eficacia *in vivo* dependiente de la dosis, de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 y 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 contra el modelo de xenoinjerto de mieloma múltiple KE97 en ratones SCID-Beige.

Para demostrar la actividad antitumoral dirigida de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 y 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 *in vivo*, se estableció el modelo de xenoinjerto KE97 en ratones SCID-beige hembras mediante la inyección subcutánea de 3×10^6 células en el flanco derecho de cada ratón. Una vez que los tumores alcanzaron aproximadamente 135 mm³, los ratones se asignaron al azar según el volumen del tumor a grupos de tratamiento (n = 8 por grupo). Los ratones recibieron un tratamiento IV de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 (DAR4) en una dosis final de 0,5, 2 o 5 mg/kg, 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 (DAR 3.9) en una dosis de 0,5, 2 o 5 mg/kg, o un control de isotipo no específico IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 5 mg/kg. Todas las dosis se ajustaron al peso corporal individual del ratón.

Todos los agentes de prueba fueron tolerados en el estudio, y no se observaron síntomas clínicos evidentes de toxicidad o pérdida de peso corporal en ninguno de los grupos de tratamiento (Tabla 23).

Tabla 23: Eficacia de respuesta a la dosis de ADC anti-CCR7 en el modelo de xenoinjerto KE97.

Tratamiento	Dosis, programa	Respuesta tumoral		Respuesta huésped	
		$\Delta T/\Delta C$ (%)	Regresión (%)	Δ peso corporal (%)	Sobrevida (vivos/total)

Sin tratamiento	Ninguno	100	–	2,09	8/8
IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4	5 mg/kg Dosis única	92,94	–	3,02	8/8
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	0,5 mg/kg Dosis única	78,62	–	1,05	8/8
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	2 mg/kg Dosis única	–	33,07*	2,74	8/8
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	5 mg/kg Dosis única	–	53,66*	0,46	8/8
121G12.DAPA.sSPDB.DM4	0,5 mg/kg Dosis única	85,38	–	1,84	8/8
121G12.DAPA.sSPDB.DM4	2 mg/kg Dosis única	13,77*	–	0,59	8/8
121G12.DAPA.sSPDB.DM4	5 mg/kg Dosis única	–	32,63*	3,63	8/8

El experimento se evaluó en el Día 9 de tratamiento (Día 23 posterior al implante), * $p < 0,001$ frente al grupo control Sin tratamiento (ANOVA unilateral/Prueba de comparación múltiple de Tukey). $\% \Delta T/\Delta C = 100 \Delta T/\Delta C$ donde: ΔT = media volumen tumoral del grupo tratado con fármaco en D23 del estudio – media volumen tumoral del grupo tratado con fármaco en el día inicial de la dosificación; ΔC = media volumen tumoral del grupo de control en D23 del estudio – media volumen tumoral del grupo de control en el día inicial de la dosificación D14. $\% \text{Regresión} = (1 - T_{\text{final}}/T_{\text{inicial}}) \times 100$, donde T_{final} es la media de volumen del tumor D23, y T_{inicial} se define como el volumen del tumor en D14 después del implante. Δ peso corporal (%) = (Media peso corporal D23 – media peso corporal D14) * 100/Media peso corporal D14 del tratamiento.

No se observó una eficacia antitumoral significativa después del tratamiento con el control de isotipo no específico IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 5 mg/kg. El tratamiento de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 produjo una eficacia antitumoral dependiente de la dosis, con un valor $\Delta T/\Delta C$ de 78,62% (0,5 mg/kg), mientras que las dosis de 2 y 5 mg/kg produjeron una media de regresión de 33% y 54%, respectivamente, al D9 posterior a la primera dosis (D23 posterior al implante). El tratamiento de 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 también demostró eficacia antitumoral dependiente de la dosis, con valores $\Delta T/\Delta C$ de 85,38% (0,5 mg/kg) y 13,77% (2 mg/kg), mientras que la dosis de 5 mg/kg produjo una media de

regresión del 33% al D9 posterior a la primera dosis (D23 posterior al implante). Al D23–D25 posimplante, los grupos de control y los grupos de tratamiento de 0,5 mg/kg se sacrificaron, y los grupos restantes recibieron una segunda dosis el D28 posimplante, o bien de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 2 o 5 mg/kg, o 121G12.DAPA.sSPDB.DM4, a 2 o 5 mg/kg. Se observó regresión tumoral sostenida con 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 2 y 5 mg/kg, al igual que con 121G12.DAPA.sSPDB.DM4, a 5 mg/kg, hasta el final del estudio el D42 posimplante. A 2 mg/kg con 121G12.DAPA.sSPDB.DM4, la respuesta fue más heterogénea, donde aproximadamente 25% de los ratones exhibieron regresión tumoral sostenida, mientras que el resto del grupo mostró o bien enfermedad estable, o regresión tumoral (Figura 10, Tabla 23).

Ejemplo 13: Evaluación de eficacia de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 frente a 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 en el modelo de mieloma múltiple KE97 en volúmenes tumorales iniciales más grandes.

Se estableció un modelo *in vivo* de barra superior utilizando la línea celular de mieloma múltiple KE97 para diferenciar aún más la eficacia antitumoral de los diferentes enlazadores escindibles, comparando la eficacia de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 (DAR3.9) en tumores con volúmenes tumorales iniciales más grandes en la primera dosis. El modelo de xenoinjerto KE97 se estableció en ratones hembras SCID–beige mediante la inyección subcutánea de 3×10^6 células en el flanco derecho de cada ratón. Una vez que los tumores alcanzaron alrededor de 450 mm^3 , los ratones se asignaron al azar de acuerdo con el volumen tumoral a dos grupos de tratamiento (n=8). Los ratones recibieron un tratamiento IV de 2 mg/kg o bien de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 o 121G12.DAPA.sSPDB.DM4.

No se observó eficacia antitumoral significativa después del tratamiento con el 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 a 2 mg/kg. El tratamiento de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 produjo una parcial regresión/prolongada estasis en 75% (6 de 8) de los ratones con un tratamiento de dosis única (Figura 11). 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 superó fuertemente 121G12.DAPA.sSPDB.DM4 en este modelo (D25 Media volumen tumoral $524,83 \pm 143,20$ frente a $1337,13 \pm 35,13$, respectivamente, $p < 0,001$; prueba de la T sin pares).

Ejemplo 14: Eficacia *in vivo* de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 contra el modelo de tumor de cáncer de pulmón de células no pequeñas primario derivado de paciente HLUX1934.

La actividad antitumoral de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 se evaluó en el modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón de células no pequeñas primario HLUX1934 que expresa CCR7. Se implantaron subcutáneamente a ratones hembras atímicas desnudos (*nude*), fragmentos de tumor en el flanco derecho de cada ratón. Una vez que los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm³, los ratones se asignaron al azar según el volumen del tumor a grupos de tratamiento (n = 8). Los ratones recibieron un tratamiento IV de cualquiera de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 (DAR4) a 10 mg/kg, o un control de isotipo no específico IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 10 mg/kg. Una segunda dosis de cada anticuerpo se suministró 2 semanas más tarde. Todas las dosis se ajustaron a los pesos corporales de los ratones individuales.

El control de isotipo no específico IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 10 mg/kg pareció demorar ligeramente el crecimiento tumoral en relación con el grupo sin tratamiento (valor $\Delta T/\Delta C$ de 53,07%), potencialmente, debido a la unión no específica del anticuerpo a un sitio fuera de objetivo en el modelo HLUX1934. El tratamiento de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 logró una eficacia más pronunciada que se sostuvo con la administración de la segunda dosis. La dosis de 10 mg/kg del tratamiento de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 fue bien tolerada, sin pérdida de peso corporal evidente y un valor $\Delta T/\Delta C$ de 18,83% el D34 posimplante (Figura 12, Tabla 24).

Tabla 24: Eficacia de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 en el modelo derivado de paciente de NSCLC HLUX1934. El experimento se evaluó el día 34 posimplante (D23 postratamiento).

Tratamiento	Dosis	Respuesta tumoral	Respuesta del huésped	
		$\Delta T/\Delta C$ (%)	Δ Peso corporal (%)	Sobrevida (vivos/total)
Sin tratamiento	Ninguna	100	5,12	5/8**
IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4	10 mg/kg	53,07	2,81	8/8
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	10 mg/kg	18,83*	0,61	8/8

* p <0,001 frente al grupo de control sin tratamiento (ANOVA unilateral/Prueba de comparación múltiple de Tukey). % $\Delta T/\Delta C$ = 100 $\Delta T/\Delta C$ donde: ΔT = media de volumen tumoral del grupo tratado con fármaco en D34 del estudio – media de volumen tumoral del grupo tratado con fármaco en el día inicial de la dosificación; ΔC = media de volumen tumoral

del grupo de control en el D34 del estudio – media de volumen tumoral del grupo control en el día inicial de la dosificación. Δ peso corporal (%) = (Media de peso corporal en D34 – media de peso corporal en D11) * 100/Media de peso corporal en D11 del tratamiento. ** Ratones sometidos a eutanasia en el grupo sin tratamiento debido a la carga tumoral excesiva D25–D27 posterior al tratamiento.

Ejemplo 15: Eficacia *in vivo* de 684E12.SMCC.DM1 contra el modelo de xenoinjerto de mieloma múltiple KE97 en ratones SCID–Beige.

Para demostrar la actividad antitumoral dirigida de 684E12.SMCC.DM1 *in vivo*, se estableció el modelo de xenoinjerto KE97 en ratones hembras SCID–beige mediante inyección subcutánea de 3×10^6 células en el flanco derecho de cada ratón. Una vez que los tumores alcanzaron aproximadamente 200 mm³, los ratones se asignaron al azar según el volumen del tumor en grupos de tratamiento (n = 8 por grupo). Los ratones recibieron un tratamiento IV de cualquiera de 684E12.SMCC.DM1 parental (DAR 2,6) en una dosis final de 2 o 6 mg/kg, o un control de isotipo no específico IgG1.SMCC.DM1 a 6 mg/kg. Todas las dosis se ajustaron al peso corporal individual de los ratones.

Todos los agentes de prueba fueron tolerados en el estudio, y no se observaron síntomas clínicos evidentes de toxicidad o pérdida de peso corporal en ninguno de los grupos de tratamiento. No se observó una eficacia antitumoral significativa después del tratamiento con el control de isotipo no específico IgG1.SMCC.DM1 o 684E12.SMCC.DM1 parental a 2 mg/kg. El tratamiento con 6 684E12.SMCC.DM1 parental dio como resultado un valor de $\Delta T/\Delta C$ de 6,72% en D11 posdosificación (p <0,0001, ANOVA unilateral/Prueba de comparación múltiple de Tukey) (Figura 13).

Ejemplo 16: Modulación de marcador farmacodinámico *in vivo* en el objetivo, por 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 en el modelo de tumor KE97.

La acumulación de células tumorales positivas para el marcador de fosfohistona H3 después del tratamiento con 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 se usó para evaluar la capacidad del ADC anti–CCR7 para inducir la detención de G2/M *in vivo*.

Se condujo un estudio en el que se estableció un modelo de xenoinjerto KE97 en ratones hembras SCID–beige mediante la inyección subcutánea de 3×10^6 células en el flanco derecho de cada ratón. Una vez que los tumores alcanzaron aproximadamente 140 mm³, los ratones se asignaron al azar según el volumen del tumor en grupos de tratamiento (n = 3 por grupo). Los ratones recibieron un solo tratamiento IV de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 en una dosis final de 2, 5 o 10 mg/kg, o un control de isotipo no específico

IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 10 mg /kg. Todas las dosis se ajustaron al peso corporal individual de los ratones. Luego de 48 horas del tratamiento, se recogieron los tumores para evaluar los niveles de fosfohistona H3 mediante tinción inmunohistoquímica como se describe a continuación.

5 A fin de medir la acumulación de núcleos positivos de fosfohistona H3 por inmunohistoquímica, se obtuvo un anticuerpo policlonal de conejo dirigido a los residuos que rodean la Serina 10 fosforilada de la histona H3 humana, de Ventana Medical Systems (Tuscon, AZ, Cat. Nro. 760–4591). El protocolo IHC incluyó exposición a calor y leve (32 min) al reactivo de recuperación de antígeno Ventana Discovery Cell Conditioner 1. Las muestras se
10 incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo primario (prediluido por el fabricante). Posteriormente, la incubación con Ab OmniMap anti-conejo HRP secundario (Ventana, Tuscon, AZ, Nro. de catálogo 760–4311) se realizó durante 12 minutos (diluido previamente por el fabricante).

En la Figura 14A, aunque el representante de sin tratamiento y control de isotipo
15 IgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 muestra células tumorales ocasionales positivas para la fosfo-histona H3, se detecta un aumento robusto dependiente de la dosis en la inmunotinción de fosfo-histona H3 48 horas después administración de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4. La cuantificación de la señal se realizó utilizando MatLab (MathWorks, Natick MA) donde el área total de la señal de fosfo-histona H3 (μm^2)
20 se normalizó por el área total de los núcleos (μm^2), de manera de generar los valores de la relación de fosfo-histona H3 (%) que se muestran a continuación para cada uno de los grupos de tratamiento. Estos datos en la Figura 14B indican que 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 es capaz de provocar una fuerte detención G2/M en los xenoinjertos tumorales, consistente con el mecanismo de acción esperado de la carga útil.

25 **Ejemplo 17: Proceso para la producción del anticuerpo 121G12.CysMab.DAPA.**

Este ejemplo describe un proceso para producir el anticuerpo de CCR7 121G12.CysMab.DAPA a partir de un cultivo celular, en el que el Ab se expresa a partir de un vector que codifica el Ab. Una vez que el Ab se expresa en el cultivo celular, el Ab se purifica del cultivo celular de la siguiente manera:

30 La primera etapa en el proceso de purificación del intermediario de sustancia farmacológica anticuerpo 121G12.CysMab.DAPA consiste en la eliminación de células mediante filtración en profundidad en línea, seguida de una filtración de 0,2 μm .

La segunda etapa consiste en una etapa de cromatografía líquida de afinidad de Proteína A. De acuerdo con la cantidad total del producto a granel, esta etapa se realiza en varias ejecuciones. Cada ejecución permite una carga máxima de aproximadamente 20 g/L de volumen de columna. La elución se realiza con ácido acético 50 mM a aproximadamente pH 3,0. La temperatura de operación es de 18–28°C. Todos los eluatos se agrupan y se almacenan a 2–8°C antes de la etapa de inactivación del virus.

La etapa tres es una inactivación del virus de “tratamiento de pH bajo”. La solución intermedia de la etapa 2 se ajusta a 18–28°C y un ajuste del pH a 3,5 (rango 3,4–3,6). La solución intermedia de producto se mantiene luego para la inactivación del virus durante 70 minutos (rango 60–90 minutos). Después del tiempo de mantenimiento, la solución se ajusta a pH 6,0 (rango 5,8–6,2). Al final de la etapa, la solución se filtra en profundidad en línea con una filtración de 0.2 µm y se almacena a 2–8°C.

La cuarta etapa es una cromatografía de intercambio catiónico en modo de enlace/elución que incluye una reducción integrada en la columna. De acuerdo con la valoración, esta etapa se realiza en varias ejecuciones. Cada ejecución permite una carga de aproximadamente 30 g/L de volumen de columna. La columna se equilibra con tampón A que contiene succinato de sodio 20 mM, pH 6,0. La reducción en columna se realiza utilizando fosfato de sodio 20 mM, EDTA 1 mM, L-cisteína 7 mM, pH 7,1, como tampón de reducción. El tampón de reducción se elimina con el tampón A, y la elución se realiza con un gradiente lineal del 10% al 90% con el tampón A y el tampón B con succinato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 300 mM, pH 6,0. Los eluatos y las reservas pueden almacenarse a 2–8°C antes de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico multimodal.

La quinta etapa del proceso es una cromatografía de intercambio aniónico en modo de flujo continuo. De acuerdo con la valoración, esta etapa se realiza en varias ejecuciones. Cada ejecución permite una carga máxima de aproximadamente 350 g/L de volumen de columna. La temperatura de operación es de 18–28°C. El equilibrio se realiza con succinato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 119 mM, pH 6,0. El percolado final se almacena a 2–8°C antes de la etapa de eliminación del virus.

La filtración de virus, etapa seis, consiste en una prefiltración con un filtro de 0,1 µm seguido de una filtración de virus con un nanofiltro Planova 20N. La temperatura de la solución intermedia de la Etapa 5 se ajusta a 18–28°C antes de la filtración del virus. La temperatura de operación es de 18–28°C. Después de la nanofiltración, el intermediario se almacena a 2–8°C o 18–28°C.

La séptima etapa, ultrafiltración/diafiltración, consiste en un paso de concentración ascendente a aproximadamente 70 g/L seguido de un primer paso de diafiltración con fosfato de potasio 10 mM, pH 6,0. Se selecciona un factor de intercambio de diafiltración de por lo menos 7, seguido de una dilución a aproximadamente 50 g/L. El intermediario de sustancia de fármaco final es filtrado con 0,2 μ m y almacenado a 2–8°C.

En la octava y última etapa, con el intermediario de sustancia de fármaco a granel final se llenan en alícuotas recipientes adecuados, que se almacenan a menos de –60°C después de la congelación.

Tabla 25. Diagrama de flujo del proceso de purificación y reducción.

Etapas	Operación
Etapas 1	Recolección, eliminación de células y filtración
Etapas 2	Cromatografía de afinidad (MabSelect SuRE)
Etapas 3	Inactivación de virus a pH 3,5
Etapas 4	Cromatografía de intercambio catiónico y Reducción en columna (Fractogel EMD SO3 (M))
Etapas 5	Cromatografía de intercambio aniónico multimodal (Capto adherencia)
Etapas 6	Eliminación de virus por nanofiltración (Planova 20N)
Etapas 7	Ultrafiltración/Diafiltración y filtración final
Etapas 8	Llenado y congelación en profundidad

Ejemplo 18: Eficacia *in vivo* dependiente de la dosis, de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 contra el modelo de xenoinjerto OCI-LY3 ABC-DLBCL en ratones NSG.

A fin de demostrar la actividad antitumoral dirigida de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 *in vivo* en un modelo ABC-DLBCL, se estableció un modelo de xenoinjerto OCI-LY3 en ratones NSG hembras mediante inyección subcutánea de 10×10^6 células en el flanco derecho de cada ratón. Una vez que los tumores alcanzaron aproximadamente 140 mm^3 , los ratones se asignaron al azar según el volumen del tumor en grupos de tratamiento ($n = 6$ por grupo). Los ratones recibieron un tratamiento IV de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 (DAR4) en una dosis final de 0,5, 1 o 2 mg/kg o un control de isotipo no específico hIgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 en 2 mg/kg el día 1 y el día 15 del estudio. Todas las dosis se ajustaron al peso corporal individual de los ratones. Todos los agentes de prueba fueron tolerados en el estudio, y no se observaron síntomas clínicos evidentes de toxicidad o pérdida de peso corporal en ninguno de los grupos de tratamiento (Tabla 26).

No se observó eficacia antitumoral significativa después del tratamiento con el control de isotipo no específico hIgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 2 mg/kg. El tratamiento con 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 produjo una eficacia antitumoral dependiente de la dosis, con un valor de $\Delta T/\Delta C$ de 74,6% (0,5 mg/kg) y 10,7% (1 mg/kg), mientras que 2 mg/kg de dosis condujo a una media de regresión del 65,9% al día 28 del estudio. Tres de 6 ratones en el grupo de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4, 2 mg/kg, mostraron una regresión completa (Figura 15).

Tabla 26: Eficacia de respuesta a la dosis de ADC anti-CCR7 en el modelo de xenoinjerto OCI-LY3 en el Día 28 del tratamiento.

Tratamiento	Dosis, programa	Respuesta tumoral		Respuesta del huésped	
		$\Delta T/\Delta C$ (%)	Regres. (%)	Δ Peso corp. (%)	Sobrevivida (vivos/total)
Sin tratamiento	Ninguno	100,0	—	5,6	6/6
hIgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4	2 mg/kg dosificados D1 y D15	119,7	—	1,8	5/6
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	0.5 mg/kg dosificados D1 y D15	74,6	—	3,5	5/6
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	1 mg/kg dosificados D1 y D15	10,7**		2,9	6/6
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	2 mg/kg	—	65,9**	-0,8	6/6

	dosificados D1 y D15				
--	-------------------------	--	--	--	--

El experimento se evaluó en el Día 28 del tratamiento, ** $p < 0,005$ frente al grupo de control sin tratamiento (ANOVA unilateral/Prueba de comparaciones múltiples de Tukey). % $\Delta T/\Delta C = 100 \Delta T/\Delta C$ donde: ΔT = media de volumen tumoral del grupo tratado con fármaco en D28 del estudio – media de volumen tumoral del grupo tratado con fármaco en el día inicial de la dosificación; ΔC = media de volumen tumoral del grupo de control en D28 del estudio – media de volumen tumoral del grupo de control en el día inicial de la dosificación D1. % Regresión = $(1 - T_{\text{final}}/T_{\text{inicial}}) \times 100$, que se calculó si $\Delta T < 0$, donde T_{final} es la media de volumen tumoral en D28, y T_{inicial} se define como el volumen tumoral en D1 del tratamiento. Δ peso corporal (%) = $(\text{Media de peso corporal D28} - \text{media de peso corporal D1}) * 100 / \text{Media de peso corporal D1 del tratamiento}$.

Ejemplo 19: Eficacia *in vivo* dependiente de la dosis, de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 contra el modelo de xenoinjerto Toledo GCB–DLBCL en ratones SCID–bg.

A fin de demostrar la actividad antitumoral dirigida de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 *in vivo* en un modelo GCB–DLBCL, se estableció un modelo de xenoinjerto Toledo en ratones Scid–bg hembras mediante la inyección subcutánea de 3×10^6 células en el flanco derecho de cada ratón. Una vez que los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm^3 , los ratones se asignaron al azar según el volumen del tumor en grupos de tratamiento ($n = 4$ por grupo). Los ratones recibieron un tratamiento IV de o bien 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 (DAR4) en una dosis final de 2 o 5 mg/kg, o un control de isotipo no específico hIgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 5 mg/kg el día 1 y el día 15 de estudio. Todas las dosis se ajustaron al peso corporal individual de los ratones. Todos los agentes de prueba fueron tolerados en el estudio, y no se observaron síntomas clínicos evidentes de toxicidad o pérdida de peso corporal en ninguno de los grupos de tratamiento (Tabla 27).

No se observó eficacia antitumoral significativa después del tratamiento con el control de isotipo no específico hIgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 5 mg/kg. El tratamiento con 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 logró una eficacia antitumoral dependiente de la dosis, con un valor de $\Delta T/\Delta C$ de 52,7% (2 mg/kg) y 20,6% (5 mg/kg) (Figura 16, Tabla 27).

Tabla 27: Eficacia de respuesta a la dosis de ADC anti–CCR7 en el modelo de xenoinjerto Toledo en el Día 20 del tratamiento.

		Respuesta tumoral	Respuesta del huésped
--	--	----------------------	-----------------------

Tratamiento	Dosis, programa	$\Delta T/\Delta C$ (%)	Δ Peso corporal (%)	Sobrevivida (vivos/total)
Sin tratamiento	Ninguno	100.0	4.9	3/6
hIgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4	5 mg/kg dosific. D1 y D15	94.5	1.0	3/6
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	2 mg/kg dosific. D1 y D15	52.7*	3.2	4/6
121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4	5 mg/kg dosific. D1 y D15	20.6 **	0.1	4/6

El experimento se evaluó en el Día 20 del tratamiento, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ frente al grupo de control sin tratamiento (ANOVA unilateral/Prueba de comparación múltiple de Tukey). $\% \Delta T/\Delta C = 100 \Delta T/\Delta C$ donde: ΔT = media de volumen tumoral del grupo tratado con fármaco en D20 del estudio – media de volumen tumoral del grupo tratado con fármaco en el día inicial de la dosificación; ΔC = media de volumen tumoral del grupo de control en D20 del estudio – media de volumen tumoral del grupo control en el día inicial de la dosificación D1. Δ peso corporal (%) = (Media de peso corporal D20 – media de peso corporal D1) * 100/Media de peso corporal D1 del tratamiento.

Ejemplo 20: Eficacia *in vivo* de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 contra el modelo de xenoinjerto DEL ALCL en ratones SCID–bg.

A fin de demostrar la actividad antitumoral dirigida de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 *in vivo* en un modelo de ALCL positivo para CCR7, se estableció un modelo de xenoinjerto DEL en ratones Scid–bg hembras mediante la inyección subcutánea de 3×10^6 células en el flanco derecho de cada ratón. Una vez que los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm^3 , los ratones se asignaron al azar según el volumen del tumor a grupos de tratamiento ($n = 4$ por grupo). Los ratones recibieron un tratamiento IV de o bien 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 (DAR4) en una dosis final de 2 mg/kg, o un control de isotipo no específico isotipo.MPET.DM4 a 2 mg/kg el día 1 y el día 15 de estudio. Todas las dosis se ajustaron al peso corporal individual de los ratones.

No se observó eficacia antitumoral significativa después del tratamiento con el control de isotipo no específico hIgG1.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 2 mg/kg. El tratamiento con 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4, 2 mg/kg, produjo una media de regresión del 40,2% al día 14 del estudio después de una dosis única ($p < 0,01$). Los ratones recibieron una segunda dosis el día 15 y se monitorearon durante tres semanas más. Un animal atípico no respondió a

una segunda dosis de tratamiento y tuvo que ser sacrificado el día 28 debido a la carga tumoral. Un animal adicional mostró una progresión lenta de la enfermedad, y también se eliminó el día 28 para el seguimiento de la expresión del objetivo. Dos de los cuatro ratones continuaron mostrando un impacto sostenido sobre el crecimiento del tumor (Figura 17). Todos los tratamientos fueron bien tolerados, sin pérdida aparente de peso corporal.

Ejemplo 21: Eficacia *in vivo* de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 contra el modelo de tumor HLUX1787 de cáncer de pulmón de células no pequeñas primario derivado de paciente.

Se evaluó la actividad antitumoral de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 en el modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón de células no pequeñas primario HLUX1787 que expresa CCR7. Se implantaron subcutáneamente en ratones hembras NSG fragmentos de tumor en el flanco derecho de cada ratón. Una vez que los tumores alcanzaron aproximadamente 150 mm³, los ratones se asignaron al azar según el volumen del tumor en grupos de tratamiento (n = 6 por grupo). Los ratones recibieron un tratamiento IV de 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 (DAR4) a 0,5, 2 o 5 mg/kg en el día 1, y se administró una segunda dosis 2 semanas después en el día 15. Todas las dosis se ajustaron a los pesos corporales individuales de los ratones.

No se observó una eficacia antitumoral significativa con las dosis más bajas del Ab conjugado; sin embargo, se observaron regresiones parciales o enfermedad estable con el tratamiento con 121G12.CysMab.DAPA.MPET.DM4 a 5 mg/kg. La eficacia tumoral sostenida se observó dos semanas después de la segunda dosis, lo que produjo un valor de $\Delta T/\Delta C$ de 1,3% en D30 del tratamiento (p <0,001; ANOVA unilateral/Prueba de comparaciones múltiples de Tukey) (Figura 18). Todos los tratamientos fueron bien tolerados, sin pérdida aparente de peso corporal.