

ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-SLC34A2 Y SUS USOS

ANTECEDENTES

[0001] Las proteínas transportadoras de la membrana celular, como los transportadores que pertenecen a las familias de transportadores de glucosa GLUT, transportadores de casetes de unión a ATP ABC y transportadores de solutos SLC, con frecuencia están reguladas al alza en las células cancerosas, en comparación con las células normales adyacentes. Se encuentran altos niveles de transportadores en una amplia gama de tumores sólidos, lo que se correlaciona con una supervivencia precaria. Uno de los posibles marcadores tumorales moleculares puede ser el transportador de fosfato dependiente de sodio NaPi2b codificado por el gen SLC34A2 (portador de soluto 34 A2).

[0002] SLC34A2 codifica el cotransportador Na/Pi de tipo II (NaPi2b), que es un transportador de fosfato dependiente de sodio multitransmembrana responsable de la absorción de fosfato inorgánico transcelular. NaPi2b es muy abundante en la membrana del intestino delgado, donde está implicado en el flujo transcelular de fosfatos inorgánicos a través de la membrana apical de las células epiteliales. Se ha reportado una expresión alterada del transportador de fosfato dependiente de sodio NaPi2b en cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de tiroides y otros cánceres.

[0003] Actualmente, NaPi2b es una diana para los anticuerpos terapéuticos XMT-1536 y RG-7599, que se encuentran en ensayos clínicos para el tratamiento de los cánceres de ovario y pulmón. Es necesario desarrollar candidatos clínicos más eficaces y seguros dirigidos a esta proteína.

RESUMEN

[0004] Aquí se revelan anticuerpos anti-SLC34A2 que tienen una alta afinidad de unión a la proteína SLC34A2 humana y son eficientes en la mediación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) e inducen la citotoxicidad. En comparación con dos anticuerpos de referencia, XMT-1536 y RG-7599, los anticuerpos descubiertos instantáneamente mostraron una mayor afinidad de unión general, una reactividad entre especies muy mejorada, un ADCC más potente y citotoxicidad. Estos anticuerpos, por lo tanto, pueden utilizarse adecuadamente para tratar enfermedades como el cáncer.

[0005] En una realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene especificidad para la proteína SLC34A2 humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una cadena ligera de región variable de cadena ligera que comprende las regiones determinantes de complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3.

[0006] También se proporcionan, en algunas realizaciones, polinucleótidos que codifican el anticuerpo o fragmento, y composiciones que comprenden el anticuerpo o fragmento del mismo y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0007] También se proporcionan métodos y usos para el tratamiento de enfermedades y afecciones. En una realización, se proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que lo necesita, que comprende la administración al paciente del anticuerpo o fragmento del mismo de la presente divulgación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0008] Las figuras 1A-B muestran la afinidad de unión de los anticuerpos quiméricos a los SLC34A2 expresados endógenamente en las células OVCAR3.

[0009] Las FIG. 2A-B muestran la afinidad de unión de los anticuerpos quiméricos a los anticuerpos quiméricos a los SLC34A2 humanos expresados en las células HEK293.

[0010] La figura 3 muestra la afinidad de unión de los anticuerpos quiméricos a los SLC34A2 humanos en las células RMG-1.

[0011] La figura 4 muestra la afinidad de unión de los anticuerpos quiméricos contra Rhesus SLC34A2 expresados en células HEC293.

[0012] La figura 5 muestra la afinidad de unión de los anticuerpos quiméricos a Cyno SLC34A2 expresados en células CHC-K1.

[0013] Las FIG. 6A-B muestran la afinidad de unión de los anticuerpos quiméricos a rata (6A) y ratón (6B) SLC34A2 expresados en células HEC293.

[0014] Las figuras 7A-B muestran la actividad ADCC de los anticuerpos quiméricos contra las células HEC293 que expresan SLC34A2 humana.

[0015] Las figuras 8A-B muestran la actividad citotóxica de los anticuerpos quiméricos contra las células HEC293 que expresan SLC34A2 humana.

[0016] Las figuras 9A-C muestran la actividad de unión de los anticuerpos sin riesgo PTM a las células HEC293 que expresan SLC34A2 humanas.

[0017] La figura 10 muestra la actividad de unión de los anticuerpos sin riesgo PTM a SLC34A2 expresados endógenamente en células OVCAR3.

[0018] La FIG. 11 muestra la actividad de unión de los anticuerpos sin riesgo PTM a Rhesus SLC34A2 se experimentan en las células HEC293.

[0019] Las FIG. 12A-D muestran la actividad de unión de los anticuerpos humanizados a los SLC34A2 expresados endógenamente en las células OVCAR3.

[0020] Las figuras 13A-D muestran la actividad de unión de los anticuerpos humanizados a los SLC34A2 humanos en diferentes tipos de células.

[0021] La figura 14 muestra la actividad de unión de los anticuerpos humanizados contra Rhesus SLC34A2 se muestra en las células HEC293.

[0022] La figura 15 muestra la actividad de unión de los anticuerpos humanizados a los anticuerpos humanizados en rata SLC34A2 se expone en las células HEC293.

[0023] La figura 16 muestra la actividad de unión de los anticuerpos humanizados a los SLC34A2 de ratón en células HEC293.

[0024] La figura 17 muestra la actividad ADCC de los anticuerpos humanizados contra las células HEC293 que expresan SLC34A2 humano.

[0025] En la figura 18 se comparan los anticuerpos humanizados seleccionados con los de referencia con respecto a la unión SLC34A2 en diferentes líneas celulares.

[0026] En la figura 19 se compara la reactividad cruzada de los anticuerpos humanizados seleccionados con los de referencia.

[0027] En la figura 20A-B se comparan los anticuerpos humanizados seleccionados con los de referencia con respecto a las actividades de ADCC frente a diferentes células.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

[0028] Cabe señalar que el término "un" o "una" entidad se refiere a una o más de esa entidad; Por ejemplo, se entiende que "un anticuerpo" representa uno o más anticuerpos. Como tal, los términos "a" (o "un"), "uno o más" y "al menos uno" pueden usarse indistintamente en este documento.

[0029] Tal como se utiliza en este documento, el término "polipéptido" está destinado a abarcar un "polipéptido" singular, así como "polipéptidos" plurales, y se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) unidos linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Por lo tanto, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácidos" o cualquier otro término utilizado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, se incluyen dentro de la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" puede usarse en lugar de, o indistintamente con cualquiera de estos términos. El término "polipéptido" también se refiere a los productos de las modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, incluidas, entre otras, la glicosilación, la acetilación, la fosforilación, la amidación, la derivatización por grupos protectores/bloqueadores conocidos, la escisión proteolítica o la modificación por aminoácidos no naturales. Un polipéptido puede derivarse de una fuente biológica natural o producirse mediante tecnología recombinante, pero no necesariamente se traduce a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Puede generarse de cualquier manera, incluso por síntesis química.

[0030] "Homología" o "identidad" o "similitud" se refiere a la similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. La homología se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que puede estar alineada con fines de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. Un grado de homología entre secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las secuencias. Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte menos del 40% de identidad, aunque preferiblemente menos del 25% de identidad, con una de las secuencias de la presente divulgación.

[0031] Una región polinucleótido o polinucleótido (o una región polipeptídica o polipeptídica) tiene un cierto porcentaje (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %) de "identidad de secuencia" con otra secuencia significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son las mismas al comparar las dos secuencias.

[0032] El término "un ácido nucleico o polinucleótido equivalente" se refiere a un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene un cierto grado de homología, o identidad de secuencia, con la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico o complemento del mismo. Un homólogo de un ácido nucleico bicatenario incluye ácidos nucleicos que tienen una secuencia de nucleótidos que tiene un cierto grado de homología con o con el complemento del mismo. En un aspecto, los homólogos de los ácidos nucleicos son capaces de hibridarse con el ácido nucleico o complemento del mismo. Del mismo modo, "un polipéptido equivalente" se refiere a un polipéptido que tiene un cierto grado de homología, o identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de referencia. En algunos aspectos, la identidad de la secuencia es al menos alrededor del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%. En algunos aspectos, el polipéptido o polinucleótido equivalente tiene una, dos, tres, cuatro o cinco adiciones, delección, sustitución y sus combinaciones de las mismas en comparación con el polipéptido o polinucleótido de referencia. En algunos aspectos, la secuencia equivalente conserva la actividad (*por ejemplo*, la unión al epítipo) o la estructura (*por ejemplo*, el puente de sal) de la secuencia de referencia.

[0033] Tal como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo" o "polipéptido de unión a antígenos" se refiere a un polipéptido o un complejo polipeptídico que reconoce y se une específicamente a un antígeno. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo completo y cualquier fragmento de unión al antígeno o una sola cadena del mismo. Por lo tanto, el término "anticuerpo" incluye cualquier molécula que contenga proteínas o péptidos que comprenda al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina que tenga actividad biológica de unión al antígeno. Ejemplos de tales incluyen, pero no se limitan a una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión al ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región marco (FR), o cualquier porción de la misma, o al menos una porción de una proteína de unión.

[0034] Los términos "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión al antígeno", tal como se utilizan en el presente documento, son una porción de un anticuerpo como F(ab')₂, F(ab)₂,

Fab', Fab, Fv, scFv y similares. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto. El término "fragmento de anticuerpo" incluye aptámeros, spiegelmers y diacuerpos. El término "fragmento de anticuerpo" también incluye cualquier proteína sintética o modificada genéticamente que actúe como un anticuerpo al unirse a un antígeno específico para formar un complejo.

[0035] Un "fragmento variable de cadena simple" o "scFv" se refiere a una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) de las inmunoglobulinas. En algunos aspectos, las regiones están conectadas con un péptido enlazador corto de diez a aproximadamente 25 aminoácidos. El enlazador puede ser rico en glicina para mayor flexibilidad, así como en serina o treonina para la solubilidad, y puede conectar el extremo N-terminal del VH con el extremo C del VL, o viceversa. Esta proteína conserva la especificidad de la inmunoglobulina original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y la introducción del enlazador. Las moléculas de ScFv son conocidas en la técnica y se describen, por *ejemplo*, en la patente estadounidense 5.892.019.

[0036] El término anticuerpo abarca varias clases amplias de polipéptidos que se pueden distinguir bioquímicamente. Los expertos en la materia apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre ellas (p. ej., γ 1- γ 4). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos), p. ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgG₅, etc., están bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles para el artesano experto en vista de la divulgación instantánea y, en consecuencia, están dentro del alcance de la divulgación instantánea. Todas las clases de inmunoglobulinas están claramente dentro del alcance de la presente divulgación, la siguiente discusión generalmente se dirigirá a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a la IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos de peso molecular de aproximadamente 23.000 Daltons, y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos de peso molecular de 53.000 a 70.000. Las cuatro cadenas suelen estar unidas por enlaces disulfuro en una configuración "Y" en la que las cadenas ligeras enmarcan a las cadenas pesadas comenzando en la boca de la "Y" y continuando a través de la región variable.

[0037] Los anticuerpos, los polipéptidos de unión a antígenos, las variantes o sus derivados incluyen, entre otros, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos de cadena simple, fragmentos de unión a epítomos, *por ejemplo*, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs, Fvs de cadena simple (scFv), anticuerpos de cadena simple, Fvs unidos a disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden un dominio VK o VH, fragmentos producidos por un Biblioteca de expresión Fab y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluidos, *por ejemplo*, los anticuerpos anti-Id contra los anticuerpos LIGHT descritos en este documento). Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpos de la divulgación pueden ser de cualquier tipo (*p. ej.*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (*p. ej.*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

[0038] Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda (K, λ). Cada clase de cadena pesada puede estar ligada con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas están unidas covalentemente entre sí, y las partes de la "cola" de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas son generadas por hibridomas, células B o células huésped modificadas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos van desde un extremo N en los extremos bifurcados de la configuración Y hasta el extremo C en la parte inferior de cada cadena.

[0039] Tanto las cadenas ligeras como las pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se utilizan funcionalmente. En este sentido, se apreciará que los dominios variables de las porciones de cadena ligera (VK) y pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad del antígeno. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CK) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren importantes propiedades biológicas 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 la región constante aumenta a medida que se vuelven más distales del sitio de unión al antígeno o aminoterminal del anticuerpo. La porción N-terminal es una región variable y en la porción C-terminal es una región constante; los dominios CH3 y CK comprenden en realidad el extremo carboxiterminal de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

[0040] Como se indicó anteriormente, la región variable permite que el anticuerpo reconozca selectivamente y se una específicamente a los epítomos de los antígenos. Es decir, el dominio VK y el dominio VH, o subconjunto de las regiones determinantes de complementariedad

(CDR), de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión al antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo cuaternario forma el sitio de unión al antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión al antígeno está definido por tres CDR en cada una de las cadenas VH y VK (*es decir*, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3). En algunos casos, *por ejemplo*, ciertas moléculas de inmunoglobulina derivadas de especies de camélidos o diseñadas a partir de inmunoglobulinas de camélidos, una molécula de inmunoglobulina completa puede consistir solo en cadenas pesadas, sin cadenas ligeras. Véase, *por ejemplo*, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993).

[0041] En los anticuerpos naturales, las seis "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" presentes en cada dominio de unión al antígeno son secuencias cortas y no contiguas de aminoácidos que se posicionan específicamente para formar el dominio de unión al antígeno a medida que el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de los aminoácidos en los dominios de unión al antígeno, denominados regiones "marco", muestran menos variabilidad intermolecular. Las regiones marco adoptan en gran medida una conformación de β hojas y los CDR forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de β láminas. Por lo tanto, las regiones marco actúan para formar un andamio que proporciona la posición de los CDR en la orientación correcta mediante interacciones no covalentes entre cadenas. El dominio de unión al antígeno formado por los CDRs posicionados define una superficie complementaria al epítipo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo afín. Los aminoácidos que componen los CDRs y las regiones marco, respectivamente, pueden ser fácilmente identificados para cualquier región variable de cadena pesada o ligera dada por alguien con habilidad ordinaria en la técnica, ya que han sido definidos con precisión (ver "Secuencias de proteínas de interés inmunológico", Kabat, E., *et al.*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., (1983); y Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)).

[0042] En el caso de que haya dos o más definiciones de un término que se utilicen y/o acepten en el arte, la definición del término tal como se utiliza en el presente documento pretende incluir todos esos significados, a menos que se indique explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término "región determinante de la complementariedad" ("CDR") para describir los sitios de combinación de antígenos no contiguos que se encuentran dentro de la

región variable de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Esta región en particular ha sido descrita por Kabat *et al.*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, "Secuencias de proteínas de interés inmunológico" (1983) y por Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), que se incorporan aquí por referencia en su totalidad. Las definiciones de CDR según Kabat y Chothia incluyen superposición o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquiera de las definiciones para referirse a un CDR de un anticuerpo o a sus variantes está comprendida en el ámbito del término tal como se define y utiliza en el presente documento. Los residuos de aminoácidos apropiados que abarcan los CDR definidos por cada una de las referencias citadas anteriormente se presentan en la siguiente tabla a modo de comparación. Los números exactos de residuos que abarcan un CDR en particular variarán según la secuencia y el tamaño del CDR. Los expertos en la materia pueden determinar de forma rutinaria qué residuos componen un CDR en particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

	Kabat	Chothia
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32
CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

[0043] Kabat *et al.* también definieron un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Una habilidad ordinaria en la técnica puede asignar sin ambigüedades este sistema de "numeración Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la secuencia misma. Tal como se utiliza en el presente documento, la "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración establecido por Kabat *et al.*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., "Secuencia de proteínas de interés inmunológico" (1983).

[0044] Además de la tabla anterior, el sistema numérico de Kabat describe las regiones CDR de la siguiente manera: CDR-H1 comienza aproximadamente en el aminoácido 31 (*es decir*, aproximadamente 9 residuos después del primer residuo de cisteína), incluye aproximadamente 5-7 aminoácidos y termina en el siguiente residuo de triptófano. CDR-H2 comienza en el decimoquinto residuo después del final de CDR-H1, incluye aproximadamente 16-19 aminoácidos y termina en el siguiente residuo de arginina o lisina. CDR-H3 comienza aproximadamente en el trigésimo tercer residuo de aminoácidos después del final de CDR-H2; Incluye de 3 a 25 aminoácidos; y termina en la secuencia W-G-X-G, donde X es cualquier

aminoácido. CDR-L1 comienza aproximadamente en el residuo 24 (*es decir*, después de un residuo de cisteína); incluye aproximadamente de 10 a 17 residuos; y termina en el siguiente residuo de triptófano. CDR-L2 comienza aproximadamente en el decimosexto residuo después del final de CDR-L1 e incluye aproximadamente 7 residuos. CDR-L3 comienza aproximadamente en el trigésimo tercer residuo después del final de CDR-L2 (*es decir*, después de un residuo de cisteína); incluye aproximadamente 7-11 residuos y termina en la secuencia F o W-G-X-G, donde X es cualquier aminoácido.

[0045] Los anticuerpos divulgados en este documento pueden ser de cualquier origen animal, incluidas aves y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son humanos, murinos, burros, conejos, cabras, conejillos de indias, camellos, llamas, caballos o pollos. En otra realización, la región variable puede ser de origen condrictioide (*por ejemplo*, de tiburones).

[0046] Tal como se utiliza en este documento, el término "región constante de cadena pesada" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una región constante de cadena pesada comprende al menos uno de: un dominio CH1, un dominio de bisagra (*por ejemplo*, región de bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3 o una variante o fragmento del mismo. Por ejemplo, un polipéptido de unión a antígeno para su uso en la divulgación puede comprender una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio bisagra y un dominio CH2; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio bisagra y un dominio CH3, o una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la divulgación comprende una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3. Además, un anticuerpo para su uso en la divulgación puede carecer de al menos una parte de un dominio CH2 (*por ejemplo*, todo o parte de un dominio CH2). Como se ha expuesto anteriormente, se comprenderá por alguien con habilidad ordinaria en la técnica que la región constante de la cadena pesada puede modificarse de tal manera que varíen en la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina que se produce naturalmente.

[0047] La región constante de cadena pesada de un anticuerpo descrita en este documento puede derivarse de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una región constante de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH1 derivado de

una molécula de IgG₁ y una región bisagra derivada de una molécula de IgG₃. En otro ejemplo, una región constante de cadena pesada puede comprender una región bisagra derivada, en parte, de una molécula de IgG₁ y, en parte, de una molécula de IgG₃. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG₁ y, en parte, de una molécula de IgG₄.

[0048] Tal como se utiliza en este documento, el término "región constante de cadena ligera" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de la cadena ligera de anticuerpos. Preferiblemente, la región constante de la cadena ligera comprende al menos una de un dominio kappa constante o un dominio lambda constante.

[0049] Un "par de cadena ligera-cadena pesada" se refiere a la colección de una cadena ligera y una cadena pesada que pueden formar un dímero a través de un enlace disulfuro entre el dominio CL de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

[0050] Como se indicó anteriormente, las estructuras de las subunidades y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "dominio VH" incluye el dominio variable amino terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina y el término "dominio CH1" incluye el primer dominio de la región constante (más amino terminal) de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio CH1 es adyacente al dominio VH y es amino terminal a la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.

[0051] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "dominio CH2" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que se extiende, *por ejemplo*, desde aproximadamente el residuo 244 hasta el residuo 360 de un anticuerpo utilizando esquemas de numeración convencionales (residuos 244 a 360, sistema de numeración Kabat; y residuos 231-340, sistema de numeración de la UE; véase Kabat *et al.*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, "Secuencias de proteínas de interés inmunológico" (1983). El dominio CH2 es único en el sentido de que no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, dos cadenas de carbohidratos ramificados enlazadas con N se interponen entre los dos dominios CH2 de una molécula IgG nativa intacta. También está bien documentado que el dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 hasta el terminal C de la molécula IgG y comprende aproximadamente 108 residuos.

[0052] Tal como se utiliza en este documento, el término "región bisagra" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 con el dominio CH2. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible, lo que permite que las dos regiones de unión al antígeno N-terminal se muevan de forma independiente. Las regiones de bisagra se pueden subdividir en tres dominios distintos: dominios de bisagra superior, medio e inferior (Roux *et al.*, *J. Immunol* 161:4083 (1998)).

[0053] Tal como se usa aquí, el término "enlace disulfuro" incluye el enlace covalente formado entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace disulfuro o puente con un segundo grupo tiol. En la mayoría de las moléculas de IgG naturales, las regiones CH1 y CK están unidas por un enlace disulfuro y las dos cadenas pesadas están unidas por dos enlaces disulfuro en las posiciones correspondientes a 239 y 242 utilizando el sistema de numeración de Kabat (posición 226 o 229, sistema de numeración de la UE).

[0054] Tal como se utiliza en el presente documento, se entenderá por "anticuerpo quimérico" cualquier anticuerpo en el que la región o el sitio inmunorreactivo se obtenga o se derive de una primera especie y la región constante (que puede estar intacta, parcial o modificada de acuerdo con la divulgación instantánea) se obtenga de una segunda especie. En ciertas realizaciones, la región o sitio de unión objetivo procederá de una fuente no humana (*por ejemplo*, ratón o primate) y la región constante es humana.

[0055] Tal como se utiliza en este documento, el "porcentaje de humanización" se calcula determinando el número de diferencias de aminoácidos marco (*es decir*, diferencia no CDR) entre el dominio humanizado y el dominio germinal, restando ese número del número total de aminoácidos y luego dividiéndolo por el número total de aminoácidos y multiplicándolo por 100.

[0056] Por "se une específicamente" o "tiene especificidad a", generalmente se significa que un anticuerpo se une a un epítipo a través de su dominio de unión al antígeno, y que la unión implica cierta complementariedad entre el dominio de unión al antígeno y el epítipo. De acuerdo con esta definición, se dice que un anticuerpo se "une específicamente" a un epítipo cuando se une a ese epítipo, a través de su dominio de unión al antígeno más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo aleatorio no relacionado. El término "especificidad" se utiliza aquí para calificar la afinidad relativa por la cual un determinado anticuerpo se une a un determinado epítipo. Por ejemplo, se puede considerar que el anticuerpo "A" tiene una especificidad más

alta para un epítopo dado que el anticuerpo "B", o se puede decir que el anticuerpo "A" se une al epítopo "C" con una especificidad mayor que la que tiene para el epítopo relacionado "D".

[0057] Tal como se utilizan en este documento, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, como la progresión del cáncer. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, el alivio de los síntomas, la disminución de la extensión de la enfermedad, el *estado de la enfermedad estabilizado (es decir, que no empeora)*, el retraso o la ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de la enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. El "tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Las personas que necesitan tratamiento incluyen a las que ya tienen la afección o el trastorno, así como a las propensas a tener la afección o el trastorno o aquellos en los que la afección o el trastorno deben prevenirse.

[0058] Por "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero" se entiende cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para el cual se desea un diagnóstico, pronóstico o terapia. Los temas mamíferos incluyen humanos, animales domésticos, animales de granja y animales de zoológico, deportivos o mascotas como perros, gatos, conejillos de indias, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas, etc.

[0059] Tal como se utilizan en el presente documento, frases como "a un paciente que necesita tratamiento" o "un sujeto que necesita tratamiento" incluyen sujetos, como sujetos mamíferos, que se beneficiarían de la administración de un anticuerpo o de la composición de la presente divulgación utilizada, *por ejemplo*, para la detección, para un procedimiento de diagnóstico y/o para el tratamiento.

Anticuerpos anti-SLC34A2

[0060] La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-SLC34A2 y fragmentos que tienen alta afinidad con la proteína SLC34A2 humana, son potentes para mediar ADCC y citotoxicidad, y pueden inducir endocitosis de manera efectiva.

[0061] Además, estos anticuerpos han sido ampliamente probados en comparación con dos anticuerpos de referencia, XMT-1536 y RG-7599, que están en desarrollo clínico. Los nuevos

anticuerpos superaron a los dos anticuerpos de referencia en términos de afinidad de unión general, reactividad entre especies, ADCC y citotoxicidad. Estos anticuerpos, por tanto, son agentes adecuados para tratar diversas enfermedades caracterizadas por SLC34A2 sobreexpresadas, como el cáncer.

[0062] Por lo tanto, de acuerdo con una realización de la presente divulgación, se proporcionan anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos que puedan unirse a SLC34A2. Ejemplos de anticuerpos incluyen los murinos enumerados en la **Tabla 1** (por *ejemplo*, 30-H9(B8)F9, 62-G10(E4)G8, 63-A11(D5)B4, 91-C9F1, 7-F4C4, 94-B10A8, 94-E9B12, 67-C9G11, 90-G10H7, 11-F6H8, 84-F2D10, 26-C5D2, 7-G10E11, 25-B11B9, 62-C10(B3)D2, 55-E5(B6)D12, 28-G3(C6)B9, 18-G1H4, 16-E5D10, 69-B11D8, 71-F7D4, 78-D1B10, 87-H12B7, 20-H2F1 y 95-H11A1D8), así como los humanizados de **las Tablas 12-15**. También se incluyen aquellos que incluyen los mismos CDR que se ilustran en este documento. En algunas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos revelados incluyen aquellos que se unen al mismo epítipo que los ilustrados aquí, y aquellos que compiten con los revelados instantáneamente en la unión a SLC34A2.

[0063] De acuerdo con una realización de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que incluye los dominios variables de cadena pesada y cadena ligera con las regiones CDR divulgadas en este documento, así como sus equivalentes biológicos.

[0064] En una realización, los CDRs son los de 30-H9(B8)F9 o sus contrapartes humanizadas, como se ejemplifica en la **Tabla 12A**. En una realización, el CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 o una variante de la misma que tiene una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o las combinaciones de las mismas, el CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52 o 57 o una variante de la misma que tiene una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o las combinaciones de las mismas, el CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 o una variante de la misma que tenga una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o las combinaciones de las mismas, el CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54 o una variante de la misma que tenga una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o combinaciones de las mismas, el CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 o una variante de la misma que tiene una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o las combinaciones de las mismas, y el CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 o una

variante de la misma que tiene una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o combinaciones de las mismas.

[0065] Como se muestra en los ejemplos experimentales, el CDRH2 (SEQ ID NO: 57) de 30-H9(B8)F9 incluye un dipéptido NG que probablemente esté sujeto a modificación postraducciona (PTM). En consecuencia, se creó una mutación N=>S para prevenir dicho PTM, y el CDRH2 mutado se refiere a un CDR sin riesgo de PTM. Sin embargo, los datos experimentales han demostrado que la versión sin riesgo de PTM fue tan efectiva como la original.

[0066] En una realización, el CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, el CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, el CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, el CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, el CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, y el CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56. En una realización, el CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, el CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, el CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, el CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, el CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, y el CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56.

[0067] También se proporcionan, en algunas realizaciones, aquellas que incluyen los mismos CDR que 30-H9(B8)F9 o sus contrapartes humanizadas. En algunas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos divulgados incluyen aquellos que se unen al mismo epítipo que 30-H9(B8)F9 o sus contrapartes humanizadas, y aquellos que compiten con cualquiera de ellos en la unión a SLC34A2.

[0068] En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:1 (ratón o quimérico) y 58-61 (humanizado), o un péptido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 (ratón o quimérico) y 58-61 (humanizado).

[0069] En algunas realizaciones, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:2 (ratón o quimérico) y 62-65 (humanizado), o un péptido que tiene al menos un 90% de identidad de

secuencia a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 (ratón o quimérico) y 62-65 (humanizado).

[0070] En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59 y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO:62-65. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID NO: 58-61 y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59 y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62.

[0071] En una realización, los CDR son los de 62-G10(E4)G8 o sus contrapartes humanizadas, como se ejemplifica en la **Tabla 13A**. En una realización, el CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 o una variante de la misma que tiene una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o las combinaciones de las mismas, el CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 o 72 o una variante de la misma que tiene una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o las combinaciones de las mismas, el CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68 o una variante de la misma que tiene una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o las combinaciones de las mismas, el CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 o una variante de la misma que tiene una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o combinaciones de las mismas, el CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 o una variante de la misma que tiene una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o las combinaciones de las mismas, y el CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 o una variante de la misma que tiene una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o combinaciones de las mismas.

[0072] Uno de los CDR, CDRH2, también incluía un posible sitio PTM, NG, que por lo tanto fue mutado a NA, como una versión sin riesgo de PTM. Los datos experimentales han demostrado que la versión sin riesgo de PTM era tan eficaz como la original.

[0073] En una realización, el CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, el CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67, el CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68, el CDRL1 comprende la secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO: 69, el CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70, y el CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71. En una realización, el CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, el CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72, el CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68, el CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69, el CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70, y el CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

[0074] También se proporcionan, en algunas realizaciones, aquellas que incluyen los mismos CDR que 62-G10(E4)G8 o sus contrapartes humanizadas. En algunas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos divulgados incluyen aquellos que se unen al mismo epítipo que 62-G10(E4)G8 o sus contrapartes humanizadas, y aquellos que compiten con cualquiera de ellos en la unión a SLC34A2.

[0075] En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:3 (ratón o quimérico) y 73-76 (humanizado), o un péptido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:3 (ratón o quimérico) y 73-76 (humanizado).

[0076] En algunas realizaciones, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:4 (ratón o quimérico) y 77-80 (humanizado), o un péptido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 (ratón o quimérico) y 77-80 (humanizado).

[0077] En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 77-80. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID NO: 73-76 y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76 y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79.

[0078] En una realización, los CDRs son los de 63-A11(D5)B4 o sus contrapartes humanizadas, como se ejemplifica en **la Tabla 14A**. En una realización, el CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81 o una variante de la misma que tiene una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o las combinaciones de las mismas, el CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82 u 87 o una variante de la misma que tiene una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o las combinaciones de las mismas, el CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83 o una variante de la misma que tenga una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o las combinaciones de las mismas, el CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84 o una variante de la misma que tenga una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o combinaciones de las mismas, el CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85 o una variante de la misma que tiene una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o las combinaciones de las mismas, y el CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86 o una variante de la misma que tiene una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o combinaciones de las mismas.

[0079] Uno de los CDR, CDRH2, también incluía un posible sitio PTM, NG, que por lo tanto fue mutado a SG, como una versión sin riesgo de PTM. Los datos experimentales han demostrado que la versión sin riesgo de PTM era tan eficaz como la original.

[0080] En una realización, el CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81, el CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, el CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83, el CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, el CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85, y el CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86. En una realización, el CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81, el CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87, el CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83, el CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84, el CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85, y el CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86.

[0081] También se proporcionan, en algunas realizaciones, aquellas que incluyen los mismos CDR que 63-A11(D5)B4 o sus contrapartes humanizadas. En algunas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos divulgados incluyen aquellos que se unen al mismo epítipo que 63-

A11(D5)B4 o sus contrapartes humanizadas, y aquellos que compiten con cualquiera de ellos en la unión a SLC34A2.

[0082] En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:5 (ratón o quimérico) y 88-91 (humanizado), o un péptido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:5 (ratón o quimérico) y 88-91 (humanizado).

[0083] En algunas realizaciones, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:6 (ratón o quimérico) y 92-95 (humanizado), o un péptido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 6 (ratón o quimérico) y 92-95 (humanizado).

[0084] En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90 y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 92-95. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID NO: 88-91 y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90 y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:92.

[0085] En una realización, los CDR son los de 91-C9F1 o sus contrapartes humanizadas, como se ejemplifica en **la Tabla 15A**. En una realización, el CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96 o una variante de la misma que tiene una, dos o tres delecciones, adiciones, sustituciones o las combinaciones de las mismas, el CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 o 102 o una variante de la misma que tiene una, dos o tres delecciones, adiciones, sustituciones o las combinaciones de las mismas, el CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98 o 103 o una variante de la misma que tenga una, dos o tres delecciones, adiciones, sustituciones o las combinaciones de las mismas, el CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99 o una variante de la misma que tenga una, dos o tres delecciones, adiciones, sustituciones o combinaciones de las mismas, el CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100 o una variante de la

misma que tenga una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o las combinaciones de las mismas, y el CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101 o una variante de la misma que tenga una, dos o tres deleciones, adiciones, sustituciones o combinaciones de las mismas.

[0086] Dos de los CDR, CDRH2 y CDRH3, también incluían un posible sitio PTM, NG, que por lo tanto fue mutado a ND y NA respectivamente, como versiones sin riesgo de PTM. Los datos experimentales han demostrado que las versiones sin riesgo de PTM eran tan efectivas como la original.

[0087] En una realización, el CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96, el CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97, el CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98 o 103, el CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99, el CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100, y el CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101. En una realización, el CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96, el CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 o 102, el CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, el CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99, el CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100, y el CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101. En una realización, el CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96, el CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97, el CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, el CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99, el CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100, y el CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101.

[0088] También se proporcionan, en algunas realizaciones, aquellas que incluyen los mismos CDR que 91-C9F1 o sus contrapartes humanizadas. En algunas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos divulgados incluyen aquellos que se unen al mismo epítipo que el 91-C9F1 o sus contrapartes humanizadas, y aquellos que compiten con cualquiera de ellos en la unión a SLC34A2.

[0089] En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:7 (ratón o quimérico) y 104-

107 (humanizado), o un péptido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:7 (ratón o quimérico) y 104-107 (humanizado).

[0090] En algunas realizaciones, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:8 (ratón o quimérico) y 108-111 (humanizado), o un péptido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 8 (ratón o quimérico) y 108-111 (humanizado).

[0091] En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105 y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 108-111. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 104-107 y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:110.

[0092] Se aprecia que los CDR pueden modificarse para incluir aquellos que tienen uno, dos o tres aminoácidos adicionales, delección y/o sustituciones. En algunas realizaciones, las sustituciones pueden ser sustituciones conservadoras.

[0093] Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, incluidas las cadenas laterales básicas (*por ejemplo*, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (*por ejemplo*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (*por ejemplo*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (*p. ej.*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (*por ejemplo*, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (*por ejemplo*, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un residuo de aminoácido no esencial en un polipéptido de inmunoglobulina se reemplaza preferiblemente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. En otra realización, una cadena de aminoácidos puede ser

reemplazada por una cadena estructuralmente similar que difiere en el orden y/o composición de los miembros de la familia de la cadena lateral.

[0094] En la siguiente tabla se proporcionan ejemplos no limitativos de sustituciones conservadoras de aminoácidos, donde una puntuación de similitud de 0 o superior indica una sustitución conservadora entre los dos aminoácidos.

Tabla A. Matriz de similitud de aminoácidos

	C	G	P	S	Un	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	Yo	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
Yo	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
Un	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

Tabla B. Sustituciones conservadoras de aminoácidos

Para aminoácidos	Sustitución por
Alanina	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
Arginina	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
Asparagina	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
Ácido aspártico	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Cisteína	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
Glutamina	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Ácido glutámico	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Glicina	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala
Isoleucina	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Leucina	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
Lisina	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
Metionina	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val

Fenilalanina	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Prolina	D-Pro
Serina	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
Treonina	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Tirosina	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Valina	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

[0095] También se entenderá por alguien con habilidad ordinaria en la técnica que los anticuerpos, tal como se describen en este documento, pueden modificarse de tal manera que varíen en la secuencia de aminoácidos del polipéptido de unión natural del que se derivaron. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o aminoácidos derivada de una proteína designada puede ser similar, *por ejemplo*, tener un cierto porcentaje de identidad a la secuencia inicial, *por ejemplo*, puede ser 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntica a la secuencia inicial.

[0096] En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos o una o más fracciones que normalmente no están asociadas con un anticuerpo. A continuación se describen con más detalle los ejemplos de modificaciones. Por ejemplo, un anticuerpo de la divulgación puede comprender una secuencia de enlace flexible, o puede modificarse para agregar una fracción funcional (*por ejemplo*, PEG, un medicamento, una toxina o una etiqueta).

[0097] Los anticuerpos, variantes o derivados de los mismos incluyen derivados que son modificados, es *decir*, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de modo que la unión covalente no impide que el anticuerpo se una al epítipo. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los anticuerpos pueden modificarse, *por ejemplo*, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, entre otras, la escisión química específica, la acetilación, la formilación, la síntesis metabólica de la tunicamicina, etc. Además, los anticuerpos pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

[0098] Los anticuerpos pueden marcarse de forma detectable acoplándolos a un compuesto quimioluminiscente. A continuación, se determina la presencia del polipéptido de unión al antígeno marcado con quimioluminiscente mediante la detección de la presencia de

luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscente particularmente útiles son el luminol, el isoluminol, el éster de acridinio teromático, el imidazol, la sal de acridinio y el éster de oxalato.

[0099] Los anticuerpos también pueden marcarse de forma detectable utilizando metales emisores de fluorescencia como el ^{152}Eu u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden unirse al anticuerpo utilizando grupos quelantes metálicos como el ácido dietilentriaminopentacético (DTPA) o el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Las técnicas para conjugar varias fracciones a un anticuerpo son bien conocidas, véase, *por ejemplo*, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), págs. 243 a 56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª ed.), Robinson *et al.*, (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987); Thorpe, "Portadores de anticuerpos de agentes citotóxicos en la terapia contra el cáncer: una revisión", en *Anticuerpos monoclonales '84: aplicaciones biológicas y clínicas*, Pinchera *et al.* (eds.), págs. 475 a 506 (1985); "Análisis, resultados y perspectivas futuras del uso terapéutico de anticuerpos radiomarcados en la terapia contra el cáncer", en *Anticuerpos monoclonales para la detección y terapia del cáncer*, Baldwin *et al.* (eds.), y Academic Press, pp. 303-16 (1985).

Moléculas bifuncionales y terapias combinadas

[0100] SLC34A2 se sobreexpresa en las células tumorales. Como molécula diana de antígeno tumoral, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno específico de SLC34A2 puede combinarse con un segundo fragmento de unión al antígeno específico de una célula inmunitaria, o un fragmento de unión al antígeno específico de un punto de control inmunitario para generar una terapia combinada o un anticuerpo biespecífico.

[0101] En algunas realizaciones, la célula inmunitaria se selecciona del grupo formado por una célula T, una célula B, un monocito, un macrófago, un neutrófilo, una célula dendrítica, un fagocito, una célula asesina natural, un eosinófilo, un basófilo y un mastocito. Las moléculas de la célula inmunitaria a las que se puede dirigir incluyen, por ejemplo, CCL1, CD3, CD16, CD19, CD28 y CD64. Otros ejemplos incluyen PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3 (también conocido como CD223), CD28, CD122, 4-1BB (también conocido como CD137), TIM3, OX-40 u OX40L, CD40 o CD40L, LIGHT, ICOS/ICOSL, GITR/GITRL, TIGIT, CD27, VISTA,

B7H3, B7H4, HEVM o BTLA (también conocido como CD272), receptores similares a inmunoglobulinas de células asesinas (KIR) y CD47.

[0102] También se proporcionan diferentes formatos de anticuerpos biespecíficos. En algunas realizaciones, cada uno de los fragmentos anti-SLC34A2 y el segundo fragmento se seleccionan independientemente a partir de un fragmento Fab, un fragmento variable de cadena simple (scFv) o un anticuerpo de dominio único. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico incluye además un fragmento Fc.

[0103] También se proporcionan moléculas bifuncionales que incluyen no solo fragmentos de unión a anticuerpos o antígenos. Como molécula diana de antígeno tumoral, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno específico de SLC34A2, como los descritos aquí, puede combinarse con una citocina o ligando inmunitario opcionalmente a través de un enlazador de péptidos. Las citocinas o ligandos inmunitarios vinculados incluyen, entre otros, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, GM-CSF, TNF- α , CD40L, OX40L, CD27L, CD30L, 4-1BBL, LIGHT y GITRL. Estas moléculas bifuncionales pueden combinar el efecto de bloqueo de puntos de control inmunitario con la modulación inmunitaria local del sitio del tumor.

Polinucleótidos que codifican los anticuerpos y métodos de preparación de los anticuerpos

[0104] La presente divulgación también proporciona polinucleótidos aislados o moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, variantes o derivados de los mismos de la divulgación. Los polinucleótidos de la presente divulgación pueden codificar todas las regiones variables de cadena pesada y ligera de los polipéptidos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos en la misma molécula de polinucleótido o en moléculas de polinucleótidos separadas. Además, los polinucleótidos de la presente divulgación pueden codificar partes de las regiones variables de cadena pesada y ligera de los polipéptidos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos en la misma molécula de polinucleótido o en moléculas de polinucleótidos separadas.

[0105] Los métodos de producción de anticuerpos son bien conocidos en la técnica y se describen en este documento. En ciertas realizaciones, tanto las regiones variables como las constantes de los polipéptidos de unión al antígeno de la presente divulgación son completamente humanas. Los anticuerpos totalmente humanos se pueden producir utilizando

las técnicas descritas en la técnica y como se describe en este documento. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos totalmente humanos contra un antígeno específico administrando el antígeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la provocación antigénica, pero cuyos loci endógenos han sido desactivados. En las patentes de EE.UU. se describen técnicas ejemplares que pueden utilizarse para producir dichos anticuerpos: 6.150.584; 6,458,592; 6.420.140 que se incorporan por referencia en su totalidad.

Métodos de tratamiento

[0106] Como se describe en este documento, los anticuerpos, variantes o derivados de la presente divulgación pueden usarse en ciertos métodos de tratamiento y diagnóstico.

[0107] La presente divulgación se dirige además a las terapias basadas en anticuerpos que implican la administración de los anticuerpos de la divulgación a un paciente, como un animal, un mamífero y un ser humano, para tratar uno o más de los trastornos o afecciones descritos en este documento. Los compuestos terapéuticos de la divulgación incluyen, entre otros, anticuerpos de la divulgación (incluidas las variantes y derivados de los mismos, como se describe en el presente documento) y ácidos nucleicos o polinucleótidos que codifican anticuerpos de la divulgación (incluidas las variantes y derivados de los mismos, como se describe en el presente documento).

[0108] Los anticuerpos de la divulgación también se pueden usar para tratar o inhibir el cáncer. En algunas realizaciones, las células cancerosas del paciente expresan o sobreexpresan SLC34A2. Como se indicó anteriormente, SLC34A2 pueden estar sobreexpresadas en las células tumorales, en particular en los tumores gástricos, pancreáticos, esofágicos, ováricos y pulmonares. Se ha demostrado que la inhibición de SLC34A2 es útil para tratar los tumores.

[0109] En consecuencia, en algunas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar un cáncer en un paciente que lo necesita. El método, en una realización, implica administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo de la presente divulgación. En algunas realizaciones, al menos una de las células cancerosas (por ejemplo, células estromales) en el paciente sobreexpresa SLC34A2.

[0110] Las terapias celulares, como las terapias de células T con receptores de antígenos quiméricos (CAR), también se proporcionan en la presente divulgación. Se puede utilizar una

célula adecuada, que se ponga en contacto con un anticuerpo anti-SLC34A2 de la presente divulgación (o alternatively se diseñe para expresar un anticuerpo anti-SLC34A2 de la presente divulgación). En algunas realizaciones, el anticuerpo se presenta en un receptor de antígeno quimérico (CAR). A partir de dicho contacto o ingeniería, la célula puede ser introducida a un paciente de cáncer que necesite un tratamiento. El paciente con cáncer puede tener un cáncer de cualquiera de los tipos que se describen en este documento. La célula (por ejemplo, una célula T) puede ser, por ejemplo, un linfocito T infiltrante de tumor, una célula T CD4+, una célula T CD8+ o la combinación de ambas, sin limitación.

[0111] En algunas realizaciones, la célula se aisló del propio paciente con cáncer. En algunas realizaciones, la célula fue proporcionada por un donante o por un banco de células. Cuando la célula se aísla del paciente con cáncer, se pueden minimizar las reacciones inmunitarias no deseadas.

[0112] Ejemplos no limitativos de cánceres incluyen cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de tiroides. En algunas realizaciones, el cáncer es uno o más cánceres gástricos, pancreáticos, de esófago, de ovario y de pulmón.

[0113] Otras enfermedades o afecciones asociadas con el aumento de la supervivencia celular, que pueden tratarse, prevenirse, diagnosticarse y/o pronosticarse con los anticuerpos o variantes, o derivados de los mismos, incluyen, entre otras, la progresión y/o metástasis de neoplasias malignas y trastornos relacionados como la leucemia (incluidas las leucemias agudas (*p. ej.*, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (incluyendo mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (por *ejemplo*, leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica)), policitemia vera, linfomas (por *ejemplo*, enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de cadenas pesadas y tumores sólidos, incluidos, entre otros, sarcomas y carcinomas como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endotheliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma

de glándulas sebáceas, carcinoma papilar adenocarcinomas, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

[0114] Una dosis específica y un régimen de tratamiento para cualquier paciente en particular dependerán de una variedad de factores, incluidos los anticuerpos particulares, la variante o el derivado de los mismos utilizados, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente, y el momento de la administración, la tasa de excreción, la combinación de medicamentos y la gravedad de la enfermedad en particular que se está tratando. El juicio de tales factores por parte de los cuidadores médicos está dentro de la habilidad ordinaria en la técnica. La cantidad también dependerá del paciente individual a tratar, la vía de administración, el tipo de formulación, las características del compuesto utilizado, la gravedad de la enfermedad y el efecto deseado. La cantidad utilizada puede determinarse mediante principios farmacológicos y farmacocinéticos bien conocidos en la técnica.

[0115] Los métodos de administración de los anticuerpos, variantes o incluyen pero no se limitan a las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los polipéptidos o composiciones de unión al antígeno pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (*por ejemplo*, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas que contienen los polipéptidos de unión al antígeno de la divulgación pueden administrarse por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como polvos, ungüentos, gotas o parche transdérmico), bucal o como aerosol oral o nasal.

[0116] El término "parenteral", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a los modos de administración que incluyen inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular.

[0117] La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser conveniente introducir los anticuerpos de la revelación en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluida la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede ser facilitada por un catéter intraventricular, por ejemplo, conectado a un reservorio, como un reservorio Ommaya. También se puede emplear la administración pulmonar, *por ejemplo*, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizante.

[0118] Puede ser conveniente administrar los polipéptidos de unión al antígeno o las composiciones de la divulgación localmente en el área que necesita tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, en conjunción, con un apósito para heridas después de la cirugía, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, como membranas sialásticas, o fibras. Preferiblemente, cuando se administre una proteína, incluido un anticuerpo, de la divulgación, se debe tener cuidado de utilizar materiales que la proteína no absorba.

[0119] La cantidad de anticuerpos que serán eficaces en el tratamiento, la inhibición y la prevención de una enfermedad, trastorno o afección inmunitaria o maligna puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Además, los ensayos *in vitro* pueden emplearse opcionalmente para ayudar a identificar los rangos de dosis óptimos. La dosis precisa que se empleará en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad, trastorno o afección, y debe decidirse de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de *ensayo in vitro* o en modelos animales.

[0120] Como proposición general, la dosis administrada a un paciente de los polipéptidos de unión al antígeno de la presente divulgación es típicamente de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente, entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del paciente, o de 1 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del paciente. En general, los anticuerpos humanos tienen una vida media más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria a los polipéptidos extraños. Por lo tanto, a menudo es posible una dosis más baja de anticuerpos humanos y una administración menos frecuente. Además, la dosis y la frecuencia de administración de anticuerpos pueden reducirse al mejorar la absorción y la

penetración en los tejidos (*por ejemplo*, en el cerebro) de los anticuerpos mediante modificaciones como, *por ejemplo*, la lipidación.

[0121] En una realización adicional, las composiciones de la divulgación se administran en combinación con citocinas. Las citocinas que pueden administrarse con las composiciones de la divulgación incluyen, entre otras, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, anti-CD40, CD40L y TNF- α .

[0122] En realizaciones adicionales, las composiciones de la divulgación se administran en combinación con otros regímenes terapéuticos o profilácticos, como, *por ejemplo*, la radioterapia.

Métodos diagnósticos

[0123] Se observa una sobreexpresión de SLC34A2 en ciertas muestras tumorales, y es probable que los pacientes que tienen células con SLC34A2 sobreexpresión respondan a los tratamientos con los anticuerpos anti-SLC34A2 de la presente divulgación. En consecuencia, los anticuerpos de la presente divulgación también pueden utilizarse con fines diagnósticos y pronósticos.

[0124] Una muestra que preferiblemente incluya una célula se puede obtener de un paciente, que puede ser un paciente con cáncer o un paciente que desee un diagnóstico. La célula puede ser una célula de un tejido tumoral o un bloque tumoral, una muestra de sangre, una muestra de orina o cualquier muestra del paciente. Tras el pretratamiento opcional de la muestra, la muestra puede incubarse con un anticuerpo de la presente divulgación en condiciones que permitan que el anticuerpo interactúe con una proteína SLC34A2 potencialmente presente en la muestra. Se pueden utilizar métodos como el ELISA, aprovechando el anticuerpo anti-SLC34A2, para detectar la presencia de la proteína SLC34A2 en la muestra.

[0125] La presencia de la proteína SLC34A2 en la muestra (opcionalmente con la cantidad o concentración) se puede utilizar para el diagnóstico de cáncer, como una indicación de que el paciente es apto para un tratamiento con el anticuerpo, o como una indicación de que el paciente ha respondido (o no) a un tratamiento contra el cáncer. Para un método pronóstico, la detección se puede hacer de una vez, dos o más, en ciertas etapas, al iniciar un tratamiento contra el cáncer para indicar el progreso del tratamiento.

Composiciones

[0126] La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden una cantidad efectiva de un anticuerpo y un portador aceptable. En algunas realizaciones, la composición incluye además un segundo agente anticancerígeno (por ejemplo, un inhibidor de puntos de control inmunitario).

[0127] En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en humanos. Además, un "portador farmacéuticamente aceptable" será generalmente un relleno sólido, semisólido o líquido no tóxico, diluyente, material encapsulante o auxiliar de formulación de cualquier tipo.

[0128] El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el tratamiento. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluidos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, como el aceite de maní, el aceite de soja, el aceite mineral, el aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como portadores líquidos, especialmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener pequeñas cantidades de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes amortiguadores del pH como acetatos, citratos o fosfatos. Agentes antibacterianos como el alcohol bencílico o los metilparabenos; antioxidantes como el ácido ascórbico o el bisulfito de sodio; agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético; y también se prevén agentes para el ajuste de la tonicidad como el cloruro de sodio o la dextrosa. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales como los triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de portadores farmacéuticos

adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences de E. W. Martin, incorporados aquí como referencia. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de unión al antígeno, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma adecuada de administración al paciente. La formulación debe adaptarse al modo de administración. La preparación parental puede estar encerrada en ampollas, jeringas desechables o viales multidosis de vidrio o plástico.

[0129] En una realización, la composición se formula de acuerdo con los procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local como la lignocaína para aliviar el dolor en el lugar de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o mezclados en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente herméticamente cerrado, como una ampolla o una sachetta, que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se vaya a administrar por infusión, se puede dispensar con un frasco de infusión que contenga agua estéril de grado farmacéutico o solución salina. Cuando la composición se administre por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se mezclen antes de la administración.

[0130] Los compuestos de la divulgación pueden formularse como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones como las derivadas de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes como las derivadas del sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína, etc.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales murinos contra SLC34A2 humanos

[0131] La proteína SLC34A2 humana se utilizó para inmunizar diferentes cepas de ratones, y se generaron hibridomas en consecuencia. SLC34A2 se seleccionaron y subclonaron aglutinantes positivos. Posteriormente, *se llevó a cabo un cribado funcional y de unión in vitro*

y se identificaron los anticuerpos principales con mayor afinidad de unión y mayor potencia funcional.

[0132] Las secuencias VH/VL de 25 anticuerpos murinos principales se proporcionan en la **Tabla 1** a continuación.

Tabla 1. Secuencia VH/VL de los anticuerpos murinos principales

Cadena de anticuerpos	Secuencia (los CDR están subrayados)	SEQ ID NO:
30-H9(B8)F9 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKTSGYTFITTNNMHVVKQTPGQGLEWIGAIY PGNGATAYNQFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEASAVYYCARGMYGHGA MDYWGQGTSVIVSS	1
30-H9(B8)F9 VL	DIVMTQSHKFMRSVSGDRVRITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWAT TRHSGVPDRFTGSGSGTDFTITISNVQSEDLADYFCQQYSSNPLTFGAGTKL ELK	2
62-G10(E4)G8 VH	QVQLQQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFPSYITHWVKQTPGQGLEWIGAIY PGNGDTSYIQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTYGTS AWFTYWQGGLVTVSA	3
62-G10(E4)G8 VL	DIVLTQSPATLSVTPGDSVLSCLRARQNIGNNLYWYQQKSHESPRLLIKYAS QSISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVETEDFGVYFCQQSFSWPLTFGAGTKL ELK	4
63-A11(D5)B4 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKTSGYTFITYNMHVVKQTPGQGREWIGAIY PGNGDTSYNQFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCSISTIITTG AVDYWGQGTSVTVAS	5
63-A11(D5)B4 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKAGQSPKLLIYWTS TRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLIIRSLQSEDLADYFCQQYSRIPLTFGSGTKL EIK	6
91-C9F1 VH	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISKCTSGFFFTHEYIIHWVKQSHGRSLEWIGGII PNNGVTNYKQNFRGKAALTADKSSNTAYMELRSLTSEDSAVYYCARWRNGYY SAMDSWGQGTSVTVSS	7
91-C9F1 VL	DIVVTQSHKFMSTSLGDRVSITCTASQDVGTAVAWYQQKPGHSPKLLIYWAS TRHTGVPERFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYFCQQYRTSPLTFGVGTKL ELK	8
7-F4C4 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNIHWVKQTPGQGLEWIGAVY PGNGDTSYNQKFRGKATLTSDKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVFYCARGIYGHG AMDSWGQGTSVTVSS	9
7-F4C4 VL	DIVMTQSHKFMSTSLGARVSITYKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWAS TRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSNPLTFGAGTKL ELK	10
94-B10A8 VH	QVQLQQTGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTGYIIHWIKQRPQGLEWIGAIY PGNGDTSYNQKIKGRATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDYGNP AWFAYWGQGLVTVSA	11
94-B10A8 VL	DVVLTSQSPATLSVTPGDRVLSCLASQSSISNYLYWYQQKAHESPRLLIKFAS QSISGIPSRFRGSGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSNKWPLTFGAGTKL ELK	12

94-E9B12 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMQWVKQTYGQGLEWIGAIS PGSGETSYNQNFVKATLTADKISSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARAARAEG WFAYWGQGTLVTVSA	13
94-E9B12 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGHAVVWYQQKPGQFPKLLIYWAS TRHAGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQFRSIPPLTFGSGTKL EIK	14
67-C9G11 VH	DVKLVESGGGLVKLGSLKLSCAASGFTFSSYFMSWIRQTPEKRVDLVAVIN SNGGSTYSPDTVKGRTISRDNANTLYLQMTSLKSEDTALYYCARHFYSYD GAWFPYWGQGTLVTVSA	15
67-C9G11 VL	DIVMTQSHKFMSTLVGDRVSITCKASQDVSTSVAWYQQKPGQSPKLLIYWAS TRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLALYYCQHHSTPITFGVGTKL ELK	16
90-G10H7 VH	QVQLQQPGAVLVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIIHWVKQTPGQGLEWVGAIY PGNGDASSIQFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSADSAVYYCARGHYYGSA AWFAYWGQGTLVTVSA	17
90-G10H7 VL	DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQNIQTGIHWYQQRNGLRLLIKYAS ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNSNWPLTFGAGTKL ELK	18
11-F6H8 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGFTFTEYTMHWVKQSHGKSLEWIGGIN PNNGISSYNQNFVKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSTVYYCARCRYDYD SYDMDYWGQGTSTVTVSS	19
11-F6H8 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDIRNFLNWYQQKPDGTVKLLIYYTS RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEEEDIATYFCQQSNTLPWTFGGGTKL EIK	20
84-F2D10 VH	QVQLQQPGAVLVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNLHWVKQTPGQGLEWIGAIY PGNGDTSYIQFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGKYGNY EGFAYWGQGTLVTVSA	21
84-F2D10 VL	DILLTQSPAILSVPGERVSIQSCRASQSIGTSIYWYQQRNGLSPRLIKFAS ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNNRWPFTFGSGTKL EIK	22
26-C5D2 VH	QVQLLPGAELVKPGASVLMCKTSGYTFTTYNMHWVKQTPGQGLEWTVGIS PGNGATSYTQKFKGKATLTADKSSNTVYMQLRSLTSEDSAVYNCARGYGNTG AMDHWGQGTSTVTVSS	23
26-C5D2 VL	DIVMTQSHKFISTSVGERVITCKASQDVGTAVTWYQRKPRQSPKLLISWAS TRHTGVPDRFTGSGSGTDFTFTINNVQSEDLADYFCQQYRAIPPLTFGAGTKL ELK	24
7-G10E11 VH	DVKLVESGGGLIKLGSLKLSCAASGFTFSGYYMSWFRQTPEKRLELVAVIN SNGGSTYYAVTVKGRTISRDNANTLYLQMSSLKSEDTALYYCARHEGSQA WFAHWGQGTLVTVSA	25
7-G10E11 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVTTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWAS TRHTGVPDRFTGSGSGTDYTLTISVQAEDLALYYCQHHSTPLTFGAGTKL ELK	26
25-B11B9 VH	DVKLVESGGGLVRLGGSLKLSCAASGFTFSSHYSWVRQTPKKRLELVATIN SSGGNTYYPDTVKGRTISRDNARNTLFLQMTSLKSEDTALYYCARQPINTV AYFDYWGQGTTLTVSS	27

25-B11B9 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGARVSITCKASQDLTTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWAS TRHIGVPDRFTGSGSGADYTLTISSVQAEDLALYYCQQYHSTPLTFGAGTKL ELK	28
62-C10(B3)D2 VH	QVHQQQSGPELVKPGASVRISCKASGYTFTSYIIHWVKQRPQGQLEWIGCIY PGNLFTKYNEKFKDKATLTADTSSTAYMHLSSLTSEDSAVYFCARFLNWNW WYFDVWGAGTTVSS	29
62-C10(B3)D2 VL	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIIEHSNGNTNLEWYLQKPGQSPRLL IYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKITGVEAEDLGVIYCFQGSHPFWTFG GGTKLEIK	30
55-E5(B6)D12 VH	QVQLQQSGAEVNVNSGASVKMSCKASGYTFTTYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIY PGNGDTSYNQRFKKGATFTADRSSGTAYMQLSSLPSSEDSAVYYCARGGYANG ALVDWGQGTTLVTVSA	31
55-E5(B6)D12 VL	DILMTQSHKFMSTSVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQNKPGQSPKLLIFWTS TRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSRQPLTFGPSTKL EIK	32
28-G3(C6)B9 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIIHWVKQAPGQGLEWIGAIY PGNGDTSYSQRFKKGAKLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSVYYCARGNNYGS PAWFGYWGQGTTLVTVSA	33
28-G3(C6)B9 VL	DIVLTQSPVTLSTVTPGDRVSLSCRASQSIGNFLYWYQQKSHSPRLLIKYAS QSMGIPSRFSGSGSGTDFTLISIRVETEDFGMYFCQQSNSWPVTFGAGTKL ELK	34
18-G1H4 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVRMSCKASAYTFTTYNLHWVKQTPGQGLEWIGAIY PGNGVTSYNQKFRGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGYGYGSV GAMDYWGQGTSTVTVSS	35
18-G1H4 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVNISCSASQGIGNFLNHWYQQKPDGTVKLLIYYTS SLHSGVPPRFSGSGSGTDYSLTISNLEDIATYYCQQYHKLPLTFGAGTKLEL K	36
16-E5D10 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVMMSCASGYTFSNHNHLHWLKKTPGQGLDWIGAIY PGNGDTSYNQKFKGRATLTVDKSSNTAYMQFSSLTSEDSAVFYCARGKYGNG AMDYWGQGTAVTVSS	37
16-E5D10 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCRASQDVGTAVVWYQQKLGQSPKLLFDWAS SRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITDVQSEDLADYFCQQYSRQPLTFGAGTKL ELK	38
69-B11D8 VH	EVQLQQSGPELVKPGAANKISCKTSGYTFTDYTMHWVRQSHGKSLEWIGGIH PNNGGTGYNQKLRGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSDSAVYYCARGRESHG WTYWGQGTTLVTFSA	39
69-B11D8 VL	DVHMTQTTSSLSASLGDRVTITCSASQGIGNSLNHWYQQQPDGTVKLLIYYTS RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDLATYYCQQYSRFPPTFGGGTKL EIK	40
71-F7D4 VH	DVKLVESGGDLVKLGSLKLSAASGFTFSNYMWSVRQTPEKRLELVAVIN SNGGTTYYPDNMKGRFTISRDNANTLYLQTSLSKSEDTALYYCGRHEHYG TNIWAFAYWGQGTTLVTVSA	41
71-F7D4 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVTTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWAS TRHTGVPDRFTGSGSGTDHTLTISVQAEDLALYYCQQHYSTPVTFGGGTKL EIK	42
78-D1B10 VH	QVQLQQPGADLVKPGASVKLSCKASGFTFTFTSYIIHWVKQTPGQGLEWIGA IYPNGDTSYIQKFKGRATLTADKSSSTAYMQLGGLTSEDSAVYYCARGTYG	43

	SSAWFVYWGQGLVTVSA	
78-D1B10 VL	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSIENNLYWYQQKSHESPRLLIKYAS QSISGIPSRFRGSGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGTKL ELK	44
87-H12B7 VH	QVQLQQPGAELVVRPGASVKMSCKASGYTFTSYIVHWVKQPPGQGLEWIGAIY PGNGDTSYIQKFKGRATLTADKSSSTVYMQLSLTSSEDSAVYYCARGHYYGS AAWFGFWGQGLVTVSA	45
87-H12B7 VL	DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQNIQTSIHWHYQQRNDSPRLLMRYAS ESVSGIPSRFRGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQSNWPLTFGAGTKLE LK	46
20-H2F1 VH	EVKLVESGGNLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASIS NGGTTYYPDSVKGRFTISRVDARNILYLQMTSLRSEDATAMYYCARTHYRDFV YWGQGLVTVSA	47
20-H2F1 VL	EIVLTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLL IYQMSNLAGVPDRFSCSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLEFPWTFG GGTKLEIK	48
VH de 95 H11A1D8	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKTSGYTFTTNMHVVKQTPGQGLEWIGAIY PGNGATAYNQFKGKATLTADKSSSTAYMQLSLTSSEASAVYYCARGMYGHGA MDYWGQGTSVIVSS	49
95-H11A1D8 VL	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRARQNIENNLYWYQKSNESPRLLIKYASQ SISGIPSRFRGSGSGTDFTLTINSVETEDFGVYFCQQSFSWPLTFGAGTKLE LK	50

Ejemplo 2. Unión FACS de Abs quiméricos a SLC34A2 humanos

[0133] En este ejemplo, se evaluó mediante citometría de flujo la unión celular de anticuerpos quiméricos (hIgG1) preparados a partir de los anticuerpos murinos en células que expresan SLC34A2 humanos.

[0134] Brevemente, las células OVCAR3 o las células HEK293 que expresan SLC34A2 humano se incubaron con anticuerpos quiméricos (a partir de 200 nM, dilución de 4 pliegues, 8 puntos). Después de la incubación a 4 °C durante 60 minutos, las células se lavaron con tampón FACS dos veces, luego se tiñeron con anticuerpo secundario conjugado fluorescente a 4 °C durante 30 minutos. Después de eso, las células se lavaron dos veces y se analizaron mediante citometría de flujo.

[0135] Los resultados del estudio (**FIG. 1A-B y 2A-B y Tablas 2-3**) mostraron que todos los anticuerpos quiméricos pueden unirse a SLC34A2 humanos con alta afinidad, excepto por la ligera disminución de los quiméricos 62-C10(B3)D2 y 95-H11A1D8 a las concentraciones más altas, en comparación con el anticuerpo de referencia XMT-1536.

Tabla 2. Afinidad de unión de anticuerpos quiméricos a células OVCAR3

Anticuerpo (1° lote)	EC ₅₀ (nM)	Arriba (MFI)
xi7F4C4 hIgG1	4.49	39014
xi94B10A8 hIgG1	1.57	39619
xi94E9B12 hIgG1	11.01	46222
xi67C9G11 hIgG1	4.67	41042
xi90G10H7 hIgG1	2.14	43252
xi11F6H8 hIgG1	4.90	41330
xi84F2D10 hIgG1	3.84	40519
xi26C5D2 hIgG1	1.99	34227
xi7G10E11 hIgG1	1.68	39625
xi25B11B9 hIgG1	9.06	42516
xi62C10B3D2 hIgG1	408.50	29476
xi55E5B6D12 hIgG1	3.31	42934
xi28G3C6B9 hIgG1	4.27	42993
xi30H9B8F9 hIgG1	0.53	41946
xi62G10E4G8 hIgG1	2.55	43000
xi63A11D5B4 hIgG1	3.85	42986
xi18G1H4 hIgG1	2.75	42473
Isotipo hIgG1	~ 2895	~ Año 1566
XMT-1536	4.31	40189
Anticuerpo (2° lote)		
xi16E5D10 hIgG1	4.66	27607
xi69B11D8 hIgG1	2.12	27681
xi71F7D4 hIgG1	7.86	28910
xi78D1B10 hIgG1	2.52	27502
xi91C9F1 hIgG1	1.64	26417
xi87-H12B7 hIgG1	5.43	27824
xi20H2F1 hIgG1	2.73	26495
xi95H11A1D8VH-1 hIgG1	NA	NA
Isotipo hIgG1	NA	NA
XMT-1536	3.99	26673

Tabla 3. Afinidad de unión de anticuerpos quiméricos a células HEK293 que expresan SLC34A2 humanos

Anticuerpo (1° lote)	EC ₅₀ (nM)	Arriba (MFI)
xi7F4C4 hIgG1	2.27	88468
xi94B10A8 hIgG1	1.17	91255
xi94E9B12 hIgG1	2.48	105603
xi67C9G11 hIgG1	2.82	107055
xi90G10H7 hIgG1	1.52	114272
xi11F6H8 hIgG1	1.92	111432
xi84F2D10 hIgG1	1.37	109026
xi26C5D2 hIgG1	1.20	100725
xi7G10E11 hIgG1	1.72	108524
xi25B11B9 hIgG1	2.51	105605
xi62C10B3D2 hIgG1	378.40	127984
xi55E5B6D12 hIgG1	1.80	115440
xi28G3C6B9 hIgG1	1.88	106874
xi30H9B8F9 hIgG1	0.96	107226
xi62G10E4G8 hIgG1	1.28	100511

xi63A11D5B4 hIgG1	1.50	102578
xi18G1H4 hIgG1	0.86	106260
XMT-1536	--	---
Anticuerpo (2° lote)		
xi16E5D10 hIgG1	2.29	47483
xi69B11D8 hIgG1	1.19	48044
xi71F7D4 hIgG1	2.11	47863
xi78D1B10 hIgG1	1.26	47662
xi91C9F1 hIgG1	1.06	44788
xi87-H12B7 hIgG1	1.62	44894
xi20H2F1 hIgG1	1.31	41969
xi95H11A1D8VH-1 hIgG1	63.4	12705
hIgG1	NA	NA
117-BMK	1.67	46062

[0136] Sobre la base de los resultados de unión celular anteriores, se seleccionaron algunos de los anticuerpos quiméricos para una posterior unión basada en células en células que expresan SLC34A2 humano mediante citometría de flujo. Las células RMG-1 se incubaron con los anticuerpos quiméricos seleccionados (a partir de 200 nM, dilución de 4 veces, 8 puntos). Después de la incubación a 4 °C durante 60 minutos, las células se lavaron con tampón FACS dos veces, luego se tiñeron con anticuerpo secundario conjugado fluorescente a 4 °C durante 30 minutos. Posteriormente, las células se lavaron dos veces y se analizaron mediante citometría de flujo.

[0137] Los resultados del estudio (**FIG. 3** y **Tabla 4**) muestran que los anticuerpos quiméricos pueden unirse a SLC34A2 humanos con alta afinidad, en comparación con el anticuerpo de referencia XMT-1536.

Tabla 4. Afinidad de unión de anticuerpos quiméricos seleccionados a células RMG-1

Anticuerpo	EC50 (nM)	Arriba (MFI)
xi7F4C4 hIgG1	5.03	8461
xi94B10A8 hIgG1	2.58	9373
xi94E9B12 hIgG1	9.05	10003
xi90G10H7 hIgG1	2.77	9922
xi84F2D10 hIgG1	4.33	8596
xi26C5D2 hIgG1	2.52	7062
xi55E5B6D12 hIgG1	3.48	9502
xi28G3C6B9 hIgG1	4.73	9424
xi30H9B8F9 hIgG1	0.99	9470
xi62G10E4G8 hIgG1	3.65	9371
xi63A11D5B4 hIgG1	5.32	9768
xi18G1H4 hIgG1	7.91	9800
xi16E5D10 hIgG1	3.76	9495
xi69B11D8 hIgG1	1.70	9201

xi71F7D4 hIgG1	8.36	10204
xi78D1B10 hIgG1	2.10	9860
xi91C9F1 hIgG1	1.30	9233
xi87H12B7 hIgG1	9.11	9657
Isotipo hIgG1	NA	NA
XMT-1536	4.87	9114

Ejemplo 3. Unión de reactividad cruzada de Abs quimérico a proteínas Rhesus y Cynomolgus SLC34A2

[0138] En este ejemplo, se evaluó mediante citometría de flujo la unión celular de Abs quiméricos en células que expresan Rhesus y Cynomolgus SLC34A2.

[0139] Brevemente, las células de ingeniería Rhesus SLC34A2 que expresan HEK293 (HEK293/ Rhesus _SLC34A2) se incubaron con Abs quimérico (a partir de 200 nM, dilución de 4 pliegues, 8 puntos). Después de la incubación a 4 °C durante 60 minutos, las células se lavaron con tampón FACS dos veces, y luego se tiñeron con anticuerpo secundario conjugado fluorescente a 4 °C durante 30 minutos. Después de eso, las células se lavaron dos veces y se analizaron mediante citometría de flujo.

[0140] Los resultados del estudio (**FIG. 4** y **Tabla 5**) muestran que la mayoría de los Abs quiméricos pueden unirse a Rhesus SLC34A2 con alta afinidad.

Tabla 5. Unión de reactividad cruzada a Rhesus

Anticuerpo	EC₅₀ (nM)	Arriba (MFI)
xi7F4C4 hIgG1	3.09	13074
xi94B10A8 hIgG1	2.24	13671
xi94E9B12 hIgG1	2.38	18712
xi90G10H7 hIgG1	2.19	18502
xi84F2D10 hIgG1	46.04	8844
xi26C5D2 hIgG1	NA	NA
xi55E5B6D12 hIgG1	2.46	15942
xi28G3C6B9 hIgG1	3.19	13396
xi30H9B8F9 hIgG1	1.26	17011
xi62G10E4G8 hIgG1	2.53	11975
xi63A11D5B4 hIgG1	2.56	15148
xi18G1H4 hIgG1	2.90	14349
xi16E5D10 hIgG1	2.72	14803
xi69B11D8 hIgG1	1.68	11619
xi71F7D4 hIgG1	NA	~ 5396799
xi78D1B10 hIgG1	1.58	15959
xi91C9F1 hIgG1	0.95	12220
xi87H12B7 hIgG1	2.85	18333
Isotipo hIgG1	NA	NA
XMT-1536	2.54	11913

[0141] Asimismo, se midió la unión de los anticuerpos quiméricos a Cynomolgus SLC34A2 y los resultados se muestran en la **FIG. 5** y la **Tabla 6**. Los resultados muestran que la mayoría de los Abs quiméricos pueden unirse a Cynomolgus SLC34A2 con alta afinidad.

Tabla 6. Unión de reactividad cruzada a Cynomolgus

Anticuerpo	EC ₅₀ (nM)	Arriba (MFI)
xi7F4C4 hIgG1	3.30	3121
xi94B10A8 hIgG1	5.47	3149
xi94E9B12 hIgG1	2.51	3579
xi90G10H7 hIgG1	2.40	4561
xi84F2D10 hIgG1	68.46	1275
xi26C5D2 hIgG1	945.60	1208
xi55E5B6D12 hIgG1	2.70	3541
xi28G3C6B9 hIgG1	2.81	3772
xi30H9B8F9 hIgG1	1.08	4079
xi62G10E4G8 hIgG1	3.33	4016
xi63A11D5B4 hIgG1	5.33	3508
xi18G1H4 hIgG1	4.93	4086
xi16E5D10 hIgG1	3.79	3728
xi69B11D8 hIgG1	88.35	2566
xi71F7D4 hIgG1	NA	NA
xi78D1B10 hIgG1	1.50	4398
xi91C9F1 hIgG1	9.11	2434
xi87H12B7 hIgG1	7.66	4711
Isotipo hIgG1	NA	NA
XMT-1536	29.31	2052

Ejemplo 4. Unión de reactividad cruzada a la proteína SLC34A2 de rata

[0142] En este ejemplo, se evaluó mediante citometría de flujo la unión celular de Abs quiméricos en células que expresan SLC34A2 de rata.

[0143] Brevemente, las células de ingeniería HEK293 que expresan SLC34A2 de rata y ratón (HEK293/Rat_SLC34A2, HEK293/Mouse_SLC34A2) se incubaron con Abs quimérico (10ug/ml). Después de la incubación a 4 °C durante 60 minutos, las células se lavaron con tampón FACS dos veces, y luego se tiñeron con anticuerpo secundario conjugado fluorescente a 4 °C durante 30 minutos. Después de eso, las células se lavaron dos veces y se analizaron mediante citometría de flujo.

[0144] Los resultados del estudio (**FIG. 6A-B**) muestran que la mayoría de los Abs quiméricos pueden unirse a SLC34A2 de roedores con alta afinidad.

Ejemplo 5. ADCC contra células humanas que expresan SLC34A2

[0145] En este ejemplo se evaluó la capacidad de los anticuerpos quiméricos para inducir actividades citotóxicas dependientes de anticuerpos.

[0146] El bioensayo ADCC Reporter empleado aquí utiliza una lectura alternativa en un punto anterior en la activación de la vía ADCC MOA: la activación de la transcripción génica a través de la vía NFAT (factor nuclear de células T activadas) en la célula efectora. Además, el bioensayo ADCC Reporter utiliza células Jurkat modificadas genéticamente que expresan de manera estable el receptor Fc RIIIa, la variante V158 (alta afinidad) y un elemento de respuesta NFAT que impulsa la expresión de luciferasa de luciferasa de luciérnaga como células efectoras. La actividad biológica de los anticuerpos en ADCC MOA se cuantifica a través de la luciferasa producida como resultado de la activación de la vía NFAT; La actividad de la luciferasa en la célula efectora se cuantifica con lectura de luminiscencia. La señal es alta y el fondo del ensayo es bajo.

[0147] Se incubaron diluciones seriadas de Abs quimérico durante 6 horas de inducción a 37°C con células efectoras Jurkat modificadas (células efectoras de bioensayo ADCC), con células diana de bioensayo ADCC (que expresan SLC34A2). La actividad de la luciferasa se cuantificó utilizando el reactivo tampón de ensayo de luciferasa ONE-Glo™. Los resultados se muestran en **la FIG. 7A-B y en la Tabla 7**. Como se muestra, todos los anticuerpos quiméricos probados exhibieron actividades de inducción de ADCC patentadas.

Tabla 7. ADCC de anticuerpos quiméricos

Anticuerpo	EC₅₀ (nM)	Arriba (MFI)
xi7F4C4 hIgG1	2.5	439624
xi94B10A8 hIgG1	4.0	485769
xi94E9B12 hIgG1	3.3	382205
xi90G10H7 hIgG1	2.3	397344
xi84F2D10 hIgG1	2.5	409115
xi26C5D2 hIgG1	3.0	427014
xi55E5B6D12 hIgG1	3.0	530043
xi28G3C6B9 hIgG1	6.4	569103
xi30H9B8F9 hIgG1	3.1	487349
xi62G10E4G8 hIgG1	4.8	542275
xi63A11D5B4 hIgG1	4.6	216320
xi18G1H4 hIgG1	2.2	227773
xi16E5D10 hIgG1	2.1	237571

xi69B11D8 hIgG1	2.7	216267
xi71F7D4 hIgG1	3.6	247281
xi78D1B10 hIgG1	2.6	211795
xi91C9F1 hIgG1	2.8	215229
xi87H12B7 hIgG1	5.1	194715
Isotipo hIgG1	NA	NA

Ejemplo 6. Efecto citotóxico contra las células humanas que expresan SLC34A2

[0148] En este ejemplo se examinaron los efectos citotóxicos de los anticuerpos quiméricos.

[0149] Las células de ingeniería que expresan SLC34A2 humano HEK293 (HEK293/H_SLC34A2) se sembraron en una placa de 96 pocillos. Las células se trataron con complejo quimérico Abs en las concentraciones respectivas durante 5 días. La viabilidad celular se midió mediante el reactivo CellTiter-Glo. La actividad de la luciferasa fue detectada por Envision.

[0150] Los resultados (**FIG. 8A-B y Tabla 8**) muestran que todos estos Abs quiméricos tenían actividades asesinas altamente potentes.

Tabla 8. Actividades citotóxicas

Anticuerpo	IC₅₀ (nM)	% Inhibición de
xi7F4C4 hIgG1	0.67	86.5
xi94B10A8 hIgG1	0.70	97.5
xi94E9B12 hIgG1	0.85	83.6
xi90G10H7 hIgG1	0.28	103.1
xi84F2D10 hIgG1	0.61	101.9
xi26C5D2 hIgG1	1.06	82.9
xi55E5B6D12 hIgG1	0.69	96.7
xi28G3C6B9 hIgG1	0.36	86.4
xi30H9B8F9 hIgG1	0.84	91.7
xi62G10E4G8 hIgG1	0.42	97.2
xi63A11D5B4 hIgG1	0.66	99.0
xi18G1H4 hIgG1	0.36	82.7
xi16E5D10 hIgG1	0.78	93.1
xi69B11D8 hIgG1	0.67	86.9
xi71F7D4 hIgG1	0.83	99.4
xi78D1B10 hIgG1	0.50	94.0
xi91C9F1 hIgG1	0.80	97.4

xi87H12B7 hIgG1	0.35	82.6
Isotipo hIgG1	NA	92.3
XMT-1536	0.72	100.4

Ejemplo 7. Mutaciones en CDR para prevenir modificaciones postraduccionales

[0151] Seis de los anticuerpos murinos, 90G10H7, 55E5B6D12, 30H9B8F9, 62G10E4G8, 63A11D5B4 y 91C9F1, fueron seleccionados para la humanización y las mutaciones de aminoácidos para prevenir posibles modificaciones postraduccionales (PTM), que en lo sucesivo se denominan secuencias sin riesgo de PTM.

[0152] Primero se probaron las cadenas VH sin riesgo PTM para determinar su impacto en la unión de objetivos. La unión celular de PTM Abs en células que expresan SLC34A2 humano se evaluó mediante citometría de flujo. Brevemente, las células HEK293/H_SLC34A2 se incubaron con PTM Abs (de 200 nM, dilución de 4 pliegues, 8 puntos). Después de la incubación a 4°C durante 60 minutos, las células se lavaron con tampón FACS dos veces, luego se tiñeron con anticuerpo secundario conjugado fluorescente a 4°C durante 30 minutos. Después de eso, las células se lavaron dos veces y se analizaron mediante citometría de flujo.

[0153] Los resultados del estudio (**FIG. 9A-C y Tabla 9**) muestran que los anticuerpos humanizados/sin riesgo PTM pueden unirse a SLC34A2 humanos con alta afinidad.

Tabla 9. Enlace a HEK293 de expresión SLC34A2

Anticuerpo	EC₅₀ (nM)	Arriba (MFI)
Isotipo hIgG1	NA	NA
XMT-1536	2.50	27716
xi30H9B8F9 hIgG1	1.14	32228
30H9B8F9 VH_P1/VL hIgG1	0.89	31744
30H9B8F9 VH_P2/VL hIgG1	2.04	31036
30H9B8F9 VH_P3/VL hIgG1	0.86	31483
xi62G10E4G8 hIgG1	1.95	30330
62G10E4G8 VH_P1/VL hIgG1	7.31	33356
62G10E4G8 VH_P2/VL hIgG1	2.63	29055
62G10E4G8 VH_P3/VL hIgG1	2.73	30766
xi63A11D5B4 hIgG1	2.13	30449
63A11D5B4 VH_P1/VL hIgG1	1.48	30393
63A11D5B4 VH_P2/VL hIgG1	3.74	30993
63A11D5B4 VH_P3/VL hIgG1	1.26	31638
xi90G10H7 hIgG1	1.14	32228

90G10H7.p1 hIgG1	0.89	31744
90G10H7.p2 hIgG1	2.04	31036
90G10H7.p3 hIgG1	0.86	31483
90G10H7.p4 hIgG1	1.95	30330
90G10H7.p5 hIgG1	7.31	33356
90G10H7.p6 hIgG1	2.63	29055
90G10H7.p7 hIgG1	2.73	30766
90G10H7.p8 hIgG1	2.13	30449
xi55E5B6D12 hIgG1	1.48	30393
55E5B6D12.p1 hIgG1	3.74	30993
55E5B6D12.p2 hIgG1	1.26	31638
xi91C9F1 hIgG1	1.57	28615
91C9F1.p1 hIgG1	0.68	28205
91C9F1.p2 hIgG1	2.07	26916

[0154] Del mismo modo, se probaron la unión de estos anticuerpos humanizados/sin riesgo PTM a las células OVCAR3 que expresan la proteína de forma endógena. Los resultados se muestran en **la FIG. 10** y la **Tabla 10**. Una vez más, los resultados confirmaron la afinidad de unión de estos anticuerpos.

Tabla 10. Unión a las células OVCAR3

Anticuerpo	EC ₅₀ (nM)	Arriba (MFI)
Isotipo hIgG1	NA	NA
XMT-1536	3.8	58447
xi30H9B8F9 hIgG1	1.1	69144
30H9B8F9 VH_P1/VL hIgG1	1.5	70424
xi62G10E4G8 hIgG1	5.8	71096
62G10E4G8 VH_P3/VL hIgG1	9.1	72506
xi63A11D5B4 hIgG1	9.2	78584
63A11D5B4 VH_P1/VL hIgG1	7.5	75229
xi90G10H7 hIgG1	3.9	72926
90G10H7.p1 hIgG1	2.5	73591
90G10H7.p4 hIgG1	2.2	71848
xi55E5B6D12 hIgG1	5.1	71368
55E5B6D12.p2 hIgG1	28	67983
xi91C9F1 hIgG1	1.6	63258
91C9F1.p1 hIgG1	1	63499

[0155] La unión de estos anticuerpos a Rhesus SLC34A2 también se probó mediante un procedimiento como el descrito anteriormente. Los resultados se muestran en **la FIG. 11** y la **Tabla 11**, confirmando la alta afinidad de estas secuencias sin riesgo PTM.

Tabla 11. Enlace a Rhesus SLC34A2

Anticuerpo	EC50 (nM)	Arriba (MFI)
Isotipo hIgG1	NA	NA
XMT-1536	5.8	27020
xi30H9B8F9 hIgG1	1.9	47919
30H9B8F9 VH_P1/VL hIgG1	2	47355
xi62G10E4G8 hIgG1	3.7	39085
62G10E4G8 VH_P3/VL hIgG1	4.3	36475
xi63A11D5B4 hIgG1	4.6	45513
63A11D5B4 VH_P1/VL hIgG1	3.9	39411
xi90G10H7 hIgG1	3.5	47439
90G10H7.p1 hIgG1	2.4	48938
90G10H7.p4 hIgG1	2.3	48591
xi55E5B6D12 hIgG1	4.9	46426
55E5B6D12.p2 hIgG1	~ 21808	~ 121986
xi91C9F1 hIgG1	3.9	15455
91C9F1.p1 hIgG1	2.8	26430

Ejemplo 8. Anticuerpos humanizados

[0156] Sobre la base de los resultados anteriores, cuatro de los anticuerpos anteriores, 30H9B8F9, 62G10E4G8, 63A11D5B4 y 91C9F1, continuaron desarrollándose a través de la humanización.

[0157] Las secuencias de aminoácidos de la VH y la VL de cada anticuerpo murino se compararon con la base de datos disponible de secuencias de genes Ig humanos para encontrar las secuencias de genes Ig de la línea germinal humana que mejor coincidían en general. A continuación, los CDR de los anticuerpos murinos se injertaron en las secuencias humanas emparejadas. El ADNc se sintetizó y se utilizó para producir los anticuerpos humanizados. Ciertas mutaciones inversas de los anticuerpos murinos se introdujeron de nuevo en los anticuerpos humanizados.

[0158] Las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos humanizados se proporcionan en las **Tablas 12-15** a continuación.

Secuencias humanizadas y sin riesgo PTM

A. 30-H9(B8)F9

Tabla 12A. Secuencias humanizadas

Cadena de anticuerpos	Secuencia (los residuos en negrita son mutaciones inversas; Los que tienen sin riesgo PTM se empaquetan)	SEQ ID NO:
30-H9(B8)F9 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKTSGYTFTTNMHVVKQTPGQGLEWIGAI YPGNGATAYNQFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEASAVYYCARGMYGH GAMDYWGQGTSVIVSS	1
30-H9(B8)F9.p1 VH_1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTTNMHVVRQAPGQGLEWMGAI YPGSGATAYNQFKGKRVMTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASGMYG HGAMDYWGQGTSLVTVSS	58
30-H9(B8)F9.p1 VH_2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYTFTTNMHVVRQAPGQGLEWIGAI YPGSGATAYNQFKGKRVMTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGMYG HGAMDYWGQGTSLVTVSS	59
30-H9(B8)F9.p1 VH_3	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKTSGYTFTTNMHVVRQAPGQGLEWIGAI YPGSGATAYNQFKGKRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEATAVYYCARGMYG HGAMDYWGQGTSLVTVSS	60
30-H9(B8)F9.p1 VH_4	QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKTSGYTFTTNMHVVKQAPGQGLEWIGAI YPGSGATAYNQFKGKRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEATAVYYCARGMYG HGAMDYWGQGTSLVTVSS	61
30-H9(B8)F9 VL	DIVMTQSHKFMSRSVSGDRVRITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWA TTRHSGVPDRFTGSGSGTDFIFTISNVQSEDLADYFCQQYSSNPLTFGAGT KLELK	2
30-H9(B8)F9 VL_1	DIQLTQSPSFLSASVSGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWA TTRHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSNPLTFGQGT KLEIK	62
30-H9(B8)F9 VL_2	DIQLTQSPSFLSASVSGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGKSPKLLIYWA TTRHSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYFCQQYSSNPLTFGQGT KLEIK	63
30-H9(B8)F9 VL_3	DIQMTQSPSFLSASVSGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGKSPKLLIYWA TTRHSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISVQPEDFATYFCQQYSSNPLTFGAGT KLEIK	64
30-H9(B8)F9 VL_4	DIVMTQSPSFLSASVSGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGKSPKLLIYWA TTRHSGVPDRFTGSGSGTDFIFTISSVQPEDFATYFCQQYSSNPLTFGAGT KLEIK	65

Tabla 12B. Secuencias CDR

Región	Secuencia	SEQ ID NO:
VH CDR1	TNNMH	51
VH CDR2	AIYPGNGATAYNQFKG AIYPGSGATAYNQFKG	57 52
VH CDR3	GMVGHGAMDY	53
VL CDR1	KASQDVGTAVA	54
VL CDR2	VATIOS	55
VL CDR3	QQYSSNPLT	56

Tabla 12C. Anticuerpos humanizados

30-H9(B8)F9.p1	VH_1	VH_2	VH_3	VH_4
VL_1	Z1	Z5	Z9	Z13
VL_2	Z2	Z6	Z10	Z14
VL_3	Z3	Z7	Z11	Z15
VL_4	Z4	Z8	Z12	Z16

B. 62-G10(E4)G8

Tabla 13A. Secuencias humanizadas

Cadena de anticuerpos	Secuencia (los residuos en negrita son mutaciones inversas; Los que tienen sin riesgo PTM se empaquetan)	SEQ ID NO:
62-G10(E4)G8 VH	QVQLQQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFPSYITHWVKQTPGQGLEWIGA IYPGNGDTSYIQKFQKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGT YGTSAWFTYWGQGTLLVTVSA	3
62-G10(E4)G8.p3 VH_1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFPSYITHWVRQAPGQGLEWMGA IYPGNADTSYIQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGT YGTSAWFTYWGQGTLLVTVSS	73
62-G10(E4)G8.p3 VH_2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFPSYITHWVRQAPGQGLEWIGA IYPGNADTSYIQKFQGRVTMTADKSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGT YGTSAWFTYWGQGTLLVTVSS	74
62-G10(E4)G8.p3 VH_3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFPSYITHWVKQAPGQGLEWIGA IYPGNADTSYIQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGTY GTSAWFTYWGQGTLLVTVSS	75
62-G10(E4)G8.p3 VH_4	QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFPSYITHWVKQAPGQGLEWIGA IYPGNADTSYIQKFQGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGTY GTSAWFTYWGQGTLLVTVSS	76
62-G10(E4)G8 VL	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRARQNIGNNLYWYQQKSHESPRLLIKY ASQSIGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVETEDFGVYFCQQSFSWPLTFGA GTKLELK	4
62-G10(E4)G8 VL_1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRARQNIGNNLYWYQQPGQAPRLLIYYA SQSIGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQSFSWPLTFGQG TKLEIK	77
62-G10(E4)G8 VL_2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRARQNIGNNLYWYQQKPGQSPRLLIKY ASQSIGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYFCQQSFSWPLTFGQ GTKLEIK	78
62-G10(E4)G8 VL_3	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRARQNIGNNLYWYQQKPGQSPRLLIKY ASQSIGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQSEDFAVYFCQQSFSWPLTFGQ GTKLEIK	79
62-G10(E4)G8 VL_4	EIVLTQSPATLSASPGERATLSCRARQNIGNNLYWYQQKPGQSPRLLIKY ASQSIGIPSRFSGSGSGTDFTLTISVQSEDFAVYFCQQSFSWPLTFGA GTKLEIK	80

Tabla 13B. Secuencias CDR

Región	Secuencia	SEQ ID NO:
VH CDR1	SYITH	66
VH CDR2	AIYPGNGDTSYIQKFQK	72

	AIYPGNADTSYIQKFKG	67
VH CDR3	GTYGTSWFTY	68
VL CDR1	RARQNIGNNLY	69
VL CDR2	YASQSI	70
VL CDR3	QQSFSWPLT	71

Tabla 13C. Anticuerpos humanizados

62-G10(E4)G8.p3	VH_1	VH_2	VH_3	VH_4
VL_1	Z1	Z5	Z9	Z13
VL_2	Z2	Z6	Z10	Z14
VL_3	Z3	Z7	Z11	Z15
VL_4	Z4	Z8	Z12	Z16

C. 63-A11(D5)B4

Tabla 14A. Secuencias humanizadas

Cadena de anticuerpos	Secuencia (los residuos en negrita son mutaciones inversas; Los que tienen sin riesgo PTM se empaquetan)	SEQ ID NO:
63-A11(D5)B4 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCRTSGYTFITYNMHWVKQTPGQGREWIGA IYPGNGDTSYNQFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCSISTI ITTGAVDYGQGTSTVTAS	5
63-A11(D5)B4. p1 VH_1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFITYNMHWVRQAPGQGLEWMGA IYPGSGDTSYNQKFKGRVTMTDRDSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASST IITTGAVDYGQGTLVTVSS	88
63-A11(D5)B4. p1 VH_2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCTSGYTFITYNMHWVRQAPGQGLEWIGA IYPGSGDTSYNQKFKGRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCSIST IITTGAVDYGQGTLVTVSS	89
63-A11(D5)B4. p1 VH_3	QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKTSGYTFITYNMHWVRQAPGQGLEWIGA IYPGSGDTSYNQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCSIST IITTGAVDYGQGTLVTVSS	90
63-A11(D5)B4. p1 VH_4	QVQLQQSGAEVVKPGASVKMSCKTSGYTFITYNMHWVKQAPGQGREWIGA IYPGSGDTSYNQFKGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCSISTI ITTGAVDYGQGTSTVTSS	91
63-A11(D5)B4 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKAGQSPKLLIYW TSTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLIIRSLQSEDLADYFCQQYSRIPLTFGS GTKLEIK	6
63-A11(D5)B4 VL_1	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGKVPKLLIYW TSTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQYSRIPLTFGG GTKVEIK	92
63-A11(D5)B4 VL_2	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGKSPKLLIYW TSTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLIISLQPEDVATYYCQQYSRIPLTFGG GTKVEIK	93
63-A11(D5)B4 VL_3	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYW TSTRHTGVPDRFSGSGSGTDFTLIIRSLQPEDVATYFCQYSRIPLTFGGG TKVEIK	94

63-A11(D5)B4 VL_4	DIVMTQSPSSLSTSVGDRVTITCKASQDVGTA VAWYQQKPGQSPKLLIYW TSTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLIIRSLQPED VATYFCQQYSRIPLTFGS GTKVEIK	95
----------------------	---	----

Tabla 14B. Secuencias CDR

Región	Secuencia	SEQ ID NO:
VH CDR1	TYNMH	81
VH CDR2	AIYPGNGDTSYNQKFKG AIYPGSGDTSYNQKFKG	87 82
VH CDR3	STIITTGAVDY	83
VL CDR1	KASQDVGTA	84
VL CDR2	WTSTRHT	85
VL CDR3	QQYSRIPLT	86

Tabla 14C. Anticuerpos humanizados

63-A11(D5)B4.p1	VH_1	VH_2	VH_3	VH_4
VL_1	Z1	Z5	Z9	Z13
VL_2	Z2	Z6	Z10	Z14
VL_3	Z3	Z7	Z11	Z15
VL_4	Z4	Z8	Z12	Z16

D. 91-C9F1

Tabla 15A. Secuencias humanizadas

Cadena de anticuerpos	Secuencia (los residuos en negrita son mutaciones inversas; Los que tienen sin riesgo PTM se empaquetan)	SEQ ID NO:
91-C9F1 VH	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKTSGFFFT ^Y EYIIHWVKQSHGRSLEWIGG IIPNNGVTNYKQNF ^R GKAALTADKSSNTAYMELRSLTSEDSAVYYCARWR NGYYSAMDSWGQGTSTVTVSS	7
91-C9F1.p1 VH_1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFFFT ^Y EYIIHWVRQAPGQGLEWMGG IIPNNDVTNYKQNF ^R GRVTTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWR NAYYSAMDSWGQGT ^T TVTVSS	104
91-C9F1.p1 VH_2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSGFFFT ^Y EYIIHWVRQAPGQGLEWIGG IIPNNDVTNYKQNF ^R GRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWR NAYYSAMDSWGQGT ^T TVTVSS	105
91-C9F1.p1 VH_3	QVQLVQSGAEVVKPGSSVKVSCKTSGFFFT ^Y EYIIHWVRQSPGQGLEWIGG IIPNNDVTNYKQNF ^R GRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWR NAYYSAMDSWGQGT ^T TVTVSS	106
91-C9F1.p1 VH_4	QVQLVQSGAEVVKPGSSVKISCKTSGFFFT ^Y EYIIHWVKQSPGQGLEWIGG IIPNNDVTNYKQNF ^R GRATLTADKSTNTAYMELRSSLRSEDTAVYYCARW RNAYYSAMDSWGQGT ^T TVTVSS	107
91-C9F1 VL	DIVVTQSHKFMSTSLGDRVSITCTASQDVGTA VAWYQQKPGHSPKLLIYW ASTRHTGVPERFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYFCQQYRTSPLTFGV GTKLELK	8

91-C9F1 VL_1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCTASQDVGTAFAWYQQKPGKVPKLLIYW ASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYRTSPLTFGG GTKVEIK	108
91-C9F1 VL_2	DIQMTQSPSSLSSTSVGDRTITCTASQDVGTAFAWYQQKPGKSPKLLIYW ASTRHTGVPERFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFCQQYRTSPLTFGG GTKVEIK	109
91-C9F1 VL_3	DIQVTQSPSSLSSTSVGDRTITCTASQDVGTAFAWYQQKPGKSPKLLIYW ASTRHTGVPERFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDVATYFCQQYRTSPLTFGV GTKVEIK	110
91-C9F1 VL_4	DIVVTQSPSSLSSTSVGDRTITCTASQDVGTAFAWYQQKPGKSPKLLIYW ASTRHTGVPERFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDVATYFCQQYRTSPLTFGV GTKLELK	111

Tabla 15B. Secuencias CDR

Región	Secuencia	SEQ ID NO:
VH CDR1	EYIIH	96
VH CDR2	GIIPNNGVTNYKQNFGRG GIIPNNDVTNYKQNFGRG	102 97
VH CDR3	WRNGYYSAMDS WRNAYYSAMDS	103 98
VL CDR1	TASQDVGTAFA	99
VL CDR2	WASTRHT	100
VL CDR3	QQYRTSPLT	101

Tabla 15C. Anticuerpos humanizados

91-C9F1.p1	VH_1	VH_2	VH_3	VH_4
VL_1	Z1	Z5	Z9	Z13
VL_2	Z2	Z6	Z10	Z14
VL_3	Z3	Z7	Z11	Z15
VL_4	Z4	Z8	Z12	Z16

[0159] La unión de estos anticuerpos humanizados a las células OVCAR3 se evaluó como se describió anteriormente, y los resultados se muestran en la **FIG. 12A-D** y las **Tablas 16A-D**.

Tabla 16A. Unión de un anticuerpo humanizado a OVCAR3 – 30H9B8F9

Anticuerpo	EC ₅₀ (nM)	Arriba (MFI)
Isotipo hIgG1	NA	NA
XMT-1536	6.87	28971
xi30H9B8F9 hIgG1	1.19	29312
30H9B8F9.p1 hIgG1	0.68	28737
30H9B8F9.p1.z1 hIgG1	2.75	27108
30H9B8F9.p1.z2 hIgG1	3.09	25230
30H9B8F9.p1.z3 hIgG1	2.38	19581
30H9B8F9.p1.z4 hIgG1	2.76	20368
30H9B8F9.p1.z5 hIgG1	1.43	26938
30H9B8F9.p1.z6 hIgG1	1.62	28382
30H9B8F9.p1.z7 hIgG1	1.69	26723
30H9B8F9.p1.z8 hIgG1	1.90	26229

30H9B8F9.p1.z9 hIgG1	1.59	29362
30H9B8F9.p1.z10 hIgG1	1.93	30701
30H9B8F9.p1.z11 hIgG1	1.43	26954
30H9B8F9.p1.z12 hIgG1	1.40	27646
30H9B8F9.p1.z13 hIgG1	1.03	28350
30H9B8F9.p1.z14 hIgG1	1.31	27280
30H9B8F9.p1.z15 hIgG1	1.05	26470
30H9B8F9.p1.z16 hIgG1	1.41	26538

Tabla 16B. Unión de un anticuerpo humanizado a OVCAR3 – 62G10E4G8

Anticuerpo	EC ₅₀ (nM)	Arriba (MFI)
Isotipo hIgG1	NA	NA
XMT-1536	6.82	28971
xi62G10E4G8 hIgG1	3.73	27650
62G10E4G8.p3 hIgG1	6.98	30347
62G10E4G8.p3.z1 hIgG1	943.80	87738
62G10E4G8.p3.z2 hIgG1	32.88	29698
62G10E4G8.p3.z3 hIgG1	17.33	31289
62G10E4G8.p3.z4 hIgG1	16.27	29908
62G10E4G8.p3.z5 hIgG1	~ Año 1361	~ 230025
62G10E4G8.p3.z6 hIgG1	8.06	28157
62G10E4G8.p3.z7 hIgG1	6.08	26810
62G10E4G8.p3.z8 hIgG1	8.61	29963
62G10E4G8.p3.z9 hIgG1	24.07	31332
62G10E4G8.p3.z10 hIgG1	4.87	27396
62G10E4G8.p3.z11 hIgG1	4.32	28200
62G10E4G8.p3.z12 hIgG1	2.96	25440
62G10E4G8.p3.z14 hIgG1	4.58	27907
62G10E4G8.p3.z15 hIgG1	3.76	27300
62G10E4G8.p3.z16 hIgG1	10.95	31916

Tabla 16C. Unión de un anticuerpo humanizado a OVCAR3 – 63A11D5B4

Anticuerpo	EC ₅₀ (nM)	Arriba (MFI)
Isotipo hIgG1	NA	NA
XMT-1536	6.82	28971
xi63A11D5B4 hIgG1	10.48	32147
63A11D5B4.p1 hIgG1	4.03	28244
63A11D5B4.p1.z1 hIgG1	19.58	28022
63A11D5B4.p1.z2 hIgG1	20.55	28738
63A11D5B4.p1.z3 hIgG1	17.90	28559
63A11D5B4.p1.z4 hIgG1	18.15	29017
63A11D5B4.p1.z5 hIgG1	13.46	28246
63A11D5B4.p1.z6 hIgG1	36.79	34614
63A11D5B4.p1.z7 hIgG1	61.13	40970
63A11D5B4.p1.z8 hIgG1	14.17	27880
63A11D5B4.p1.z9 hIgG1	9.12	26528
63A11D5B4.p1.z10 hIgG1	12.27	29808
63A11D5B4.p1.z11 hIgG1	10.26	27701
63A11D5B4.p1.z12 hIgG1	11.74	31674
63A11D5B4.p1.z13 hIgG1	16.42	32592
63A11D5B4.p1.z14 hIgG1	16.09	32605
63A11D5B4.p1.z15 hIgG1	9.23	30225

63A11D5B4.p1.z16 hIgG1	11.43	29478
------------------------	-------	-------

Tabla 16D. Unión de un anticuerpo humanizado a OVCAR3 – 91C9F1

Anticuerpo	EC ₅₀ (nM)	Arriba (MFI)
Isotipo hIgG1	NA	NA
XMT-1536	2.68	32389
xi91C9F1 hIgG1	1.77	32062
91C9F1.p1 hIgG1	2.29	32342
91C9F1.p1.z1 hIgG1	3.78	34220
91C9F1.p1.z2 hIgG1	3.32	34537
91C9F1.p1.z3 hIgG1	4.04	35456
91C9F1.p1.z4 hIgG1	1.12	34629
91C9F1.p1.z5 hIgG1	2.95	36861
91C9F1.p1.z6 hIgG1	1.72	36117
91C9F1.p1.z7 hIgG1	1.67	37440
91C9F1.p1.z8 hIgG1	2.13	35657
91C9F1.p1.z9 hIgG1	2.72	37027
91C9F1.p1.z10 hIgG1	2.32	38122
91C9F1.p1.z11 hIgG1	1.41	30997
91C9F1.p1.z12 hIgG1	1.77	34468
91C9F1.p1.z14 hIgG1	3.87	36194

[0160] En otra prueba, se evaluó mediante citometría de flujo la unión celular de hu Abs en células que expresan SLC34A2 humano. Brevemente, las células HEK293/H_SLC34A2, OVCAR3 y RMG-1 se incubaron con hu Abs. Después de la incubación a 4°C durante 60 minutos, las células se lavaron con tampón FACS dos veces, luego se tiñeron con anticuerpo secundario conjugado fluorescente a 4°C durante 30 minutos. Después de eso, las células se lavaron dos veces y se analizaron mediante citometría de flujo.

[0161] Los resultados del estudio (**FIG. 13A-D y Tablas 17A-D**) muestran que los Hu Abs pueden unirse a SLC34A2 humanos con alta afinidad.

Tabla 17A. Unión a líneas celulares – 30H9B8F9

Lista de clones	HEK293/H_SLC34AA2		OVCAR3		RMG-1	
	EC50	Arriba	EC50	Arriba	EC50	Arriba
XMT-1536	4.05	34736	6.82	28971	7.17	9935
xi30H9B8F9 hIgG1	1.63	40795	0.74	29312	1.19	11535
30H9B8F9.p1 hIgG1	1.18	35742	0.37	28737	1.09	11137
30H9B8F9.p1.z5 hIgG1	1.55	35156	0.94	26938	1.39	10920
30H9B8F9.p1.z6 hIgG1	1.94	33613	1.10	28382	1.78	10416
30H9B8F9.p1.z9 hIgG1	1.81	34196	1.08	29362	1.40	11618
30H9B8F9.p1.z13 hIgG1	1.05	33013	0.62	28350	0.73	10895

Tabla 17B. Unión a líneas celulares – 62G10E4G8

	HEK293/H_SLC34AA2		OVCAR3		RMG-1	
Lista de clones	EC50	Arriba	EC50	Arriba	EC50	Arriba
XMT-1536	4.05	34736	6.82	28971	7.17	9935
xi62G10E4G8 hIgG1	4.26	32706	3.73	27650	7.97	11293
62G10E4G8.p3 hIgG1	9.08	35676	6.98	30347	14.82	11229
62G10E4G8.p3.z8 hIgG1	4.42	31469	8.61	29963	11.05	10902
62G10E4G8.p3.z11 hIgG1	5.07	31855	4.32	28200	11.38	11254
62G10E4G8.p3.z15 hIgG1	2.34	33628	3.76	27300	3.69	10772

Tabla 17C. Unión a líneas celulares: 63A11D5B4

	HEK293/H_SLC34AA2		OVCAR3		RMG-1	
Lista de clones	EC50	Arriba	EC50	Arriba	EC50	Arriba
XMT-1536	4.05	34736	6.82	28971	7.17	9935
xi63A11D5B4 hIgG1	5.21	35560	10.48	32147	14.40	11224
63A11D5B4.p1 hIgG1	2.79	35551	4.03	28244	12.51	11703
63A11D5B4.p1.z5 hIgG1	4.80	35866	13.46	28246	36.23	11839
63A11D5B4.p1.z9 hIgG1	5.49	36832	9.12	26528	28.28	12195
63A11D5B4.p1.z15 hIgG1	7.12	37020	9.23	30225	40.59	13248

Tabla 17D. Unión a líneas celulares – 91C9F1

	HEK293/H_SLC34AA2		OVCAR3		RMG-1	
Lista de clones	EC50	Arriba	EC50	Arriba	EC50	Arriba
XMT-1536	2.68	32389	10.32	22452	7.17	9935
xi91C9F1 hIgG1	1.77	32062	2.50	20996	1.76	9733
91C9F1.p1 hIgG1	2.29	32342	1.10	19527	1.09	9692
91C9F1.p1.z4 hIgG1	1.12	34629	2.71	20185	3.22	9817
91C9F1.p1.z6 hIgG1	1.72	36117	2.86	20347	3.03	9560
91C9F1.p1.z7 hIgG1	1.67	37440	2.41	20461	2.25	9725
91C9F1.p1.z10 hIgG1	2.32	38122	3.96	22335	3.91	9592

[0162] En un ensayo posterior, se evaluó la afinidad de estos anticuerpos por su afinidad de unión a SLC34A2 Rhesus/rata/ratón, con los métodos descritos anteriormente. Como se muestra en la FIG. 14-16 y en la Tabla 18, estos anticuerpos humanizados mantuvieron la alta afinidad.

Tabla 18. Enlace a Rhesus SLC34A2

Anticuerpo	EC50 (nM)	Arriba (MFI)
Isotipo hIgG1	NA	NA
XMT-1536	2.6	11488
xi30H9B8F9 hIgG1	0.9	17418
30H9B8F9.p1 hIgG1	0.8	17001
30H9B8F9.p1.z5 hIgG1	0.7	15993
30H9B8F9.p1.z6 hIgG1	1.1	15133

30H9B8F9.p1.z9 hIgG1	0.9	16265
30H9B8F9.p1.z13 hIgG1	0.8	15597
xi62G10E4G8 hIgG1	1.8	13309
62G10E4G8.p3 hIgG1	5	14367
62G10E4G8.p3.z8 hIgG1	2.5	12206
62G10E4G8.p3.z11 hIgG1	3.4	14730
62G10E4G8.p3.z15 hIgG1	1.4	14363
xi63A11D5B4 hIgG1	2.3	15157
63A11D5B4.p1 hIgG1	0.7	13775
63A11D5B4.p1.z5 hIgG1	3.9	11134
63A11D5B4.p1.z9 hIgG1	1.6	11777
63A11D5B4.p1.z15 hIgG1	4.7	10342
xi91C9F1 hIgG1	1.2	11351
91C9F1.p1 hIgG1	0.8	7973
91C9F1.p1.z4 hIgG1	3.2	6719
91C9F1.p1.z6 hIgG1	8.8	8156
91C9F1.p1.z7 hIgG1	4.2	9495
91C9F1.p1.z10 hIgG1	4.2	9233

Ejemplo 8. ADCC de los anticuerpos humanizados

[0163] En este ejemplo se midió la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de los anticuerpos humanizados.

[0164] El bioensayo ADCC Reporter utiliza una lectura alternativa en un punto anterior en la activación de la vía ADCC MOA: la activación de la transcripción génica a través de la vía NFAT (factor nuclear de células T activadas) en la célula efectora. Además, el bioensayo ADCC Reporter utiliza células Jurkat modificadas genéticamente que expresan de manera estable el receptor Fc RIIIa, la variante V158 (alta afinidad) y un elemento de respuesta NFAT que impulsa la expresión de luciferasa de luciérnaga como células efectoras. La actividad biológica de los anticuerpos en ADCC MOA se cuantifica a través de la luciferasa producida como resultado de la activación de la vía NFAT; La actividad de la luciferasa en la célula efectora se cuantifica con lectura de luminiscencia. La señal es alta y el fondo del ensayo es bajo.

[0165] Se incubaron diluciones seriadas de hu Abs durante 6 horas de inducción a 37 ° C con células efectoras Jurkat modificadas (células efectoras de bioensayo ADCC), con células diana de bioensayo ADCC (que expresan SLC34A2). La actividad de la luciferasa se cuantificó utilizando el reactivo tampón de ensayo de luciferasa ONE-Glo™.

[0166] Los resultados se muestran en **la FIG. 17 y la Tabla 19**, confirmando la potente actividad de inducción de ADCC de estos anticuerpos humanizados.

Tabla 19. Actividad ADCC

Anticuerpo	EC50 (nM)	Arriba (MFI)
Isotipo hIgG1	~ 33.32	14765
XMT-1536	0.76	126843
RG-7599	~ 1.310	15689
xi30H9B8F9 hIgG1	1.26	108750
30H9B8F9.p1 hIgG1	2.52	126415
30H9B8F9.p1.z5 hIgG1	0.72	135100
30H9B8F9.p1.z6 hIgG1	1.25	134931
30H9B8F9.p1.z9 hIgG1	1.53	144513
30H9B8F9.p1.z13 hIgG1	0.96	142916
xi62G10E4G8 hIgG1	4.56	100880
62G10E4G8.p3 hIgG1	4.23	122270
62G10E4G8.p3.z11 hIgG1	3.78	116421
62G10E4G8.p3.z15 hIgG1	5.39	122634
63A11D5B4.p1 hIgG1	2.83	113949
63A11D5B4.p1.z5 hIgG1	0.95	116223
63A11D5B4.p1.z9 hIgG1	1.69	116236
63A11D5B4.p1.z15 hIgG1	1.47	121606
xi91C9F1 hIgG1	1.96	132927
91C9F1.p1 hIgG1	3.31	143117
91C9F1.p1.z4 hIgG1	3.14	137231
91C9F1.p1.z6 hIgG1	1.77	125245
91C9F1.p1.z7 hIgG1	2.12	123589
91C9F1.p1.z10 hIgG1	2.37	138028

Ejemplo 9. Pruebas de anticuerpos humanizados seleccionados

[0167] Sobre la base de los resultados anteriores, se seleccionaron cuatro anticuerpos humanizados para su posterior desarrollo, incluidos 30-H9(B8)F9.p1.z5, 62-G10(E4)G8.p3.z15, 63-A11(D5)B4.p1.z9 y 91-C9F1.p1.z7.

[0168] Los anticuerpos candidatos se sometieron a pruebas adicionales en comparación con los anticuerpos de referencia, XMT-1536 y RG-7599. **La figura 18** muestra la comparación de la unión a la SLC34A2 humana en diferentes tipos de células. **En la figura 19** se compara la reactividad cruzada de los anticuerpos con la proteína SLC34A2 de diferentes especies. **En la FIG. 20A-B** se comparan sus actividades de inducción ADCC.

[0169] Los resultados anteriores se resumen en **la Tabla 20**, que muestra que los anticuerpos desarrollados instantáneamente superaron significativamente a los puntos de referencia (XMT-1536 y RG-7599) en muchos aspectos.

Tabla 20. Resumen de la comparación

Ensayos	30H9B8F9	62G10E4G8	63A11D5B4	91C9F1	BMK-01 (XMT-1536)	BMK-02 (RG-7599)
Unión-HEK293	2.40nM	2.86nM	5.87nM	2.72nM	4.27nM	8.25nM
Unión-OVCAR3	0.90nM	3.80nM	9.10nM	2.40nM	6.80nM	
Unión-RMG-1	1.40nM	3.70nM	28.30nM	2.30nM	7.20nM	
Unión MDAH2774	1.28nM	2.82nM	15.14nM	2.06nM	7.09nM	8.74nM
Cruce de especies- Cyno	0.97nM	1.63nM	4.45nM	45.67nM	3.72nM	1080.00nM
Rhesus entre especies	0.7nM	1.4nM	1.6nM	4.2nM	2.6nM	
Cruce de especies - Rata	1.81nM	4.04nM	3.04nM	2.62nM	4.48nM	714.80nM
Cruce de especies - Ratón	2.06nM	5.74nM	5.38nM	3.34nM	6.13nM	411.70nM
ADCC-HEK293	1.40nM	1.55nM	0.52nM	0.75nM	0.76nM	2.02nM
ADCC-OVCAR3	0.16nM	0.56nM	0.30nM	0.15nM	0.25nM	2.97nM
Efecto citotóxico - MDAH-2774	0.21nM	0.24nM	1.50nM	0.39nM	0.28nM	6.83nM
Efecto citotóxico - OVCAR3	0.020nM	0.025nM	0.060nM	0.014nM	0.029nM	0.325nM

* * *

[0170] La presente divulgación no debe estar limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas que pretenden ser ilustraciones únicas de aspectos individuales de la divulgación, y cualquier composición o método que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance de esta divulgación. Será evidente para los expertos en la materia que se pueden hacer varias modificaciones y variaciones en los métodos y composiciones de la presente divulgación sin apartarse del espíritu o alcance de la misma. Por lo tanto, se pretende que la presente divulgación abarque las modificaciones y variaciones de esta divulgación, siempre que entren en el ámbito de las reclamaciones adjuntas y sus equivalentes.

[0171] Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en esta especificación se incorporan aquí por referencia en la misma medida en que si cada publicación individual o solicitud de patente se indicara específica e individualmente que se incorporaría por referencia.