



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 403**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04778714 .8**

96 Fecha de presentación : **21.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1660513**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2006**

54

Título: **Conjugado citotóxico específico para el antígeno CA6 y métodos para usar el mismo.**

30

Prioridad: **21.07.2003 US 488447 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.06.2011

73

Titular/es: **IMMUNOGEN, Inc.**
830 Winter Street
Waltham, Massachusetts 02451, US

72

Inventor/es: **Payne, Gillian;**
Chun, Philip y
Tavares, Daniel, J.

74

Agente: **Ruo Null, Alessandro**

ES 2 360 403 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Conjugado citotóxico específico para el antígeno CA6 y métodos para usar el mismo

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

10 **[0001]** La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal murino anti-glucótopo CA6, y versiones humanizadas o revestidas del mismo. La presente invención también se refiere a fragmentos de unión a epítipo del anticuerpo monoclonal anti-glucótopo CA6, así como a fragmentos de unión a epítipo de versiones humanizadas y revestidas del anticuerpo monoclonal anti-glucótopo CA6.

15 **[0002]** La presente invención se refiere adicionalmente a conjugados citotóxicos que comprenden un agente de unión celular y un agente citotóxico, composiciones terapéuticas que comprenden el conjugado, métodos para usar los conjugados en la inhibición del crecimiento celular y el tratamiento de enfermedades, y un kit que comprende el conjugado citotóxico. En particular, el agente de unión celular es un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítipo del mismo, que reconoce y se une al glucótopo CA6 o una versión humanizada o revestida del mismo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 **[0003]** Ha habido numerosos intentos por desarrollar agentes terapéuticos anti-cáncer que destruyan específicamente células cancerosas diana sin dañar las células y el tejido no cancerosas adyacente. Dichos agentes terapéuticos tienen el potencial de mejorar enormemente el tratamiento del cáncer en pacientes humanos.

25 **[0004]** Un enfoque prometedor ha sido unir agentes de unión celular, tales como anticuerpos monoclonales, con fármacos citotóxicos (Sela et al., en *Immunoconjugates* 189-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghose et al., en *Targeted Drugs* 1-22 (E. Goldberg, ed. 1983); Diener et al., en *Antibody mediated delivery systems* 1-23 (J. Rodwell, ed. 1988); Pietersz et al., en *Antibody mediated delivery systems* 25-53 (J. Rodwell, ed. 1988); Bumol et al., en *Antibody mediated delivery systems* 55-79 (J. Rodwell, ed. 1988)). Dependiendo de la selección del agente de unión celular, estos conjugados citotóxicos pueden diseñarse para que reconozcan y se unan solamente a tipos específicos de células cancerosas, en base al perfil de expresión de moléculas expresadas sobre la superficie de dichas células.

30 **[0005]** Se han usado fármacos citotóxicos tales como metotrexato, daunorrubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalán, mitomicina C, y clorambucil en dichos conjugados citotóxicos, unidos a una diversidad de anticuerpos monoclonales murinos. En algunos casos, las moléculas de fármacos se unieron a las moléculas de anticuerpo a través de una molécula vehículo intermediaria tal como albúmina sérica (Garnett et al., 46 *Cancer Res.* 2407-2412 (1986); Ohkawa et al., 23 *Cancer Immunol. Immunother.* 81-86 (1986); Endo et al., 47 *Cancer Res.* 1076-1080 (1980)), dextrano (Hurwitz et al., 2 *Appl. Biochem.* 25-35 (1980); Manabi et al, 34 *Biochem. Pharmacol.* 289-291 (1985); Dillman et al., 46 *Cancer Res.* 4886-4891 (1986); Shoval et al., 85 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 8276-8280 (1988)), o ácido poliglutámico (Tsukada et al., 73 *J. Natl. Canc. Inst.* 721-729(1984); Kato et al., 27 *J. Med. Chem.* 1602-1607 (1984); Tsukada et al., 52 *Br. J. Cancer* 111-116 (1985)).

35 **[0006]** Como ejemplo de un conjugado específico que se ha mostrado algo prometedor, está el conjugado del anticuerpo C242, dirigido contra CanAg, un antígeno expresado en tumores colorrectales y pancreáticos, y el derivado de maitansina DM1 (Liu et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 8618-8623 (1996)). La evaluación *in vitro* de este conjugado indicó que su afinidad de unión hacia CanAg expresada sobre la superficie celular era elevada con un valor de K_d aparente de 3×10^{-11} M, y su potencia citotóxica para células CanAg positivas era elevada con una IC_{50} de 6×10^{-11} M. Esta citotoxicidad era dependiente de antígeno ya que se bloqueaba por un exceso de anticuerpo no conjugado, y ya que las células negativas para el antígeno eran más de 100 veces menos sensibles al conjugado. Otros ejemplos de conjugados de anticuerpo-DM1 tanto con alta afinidad por células diana respectivas y alta citotoxicidad selectiva de antígeno incluyen los de huN901, una versión humanizada de un anticuerpo contra CD56 humano; huMy9-6, una versión humanizada de un anticuerpo contra CD33 humana; huC242, una versión humanizada de un anticuerpo contra el epítipo CanAg Muc1; huJ591, un anticuerpo desimmunizado contra PSMA; trastuzumab, un anticuerpo humanizado contra Her2/neu; y bivatuzumab, un anticuerpo humanizado contra CD44v6.

45 **[0007]** El desarrollo de conjugados citotóxicos adicionales que reconozcan específicamente tipos particulares de células cancerosas será importante en la mejora continuada de los métodos usados para tratar a pacientes con cáncer.

50 **[0008]** Para ese fin, la presente invención se refiere al desarrollo de anticuerpos que reconozcan y se unan a moléculas/receptores expresados sobre la superficie de células cancerosas, y al desarrollo de nuevos conjugados citotóxicos que comprendan agentes de unión celular, tales como anticuerpos, y agentes citotóxicos que se dirijan específicamente a las moléculas/receptores expresados sobre la superficie de células cancerosas.

55 **[0009]** Más específicamente, la presente invención se refiere a la caracterización de un nuevo sialoglucótopo CA6 en el receptor de mucina Muc1 expresado por células cancerosas, y a la provisión de anticuerpos, preferiblemente anticuerpos humanizados, que reconozcan el nuevo sialoglucótopo CA6 de la mucina Muc1 y que puedan usarse para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glucótopo CA6 en el contexto de un agente citotóxico.

70 **SUMARIO DE LA INVENCION**

75 **[0010]** La presente invención proporciona anticuerpos humanizados que reconocen específicamente y se unen a un nuevo sialoglucótopo CA6 del receptor de mucina Muc1, o un fragmento de unión a epítipo del mismo. En otra realización, la presente invención incluye un anticuerpo humanizado, o un fragmento de unión a epítipo del mismo, que reconoce el nuevo sialoglucótopo CA6 ("el glucótopo CA6") del receptor de mucina Muc1. En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 1.

[0011] La invención se refiere a versiones revestidas o humanizadas del anticuerpo monoclonal murino anti-CA6, DS6 donde los restos expuestos en superficie del anticuerpo, o sus fragmentos de unión a epítipo, están reemplazados tanto en la cadena ligera como en la cadena pesada para parecerse mucho más a las superficies de anticuerpos humanos conocidos. Los anticuerpos humanizados y los fragmentos de unión a epítipo de los mismos de la presente invención tienen propiedades mejoradas ya que son mucho menos inmunogénicos (o completamente no inmunogénicos) en sujetos humanos a los que se administran que las versiones completamente murina. Por tanto, los anticuerpos DS6 humanizados y los fragmentos de unión a epítipo de los mismos de la presente invención reconocen específicamente un nuevo sialoglucótopo en el receptor de mucina Muc1, es decir, el glucótopo CA6, mientras que no son inmunogénicos para un ser humano. Los anticuerpos humanizados y los fragmentos de unión a epítipo de los mismos pueden conjugarse con un fármaco, tal como un maitansinóide, para formar un profármaco que tenga citotoxicidad específica hacia células que expresan el antígeno dirigiendo el fármaco al sialoglucótopo CA6 Muc1. Los conjugados citotóxicos que comprenden dichos anticuerpos y fármacos pequeños, altamente tóxicos (por ejemplo, maitansinóides, taxanos, y análogos de CC-1065) por tanto pueden usarse como agente terapéutico para el tratamiento de tumores, tales como tumores de mama y ovario.

[0012] Las versiones humanizadas del anticuerpo DS6 de la presente invención se caracterizan completamente en este documento con respecto a sus secuencias de aminoácidos respectivas de las regiones variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, las secuencias de ADN de los genes de las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada, la identificación de las CDR, la identificación de sus aminoácidos de superficie, y descripción de un medio para su expresión en forma recombinante.

[0013] El anticuerpo DS6 humanizado o un fragmento de unión a epítipo del mismo tiene una cadena pesada que incluye las CDR que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEC ID N°: 1, 21 y 3.

S Y N M H (SEC ID N°: 1),
Y I Y P O N G A T N (SEC ID N°: 21)
G D S V P F A Y (SEC ID N°: 3),

y que tiene una cadena ligera que comprende las CDR que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEC ID N°: 4-6:

S A H S S V S F M H (SEC ID N°: 4),
S T S S L A S (SEC ID N°: 5),
Q Q R S S F P L T (SEC ID N°: 6).

[0014] Los anticuerpos DS6 humanizados y los fragmentos de unión a epítipo de los mismos también tiene una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comparte una identidad de secuencia de al menos el 98% con una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 8:

EIVLTQSPATMSASPERVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYS
TSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG
AGTKLELKR (SEC ID N°:8).

[0015] Así mismo, los anticuerpos DS6 humanizados y fragmentos de unión a epítipo de los mismos tienen una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comparte una identidad de secuencia de al menos el 98% con una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 11:

QAQLQVSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE
WIGYIYPNGATNYNQKFQGKATLTADTSSSTAYMQISLTSSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGLTVTSA (SEC ID N°:10)
QAQLQVSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE
WIGYIYPNGATNYNQKFQGKATLTADPSSSTAYMQISLTSSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGLTVTSA (SEC ID N°: 11).

[0016] En otra realización, se proporcionan anticuerpos DS6 humanizados y fragmentos de unión a epítipo de los mismos que tienen una región variable de cadena ligera humanizada o revestida que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEC ID N°: 8:

EIVLTQSPATMSASPERVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYS
TSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG
AGTKLELKR. (SEC ID N°: 8).

[0017] Así mismo, se proporcionan anticuerpos DS6 humanizados y fragmentos de unión a epítipo de los mismos que tienen una región variable de cadena pesada humanizada o revestida que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a las SEC ID N°: 10 ó la SEC ID N°: 11, respectivamente:

QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGQGLE

WIGYIYPNGATNYNQKFQGKATLTADTSSSTAYMQISLTSSEDSAVY

5 **FCARGDSVPFAYWGQGLTVTSA (SEC ID N°: 10).**

QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGQGLE

WIGYIYPNGATNYNQKFQGKATLTADPSSSTAYMQISLTSSEDSAVY

10 **FCARGDSVPFAYWGQGLTVTSA (SEC ID N°: 11).**

15 **[0018]** Los anticuerpos DS6 humanizados y fragmentos de unión a epítipo de los mismos de la presente invención también pueden incluir la sustitución en restos de aminoácidos de la cadena ligera y/o pesada en una o más posiciones definidas por los restos con un asterisco en la Tabla 1 que representan los restos flanqueantes superficiales murinos encontrados en 5 Angstrom de una CDR que requiere cambio a un resto humano. Por ejemplo, el primer resto aminoacídico Q en la secuencia murina (SEC ID N°: 7) se ha reemplazado por E (SEC ID N°: 8) para humanizar el anticuerpo. Sin embargo, a causa de la proximidad de este resto a una CDR, una retromutación al resto murino Q puede ser necesaria para mantener la afinidad del anticuerpo.

Tabla 1

Restos flanqueantes de muDS6 próximos a una CDR (numeración de Kabat)	
Cadena ligera	Cadena pesada
Q1*	Q1
V3	K64*
T5	P73*
P40	S74
G57	
A60	
S67	
E81	

25 **[0019]** Adicionalmente se muestra en la Tabla 2 los restos superficiales de la región variable de muDS6 alineados con los tres restos superficiales de la región variable humana más homólogos. Los restos aminoacídicos de la Tabla 1 corresponden a los restos aminoacídicos subrayados de la Tabla 2.

Tabla 2

Las 3 primeras superficies de anticuerpo humano más homólogas		
Anticuerpo	Cadena ligera	SEC ID N°:
muDS6	<u>Q</u> VTAIPKPGGASREK	SEC ID N°: 12
28E4	EVTATPRPGGASSEK	SEC ID N°: 13
HAZcPB	EVTGTPRPGGDSREK	SEC ID N°: 14
SSaPB	EVTGTPRPGGDSREK	SEC ID N°: 15
Anticuerpo	Cadena pesada	SEC ID N°:
muDS6	<u>Q</u> YQALRSKKPGQQKKGPSSEQS	SEC ID N°: 16
28E4	QVAVKPKKPGQQKQGTSSSEQS	SEC ID N°: 17
HAZcPB	-QVAVKPKKPGQQKQGESSEQS	SEC ID N°: 18
SSaPB	-QVAVKPKKPGQQKQGESSEQS	SEC ID N°: 19

30 **[0020]** La presente invención proporciona adicionalmente conjugados citotóxicos que comprenden (1) un agente de unión celular que reconoce y se une al glucótopo CA6, y (2) un agente citotóxico. En los conjugados citotóxicos, el agente de unión celular tiene una elevada afinidad por el glucótopo CA6 y el agente citotóxico tiene un elevado grado de citotoxicidad para células que expresan el glucótopo CA6, de modo que los conjugados citotóxicos de la presente invención forman agentes de eliminación eficaces.

35 **[0021]** El agente de unión celular es el anticuerpo humanizado anti-CA6 o un fragmento de unión a epítipo del mismo de las reivindicaciones 1-3, donde está unido covalentemente un agente citotóxico, directamente o mediante un enlazador escindible o no escindible, al anticuerpo o fragmento de unión a epítipo del mismo. En realizaciones más preferidas, el agente de unión celular es el anticuerpo humanizado de las reivindicaciones 1-3, y el agente citotóxico es un taxol, un maitansinóide, CC-1065 o un análogo de CC-1065.

40 **[0022]** En realizaciones preferidas de la invención, el agente de unión celular es el anticuerpo humanizado de las reivindicaciones 1-3 y el agente citotóxico es un fármaco citotóxico tal como un maitansinóide o un taxano.

45 **[0023]** Más preferiblemente, el agente de unión celular es el anticuerpo humanizado de las reivindicaciones 1-3 y el agente citotóxico es un compuesto de maitansina, tal como DM1 o DM4.

50 **[0024]** La presente invención también incluye un método in vitro para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glucótopo CA6 de acuerdo con la reivindicación 52. El método para inhibir el crecimiento de la célula que expresa el glucótopo CA6 provoca la muerte de la célula.

[0025] La presente invención también proporciona una composición terapéutica que comprende el conjugado citotóxico, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0026] La presente invención incluye adicionalmente composiciones terapéuticas para su uso en la fabricación de medicamentos para tratar el cáncer. El conjugado citotóxico comprende el anticuerpo humanizado de las reivindicaciones 1-9 y un agente citotóxico. En realizaciones más preferidas, el conjugado citotóxico comprende un conjugado de anticuerpo humanizado DS6-DM1, anticuerpo humanizado DS6-DM4 o un conjugado de anticuerpo humanizado DS6-taxano donde el anticuerpo humanizado DS6 es el anticuerpo de las reivindicaciones 1-3, y el conjugado se administra junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0027] La presente invención también incluye un kit que comprende un conjugado de anticuerpo humanizado anti-CA-agente citotóxico e instrucciones para su uso. El anticuerpo humanizado anti-CA6 es el anticuerpo humanizado DS6 de las reivindicaciones 1-3, el agente citotóxico es un compuesto de maitansina, tal como DM1 o DM4, o un taxano, y las instrucciones son para usar los conjugados en el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer. El kit también puede incluir componentes necesarios para la preparación de una formulación farmacéuticamente aceptable, tal como un diluyente si el conjugado está en estado liofilizado o en forma concentrada, y para administración de la formulación.

[0028] La presente invención también incluye derivados de anticuerpos que se unen específicamente y reconocen el glucótopo CA6. En realizaciones preferidas, los derivados de anticuerpos se preparan revistiendo o humanizando anticuerpos que se unen al glucótopo CA6, donde los derivados tienen inmunogenicidad disminuida hacia el hospedador.

[0029] La presente invención proporciona adicionalmente anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que están adicionalmente marcados para su uso en investigación o aplicaciones de diagnóstico. En realizaciones preferidas, el marcador es un radiomarcador, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de formación de imágenes o un ión metálico.

[0030] Un método para el diagnóstico del cáncer puede comprender el uso de dichos anticuerpos humanizados marcados o fragmentos de unión a epítipo de los mismos, administrados a un sujeto que se sospecha que tiene cáncer, donde la distribución del marcador dentro del cuerpo del sujeto se mide o controla.

[0031] La presente invención también proporciona composiciones terapéuticas o farmacéuticas y medicamentos para tratar el cáncer, donde dichas composiciones o medicamentos pueden administrarse, solos o en combinación con otros agentes citotóxicos o terapéuticos, comprendiendo dichas composiciones o medicamentos el conjugado de anticuerpo humanizado de esta invención. El cáncer puede ser uno o más de, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de colon, carcinoma de ovario, cáncer endometrial, osteosarcoma, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer pulmonar, carcinoma sinovial, cáncer pancreático, un sarcoma o un carcinoma en el que se exprese CA6 u otro cáncer aún por determinar en el que se exprese predominantemente el glucótopo CA6.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0032] La Figura 1 muestra los resultados de estudios realizados para determinar la capacidad del anticuerpo DS6 de unirse a la superficie de líneas celulares cancerosas seleccionadas. Se midió la fluorescencia de líneas celulares incubadas con el anticuerpo primario DS6 y anticuerpos secundarios anti-IgG(H+L) de ratón conjugados con FITC por citometría de flujo. El anticuerpo DS6 se unía a células Caov-3 (Figura 1A) y T-47D (Figura 1B) con una Kd aparente de 1,848 nM y 2,586 nM respectivamente. Las líneas celulares negativas a antígeno, SK-OV-3 (Figura 1C) y Colo205 (Figura 1D) no mostraron unión específica de antígeno.

[0033] La Figura 2 muestra los resultados de un análisis dot blot de la expresión de epítipos. Los lisados celulares Caov-3 (Figura 2A y Figura 2B), SKMEL28 (Figura 2C), y Colo205 (Figura 2D) se transfirieron individualmente en manchas sobre membranas de nitrocelulosa y después se incubaron individualmente con pronasa, proteinasa K, neuraminidasa o ácido peryódico. Las membranas después se inmunotransfirieron con el anticuerpo DS6 (Figura 2A), el anticuerpo CM1 (Figura 2B), el anticuerpo R24 (Figura 2C), o el anticuerpo C242 (Figura 2D).

[0034] La Figura 3 muestra los resultados de un análisis dot blot de la expresión de antígenos DS6. Los lisados celulares Caov-3 se transfirieron individualmente en manchas en membranas de PVDF y después se incubaron en presencia de ácido trifluorometanosulfónico (TFMSA). Las membranas después se inmunotransfirieron con el anticuerpo CM1 (1 y 2) y el anticuerpo DS6 (3 y 4).

[0035] La Figura 4 muestra los resultados del análisis de glucótopos del antígeno DS6. Los lisados Caov-3 pretratados con N-glucanasa ("N-gly"), O-glucanasa ("O-gly"), y/o sialidasa ("S") se transfirieron en manchas sobre nitrocelulosa y después se inmunotransfirieron con el anticuerpo DS6 o el anticuerpo CM1 (Muc-1 VNTR).

[0036] La Figura 5 muestra los resultados del análisis de transferencia de western del antígeno DS6. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron ("IP") y se inmunotransfirieron con el anticuerpo DS6. El anticuerpo corresponde a una banda de proteína de >250 kDa observada en células Caov-3 (Figura 5A y Figura 5B) y T47D (Figura 5C) positivas al antígeno. Las líneas celulares SK-OV-3 (Figura 5D) y Colo205 (Figura 5E) negativas al antígeno no muestran esta banda. Después de la inmunoprecipitación, se incubaron perlas de proteína G de los lisados celulares Caov-3 con (Figura 5A) neuraminidasa ("N") o (Figura 5B) ácido peryódico ("PA"). Se procesaron controles de anticuerpo ("a"), de lisado pre-IP ("Lis") y flujo post-IP ("FT") en el mismo gel. Los inmunoprecipitados Caov-3 también se incubaron con N-glucanasa ("N-gly"), O-glucanasa ("O-gly"), y/o sialidasa ("S") (véase Figura 5F), donde la mancha de transferencia se sondeó alternativamente con DS6 biotinilado y estreptavidina-HRP.

[0037] La Figura 6 muestra los resultados de inmunoprecipitaciones y/o inmunotransferencias del anticuerpo DS6 y el anticuerpo CM1 sobre lisados celulares Caov-3 (Figura 6A) y HeLa (Figura 6B). Las señales de transferencia de western de CM1 y DS6 solapantes significan que el antígeno DS6 está en la proteína Muc1. En

lisados HeLa, el doblete Muc1 es el resultado de la expresión Muc1 dirigida por alelos distintos que difieren en su cantidad de repeticiones en tándem.

5 **[0038]** La Figura 7 muestra un diseño ELISA tipo sándwich de anticuerpo DS6 (Figura 7A) y una curva patrón (Figura 7B). La curva patrón se generó usando concentraciones conocidas de patrones CA15-3 disponibles en el mercado (donde 1 unidad de CA15-3 = 1 unidad de DS6).

10 **[0039]** La Figura 8 muestra curvas patrón de ELISA cuantitativa. Las curvas patrón de la señal del anticuerpo de detección (estreptavidina-HRP / biotina-DS6) (Figura 8C) se determinaron usando concentraciones conocidas de biotina-DS6 capturado por anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón sembrado en placas (Figura 8A) o unido directamente en la placa ELISA (Figura 8B).

15 **[0040]** La Figura 9 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (Figura 9A) y la cadena pesada (Figura 9B) para el anticuerpo DS6 murino. Las tres CDR en cada secuencia están subrayadas (definiciones de Kabat).

20 **[0041]** La Figura 10 muestra las CDR de cadena ligera (Figura 10A) y pesada (Figura 10B) del anticuerpo DS6 murino determinadas por definiciones de Kabat. El software de modelado AbM produce una definición ligeramente diferente para las CDR de cadena pesada (Figura 10C).

25 **[0042]** La Figura 11 muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera ("muDS6LC") (restos 1-95 de la SEC ID N°:7) y la cadena pesada (muDS6HC") (restos 1-98 de la SEC ID N°:9) para el anticuerpo DS6 murino alineadas con las secuencias de la línea germinal para los genes IgV?ap4 (SEC ID N°:23) y IgVh J558.41 (SEC ID N°:24). El gris indica divergencia de secuencia.

30 **[0043]** La Figura 12 muestra las diez secuencias de anticuerpo de cadena ligera y de cadena pesada más homólogas con las secuencias de DS6 murino (muDS6) de cadena ligera ("muDS6LC") y cadena pesada ("muDS6HC") que tienen archivos de estructura resuelta en la base de datos de Brookhaven. Las secuencias están alineadas en orden de más a menos homólogas.

35 **[0044]** La Figura 13 muestra los datos de accesibilidad de superficie y los cálculos para predecir qué restos flanqueantes de la región variable de cadena ligera del anticuerpo DS6 murino son accesibles en la superficie. Las posiciones con una accesibilidad superficial promedio del 25-35% están marcadas (**?*) y se sometieron a la segunda ronda de análisis. Región variable de cadena ligera del anticuerpo DS6 (Figura 13A) y región variable de cadena pesada (Figura 13B).

40 **[0045]** La Figura 14 muestra el mapa del plásmido de expresión de mamíferos prDS6 v1.0. Este plásmido se usó para construir y expresar los anticuerpos DS6 recombinantes quiméricos y humanizados.

45 **[0046]** La Figura 15 muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera (Figura 15A) y cadena pesada (Figura 15B) del anticuerpo DS6 murino ("muDS6") y humanizado ("huDS6") (v1.0 y v1.2).

50 **[0047]** La Figura 16 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la región variable de cadena ligera para el anticuerpo DS6 humanizado ("huDS6") (v1.0 y v1.2).

55 **[0048]** La Figura 17 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo DS6 humanizado ("huDS6") v1.0 (Figura 17A) y v1.2 (Figura 17B).

60 **[0049]** La Figura 18 muestra las curvas de unión por citometría de flujo de los clones muDS6 y huDS6 a partir de un ensayo realizado en células WISH. Las afinidades de unión de los clones DS6 (Figura 18A) humanos quimérico, v1.0, y v1.2 (Kd = 3,15, 3,71, y 4,20 nM, respectivamente) son comparables con DS6 murino (Figura 18B) desnudo y biotinilado (Kd = 1,93 y 2,80 nM, respectivamente).

65 **[0050]** La Figura 19 muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva de anticuerpos huDS6 con muDS6. (Figura 19A) se incubaron células WISH con biotina-muDS6 y estreptavidina-DTAF produciendo una curva de unión con una Kd aparente de 6,76 nM. (Figura 19B) se combinaron concentraciones variables de muDS6 desnudo, huDS6 v1.0 y v1.2 con 2 nM de biotina-muDS6 y estreptavidina-DTAF secundario.

70 **[0051]** La Figura 20 muestra los resultados de una determinación de la afinidad de unión de anticuerpos DS6 no conjugados frente a un conjugado de anticuerpos DS6-DM1. Los resultados demostraron que la conjugación con DM1 no afectaba de forma adversa a la afinidad de unión al anticuerpo. La Kd aparente del conjugado anticuerpo DS6-DM1 (3,902 nM) ("DS6-DM1") era ligeramente mayor que el anticuerpo desnudo (2,020 nM) ("DS6").

75 **[0052]** La Figura 21 muestra los resultados de un ensayo de viabilidad celular indirecta usando el anticuerpo DS6 en presencia o ausencia del conjugado DM1 anti-IgG (H+L) de ratón (2°Ab-DM1). Las células Caov-3 positivas a antígeno se eliminaron de un modo dependiente de anticuerpo DS6 (IC₅₀ = 424,9 pM) solamente en presencia del conjugado secundario ("DS6 + 2°Ab-DM1").

80 **[0053]** La Figura 22 muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo DS6 y el anticuerpo DS6 humanizado. Los resultados demostraron que no había efecto mediado por CDC del anticuerpo DS6 o el anticuerpo DS6 humanizado (v1.0 y v1.2) sobre células HPAC (Figura 22A) y ZR-75-1 (Figura 22B).

85 **[0054]** La Figura 23 muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad *in vitro* de un conjugado anticuerpo DS6-DM1 frente a maitansina libre. En un ensayo clonogénico, se ensayaron líneas celulares de cáncer de ovario (Figura 23A), mama (Figura 23B), cervical (Figura 23C), y pancreático (Figura 23D) positivas al antígeno DS6 para la

citotoxicidad de exposición continua a un conjugado anticuerpo DS6-DM1 (paneles de la izquierda). Estas líneas celulares se ensayaron de forma similar para la sensibilidad a maitansina por una exposición de 72 horas a maitansina libre (paneles de la derecha). Las líneas celulares de cáncer de ovario ensayadas eran OVCAR5, TOV-21G, Caov-4 y Caov-3. Las líneas celulares de cáncer de mama ensayadas fueron T47D, BT-20 y BT-483. Las líneas celulares de cáncer cervical fueron KB, HeLa y WISH. Las líneas celulares de cáncer pancreático ensayadas fueron HPAC, Hs766T y HPAF-II.

[0055] La Figura 24 muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad in vitro de un conjugado anticuerpo DS6-DM1. En un ensayo de viabilidad celular con MTT, se eliminaron células cancerosas de ovario (Figura 24A, Figura 24B y Figura 24C), mama (Figura 24D y Figura 24E), cervical (Figura 24F y Figura 24G), y pancreático (Figura 24H y Figura 24I) humanas de un modo dependiente del conjugado anticuerpo DS6-DM1. DS6 desnudo no afectaba de forma adversa al crecimiento de estas células, lo que indica que la conjugación con DM1 es necesaria para la citotoxicidad.

[0056] La Figura 25A muestra los resultados de un estudio de eficacia antitumoral in vivo de un conjugado anticuerpo DS6-DM1 sobre senoinjertos de tumor KB subcutáneos establecidos. Las células tumorales se inocularon en el día 0, y el primer tratamiento se dio en el día 6. Los tratamientos con inmunoconjugado continuaron diariamente durante un total de 5 dosis. Los animales de control con PBS se sacrificaron con eutanasia una vez que los volúmenes de los tumores excedieron de 1500 mm³. El conjugado se dio a una dosis de 150 o 225 µg/kg de DM1, que corresponde a concentraciones de anticuerpo de 5,7 y 8,5 mg/kg respectivamente. Los pesos corporales (Figura 25B) de los ratones se controlaron durante el transcurso del estudio.

[0057] La Figura 26 muestra los resultados de un estudio de eficacia antitumoral de un conjugado anticuerpo DS6-DM1 sobre senoinjertos de tumor subcutáneo establecidos. Se inocularon células OVCAR5 (Figura 26A y Figura 26B), TOV-21G (Figura 26C y Figura 26D), HPAC (Figura 26E y Figura 26F), y HeLa (Figura 26G y Figura 26H) en el día 0, y los tratamientos con inmunoconjugados se dieron en los días 6 y 13. Los animales de control con PBS se sacrificaron por eutanasia una vez que los volúmenes de los tumores excedieron de 1000 mm³. El conjugado se dio a una dosis de 600 µg/kg de DM1, que corresponde a una concentración de anticuerpo de 27,7 mg/kg. El volumen del tumor (Figura 26A, Figura 26C, Figura 26E, y Figura 26G) y el peso corporal (Figura 26B, Figura 26D, Figura 26F, y Figura 26H) de los ratones se controlaron durante el transcurso del estudio.

[0058] La Figura 27 muestra los resultados de un estudio de eficacia in vivo de un conjugado anticuerpo DS6-DM1 sobre tumores OVCAR5 intraperitoneales. Las células tumorales se inyectaron por vía intraperitoneal en el día 0, y los tratamientos con inmunoconjugados se dieron en los días 6 y 13. Los animales se sacrificaron por eutanasia una vez que la pérdida de peso corporal excedió del 20%.

[0059] La Figura 28 muestra la curva de unión por citometría de flujo a partir de un estudio de la afinidad de unión de anticuerpo DS6 desnudo y conjugado con taxano sobre células HeLa. La conjugación con taxano (MM1-202) no afecta de forma adversa a la afinidad de unión del anticuerpo. La Kd aparente del conjugado DS6-MM1-202 (1,24 nM) era ligeramente mayor que la del anticuerpo DS6 desnudo (620 pM).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0060] La presente invención proporciona, entre otras características, anticuerpos humanizados anti-CA6 y fragmentos de unión a epítipo de los mismos de acuerdo con la reivindicación 1. Cada uno de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente invención están diseñados para reconocer específicamente y unirse al glucótopo CA6 sobre la superficie de una célula. Se sabe que CA6 se expresa en muchos tumores humanos: el 95% de los carcinomas serosos de ovario, el 50% de los carcinomas endometrioides de ovario, el 50% de los neoplasmas del cuello del útero, el 69% de los neoplasmas del endometrio, el 80% de los neoplasmas de la vulva, el 60% de los carcinomas de mama, el 67% de los tumores pancreáticos, y el 48% de los tumores del urotelio, pero raramente se expresa en tejido humano normal.

[0061] Un informe de Kearse et al., *Int. J. Cancer* 88(6):866-872 (2000) identificaba mal la proteína en la que se haya el epítipo CA6 como una proteína de 80 kDa que tenía un carbohidrato N-unido que contiene el epítipo CA6 cuando usaban un sobrenadante de hibridoma para caracterizarlo. Usando DS6 purificado se ha demostrado que el epítipo CA6 se encuentra en un carbohidrato O-unido de una glucoproteína no unida por disulfuro de más de 250 kDa. Además, la glucoproteína se identificó como la mucina, Muc1. Como diferentes alelos Muc1 tienen cantidades variables de repeticiones en tándem en el dominio de repetición en tándem de cantidad variable (VNTR) las células a menudo expresan dos proteínas Muc1 distintas de diferente tamaño (Taylor-Papadimitriou, *Biochim. Biophys. Acta* 1455(2-3):301-13 (1999). A causa de las diferencias en la cantidad de repeticiones en el dominio VNTR así como las diferencias en la glucosilación, el peso molecular de Muc1 varía de una línea celular a otra.

[0062] La susceptibilidad de inmunorreactividad CA6 a ácido peryódico indica que CA6 es un epítipo de carbohidrato "glucótopo". La susceptibilidad adicional de inmunorreactividad CA6 al tratamiento con neuraminidasa de *Vibrio cholerae* indica que el epítipo CA6 es un glucótopo dependiente de ácido siálico, por tanto un "sialoglucótopo".

[0063] Pueden encontrarse detalles de la caracterización de CA6 en el Ejemplo 2 (véase a continuación). Pueden encontrarse detalles adicionales sobre CA6 en el documento WO 02/16401; Wennerberg et al., *Am. J. Pathol.* 143(4):1050-1054 (1993); Smith et al., *Human Anti-bodies* 9:61-65 (1999); Kearse et al., *Int. J. Cancer* 88(6):866-872 (2000); Smith et al., *Int. J. Gynecol. Pathol.* 20(3): 260-6 (2001); y Smith et al., *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 10(2):152-8 (2002).

[0064] La presente invención también incluye conjugados citotóxicos que comprenden dos componentes principales. El primer componente es un agente de unión celular de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 que reconoce y se une al glucótopo CA6. El agente de unión celular debe reconocer el sialoglucótopo CA6 en Muc1 con

un alto grado de especificidad de modo que los conjugados citotóxicos reconozcan y se unan solamente a las células pretendidas. Un elevado grado de especificidad permitirá que los conjugados actúen de un modo dirigido con pocos efectos secundarios resultantes de unión no específica.

- 5 **[0065]** En otra realización, el agente de unión celular de la presente invención también reconoce el glucótopo CA6 con un elevado grado de afinidad de modo que los conjugados estarán en contacto con la célula diana durante un periodo suficiente de tiempo para permitir que la parte de fármaco citotóxica del conjugado actúe sobre la célula, y/o para permitir a los conjugados tiempo suficiente para que se internalicen por la célula.
- 10 **[0066]** Los conjugados citotóxicos de esta invención comprenden un anticuerpo DS6 humanizado o un fragmento de unión a epítipo del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1-3. El anticuerpo DS6 es capaz de reconocer CA6 con un elevado grado de especificidad y dirige el agente citotóxico a una célula anormal o a un tejido tal como células cancerosas, de un modo dirigido.
- 15 **[0067]** El segundo componente de los conjugados citotóxicos de la presente invención es un agente citotóxico. En realizaciones preferidas, el agente citotóxico es un taxol, un maitansinoide tal como DM1 o DM4, CC-1065 o un análogo de CC-1065. En realizaciones preferidas, los agentes de unión celular de la presente invención están unidos covalentemente, de forma directa o mediante un enlazador escindible o no escindible, al agente citotóxico.
- 20 **[0068]** Los agentes de unión celular, los agentes citotóxicos, y los enlazadores se analizan a continuación con más detalle.

Agentes de unión celular

- 25 **[0069]** La eficacia de los compuestos de la presente invención como agentes terapéuticos depende de la cuidadosa selección de un agente de unión celular apropiado. Los agentes de unión celular incluyen péptidos y no péptidos. Los agentes de unión celular pueden ser cualquier compuesto que pueda unirse a una célula, ya sea de un modo específico o no específico. Generalmente, éstos pueden ser anticuerpos (especialmente anticuerpos monoclonales), linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas de transporte de nutrientes (tales como transferrina), o cualquier otra molécula o sustancia de unión celular.
- 30 **[0070]** Ejemplos más específicos de agentes de unión celular incluyen:
- (a) anticuerpos policlonales;
- 35 (b) anticuerpos monoclonales;
- (c) fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', y F(ab')₂, Fv (Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983); Spring et al. J. Immunol. 113:470-478 (1974); Nisonoff et al. Arch. Biochem. Biophys. 89:230-244 (1960));
- (d) interferonas (por ejemplo, .alfa., .beta., .gamma.);
- 40 (e) linfoquinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;
- (f) hormonas tales como la insulina, TRH (hormona liberadora de tirotrópina), MSH (hormona estimuladora de melanocitos), hormonas esteroides, tales como andrógenos y estrógenos;
- (g) factores de crecimiento y factores estimuladores de colonias tales como EGF, TGF-alfa, FGF, VEGF, G-CSF, M-CSF y GM-CSF (Burgess, Immunology Today 5:155-158 (1984));
- 45 (h) transferrina (O'Keefe et al. J. Biol. Chem. 260:932-937 (1985)); y
- (i) vitaminas, tales como folato.

Anticuerpos

- 50 **[0071]** Las técnicas de anticuerpos monoclonales permiten la producción de agentes de unión celular extremadamente específicos en forma de anticuerpos monoclonales específicos. Son particularmente bien conocidas en las técnicas para crear anticuerpos monoclonales producidos por inmunización de ratones, ratas, hámsteres, o cualquier otro mamífero con el antígeno de interés tales como los antígenos de las células diana intactos de la célula diana, el virus completo, virus completo atenuado, y proteínas virales tales como proteínas de envuelta viral. También pueden usarse células humanas sensibilizadas. Otro método para crear anticuerpos monoclonales es el uso de bibliotecas de fagos de scFv (región variable de cadena sencilla), específicamente scFv de humano (véase, por ejemplo, Griffiths et al., patentes de Estados Unidos N° 5.885.793 y 5.969.108; McCafferty et al., documento WO 92/01047; Liming et al., documento WO 99/06587).
- 55 **[0072]** Un anticuerpo típico está compuesto por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas que están unidas por puentes disulfuro. La región variable es una parte de las cadenas pesadas del anticuerpo y las cadenas ligeras que difieren en la secuencia entre anticuerpos y que coopera en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno. La variabilidad habitualmente no está distribuida uniformemente en todas las regiones variables del anticuerpo. Está típicamente concentrada en tres segmentos de una región variable llamados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables, en las regiones variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de las regiones variables se llaman regiones flanqueantes. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera comprenden cuatro regiones flanqueantes, que adoptan en gran medida una configuración de lámina-beta, con cada región flanqueante conectada por las tres CDR, que forman bucles que conectan la estructura de lámina-beta, y en algunos casos que forman parte de la estructura de lámina-beta. Las CDR en cada cadena se mantiene en estrecha proximidad por las regiones flanqueantes y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (E. A. (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, 1991, NIH).
- 60 **[0073]** La región constante es una parte de la cadena pesada. Aunque no está implicada directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, muestra diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.
- 65 **[0073]** La región constante es una parte de la cadena pesada. Aunque no está implicada directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, muestra diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.
- 70 **[0073]** La región constante es una parte de la cadena pesada. Aunque no está implicada directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, muestra diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.
- 75 **[0073]** La región constante es una parte de la cadena pesada. Aunque no está implicada directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, muestra diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

[0074] El anticuerpo monoclonal DS6 murino se describe en la patente de Estados Unidos N° 6.596.503 (número de depósito en la ATCC PTA-4449).

5 Anticuerpos DS6 humanizados o revestidos

[0075] Un anticuerpo anti-CA6 humanizado se usa como agente de unión celular de la presente invención. Las realizaciones preferidas de dichos anticuerpos humanizados son las proporcionadas por las reivindicaciones 1-3 (anticuerpo DS6 humanizado, o un fragmento de unión a epítipo del mismo).

10 **[0076]** El objetivo de la humanización es una reducción en la inmunogenicidad de un anticuerpo xenogénico, tal como un anticuerpo murino, para la introducción en un ser humano, manteniendo al mismo tiempo la afinidad de unión a antígeno completa y la especificidad del anticuerpo.

15 **[0077]** Los anticuerpos humanizados pueden producirse usando varias tecnologías tales como el revestimiento y el injerto de CDR. Como se usa en este documento, la tecnología de revestimiento usa una combinación de modelado molecular, análisis estadístico y mutagénesis para alterar las superficies no CDR de las regiones variables del anticuerpo para que se parezcan a las superficies de anticuerpos conocidos del hospedador diana.

20 **[0078]** Las estrategias y métodos para revestir los anticuerpos, y otros métodos para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos en un hospedador diferente, se describen en la patente de Estados Unidos 5.639.641 (Pedersen et al.).

25 En resumen, en un método preferido, (1) se generan alineaciones de las posiciones de una combinación de regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo para dar una serie de posiciones expuestas en la superficie flanqueantes de la región variable de cadena pesada y ligera donde las posiciones de alineación para todas las regiones variables son al menos aproximadamente un 98% idénticas; (2) se define una serie de restos aminoacídicos expuestos en superficie flanqueantes de la región variable de cadena pesada y ligera para un anticuerpo de roedor (o fragmento del mismo); (3) se identifica una serie de restos aminoacídicos expuestos en superficie flanqueantes de la región variable de cadena pesada y ligera que es la más idéntica a la serie de restos aminoacídicos expuestos en superficie del roedor; (4) se sustituye la serie de restos aminoacídicos expuestos en superficie flanqueantes de la región variable de la cadena pesada y ligera definida en la etapa (2) con la serie de restos aminoacídicos expuestos en superficie flanqueantes de la región variable de cadena pesada y ligera identificada en la etapa (3), excepto para aquellos restos aminoacídicos que están a 5 Å de cualquier átomo de cualquier resto de las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo de roedor; y (5) se produce el anticuerpo de roedor humanizado que tiene especificidad de unión.

35 **[0079]** Los anticuerpos pueden humanizarse usando una diversidad de otras técnicas incluyendo injerto de CDR (documento EP 0 239 400; documento WO 91/09967; patentes de Estados Unidos N° 5.530.101; y 5.585.089), recubrimiento o revestimiento (documento EP 0 592 106; documento EP 0 519 596; Padlan E. A., 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka G. M. et al., 1994, Protein Engineering 7(6):805-814; Roguska M.A. et al., 1994, PNAS 91:969-973), y arrastre de cadena (patente de Estados Unidos N° 5.565.332). Los anticuerpos humanos pueden prepararse por una diversidad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de presentación en fagos. Véanse también las patentes de Estados Unidos N° 4.444.887, 4.716.111, 5.545.806, y 5.814.318; y las publicaciones de solicitud de patente internacional N° WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741.

40 **[0080]** La presente invención proporciona anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que reconocen un nuevo sialoglucótopo (el glucótopo CA6) en la mucina Muc1. En otra realización, los anticuerpos humanizados o fragmentos de unión a epítipo de los mismos tienen la capacidad adicional de inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glucótopo CA6.

50 **[0081]** La invención proporciona versiones revestidas o humanizadas del anticuerpo DS6 de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 donde los restos expuestos en superficie del anticuerpo o sus fragmentos están reemplazados tanto en la cadena ligera como en la cadena pesada para que se parezcan más a las superficies de anticuerpo humano conocidas. Los anticuerpos DS6 humanizados o fragmentos de unión a epítipo de los mismos de la presente invención tienen propiedades mejoradas. Por ejemplo, los anticuerpos DS6 humanizados o fragmentos de unión a epítipo de los mismos reconocen específicamente un nuevo sialoglucótopo (en glucótopo CA6) en la mucina Muc1. Más preferiblemente, los anticuerpos DS6 humanizados o fragmentos de unión a epítipo de los mismos tienen la capacidad adicional de inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glucótopo CA6. El anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a epítipo del mismo puede conjugarse con un fármaco, tal como un maitansinoide, para formar un profármaco que tenga citotoxicidad específica hacia las células que expresan el antígeno dirigiendo el fármaco al nuevo sialoglucótopo de Muc1, CA6. Los conjugados citotóxicos que comprenden dichos anticuerpos y un fármaco pequeño, altamente tóxico (por ejemplo, maitansinoides, taxanos, y análogos de CC-1065) pueden usarse como medicamentos o para tratar tumores, tales como tumores de mama y ovario.

65 **[0082]** Las versiones humanizadas del anticuerpo DS6 también están completamente caracterizadas en este documento con respecto a sus secuencias respectivas de aminoácidos de las regiones variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada, las secuencias de ADN de los genes para las regiones variables de cadena ligera y pesada, la identificación de las CDR, la identificación de sus aminoácidos de superficie, y la descripción de un medio para su expresión en forma recombinante.

70 **[0083]** En una realización, se proporciona el anticuerpo humanizado o fragmento de unión a epítipo del mismo de la presente invención que tiene una cadena pesada que incluye las CDR que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEC ID N°: 1, 21 y 3

75 S Y N M H (SEC ID N°: 1)
Y I Y P G N G A T N (SEC ID N°: 21)

G D S V P F A Y (SEC ID N°: 3)

[0084] Cuando se determinan las CDR de cadena pesada por el software de modelado AbM se representan por las SEC ID N°: 20-22:

G Y T F T S Y N M H (SEC ID N°: 20)
Y I Y P G N G A T N (SEC ID N°: 21)
G D S V P F A Y (SEC ID N°: 22)

[0085] En la misma realización, el anticuerpo humanizado o fragmento de unión epítipo del mismo tiene una cadena ligera que comprende las CDR que tienen secuencias de aminoácidos representadas por las SEC ID N°: 4-6:

S A H S S V S F M H (SEC ID N°: 4)
S T S S L A S (SEC ID N°: 5)
Q Q R S S F P L T (SEC ID N°: 6)

[0086] Los anticuerpos humanizados y fragmentos de unión a epítipo de los mismos también tienen una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comparte una identidad de secuencia de al menos el 98% con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 8:

EIVLTQSPATMSASPGERVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLIYS
TSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG
AGTKLELKR. (SEC ID N°: 8)

[0087] Los anticuerpos humanizados y fragmentos de unión a epítipo de los mismos tienen una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comparte una identidad de secuencia de al menos el 98% con una secuencia de aminoácido representada por la SEC ID N°: 10 ó la SEC ID N°: 11:

QAQLQVSGAEVVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGQGLE
WIGYIYPNGATNYNQKFQGKATLTADTSSSTAYMQISLTSSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGLTVTSA. (SEC ID N°: 10)
QAQLQVSGAEVVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGQGLE
WIGYIYPNGATNYNQKFQGKATLTADPSSSTAYMQISLTSSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGLTVTSA. (SEC ID N°: 11)

[0088] En otra realización, se proporcionan anticuerpos humanizados y fragmentos de unión a epítipo de los mismos que tienen una región variable de cadena ligera humanizada o revestida que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEC ID N°: 8

EIVLTQSPATMSASPGERVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLIYS
TSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG
AGTKLELKR. (SEC ID N°: 8)

[0089] Así mismo, se proporcionan anticuerpos humanizados o fragmentos de unión a epítipo de los mismos que tienen una región variable de cadena pesada humanizada o revestida que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEC ID N°:10 ó SEC ID N°: 11:

QAQLQVSGAEVVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGQGLE
WIGYIYPNGATNYNQKFQGKATLTADTSSSTAYMQISLTSSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGLTVTSA. (SEC ID N°: 10)
QAQLQVSGAEVVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGQGLE
WIGYIYPNGATNYNQKFQGKATLTADPSSSTAYMQISLTSSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGLTVTSA. (SEC ID N°: 11)

[0090] Los anticuerpos humanizados y fragmentos de unión a epítipo de los mismos de la presente invención también pueden incluir versiones de regiones variables de cadena ligera y/o pesada en las que los restos aminoacídicos superficiales humanos en proximidad a las CDR están reemplazados por los restos superficiales de muDS6 correspondientes en una o más posiciones definidas por los restos de la Tabla 1 (numeración de Kabat) marcados con un asterisco para retener la afinidad de unión y la especificidad de muDS6.

Tabla 1

Restos flanqueantes de muDS6 próximos a una CDR (numeración de Kabat)	
Cadena ligera	Cadena pesada
Q1*	Q1
V3	K64*
T5	P73*
P40	S74
G57	
A60	
S67	
E81	

[0091] En este documento se describen las secuencias de aminoácidos primaria y de ADN de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo DS6, y de versiones humanizadas del mismo.

Preferiblemente, los anticuerpos y fragmentos proporcionados por esta invención que se unen específicamente a CA6 también antagonizan la actividad biológica del receptor. Más preferiblemente, dichos anticuerpos adicionalmente están sustancialmente desprovistos de actividad agonista. Por tanto, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la presente invención pueden diferir del anticuerpo DS6 o los derivados humanizados del mismo, en las secuencias de aminoácidos de su estructura, las CDR, y/o la cadena ligera y cadena pesada, y aún estar dentro del alcance de la presente invención.

[0092] Las CDR del anticuerpo DS6 se identifican por modelado y se han predicho sus estructuras moleculares.

[0093] El gen de la línea germinal IgV γ ap4 de cadena ligera de ratón y el gen de la línea germinal IgVh J558.41 de cadena pesada a partir de los cuales probablemente se obtuvo DS6 se muestran en la Figura 11 alineados con la secuencia del anticuerpo DS6. La comparación identifica mutaciones somáticas probables en el anticuerpo DS6, incluyendo varias en las CDR.

[0094] La secuencia de la región variable de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo DS6, y las secuencias de las CDR del anticuerpo DS6 no se conocían previamente y se muestran en las Figuras 9A y 9B. Dicha información puede usarse para producir versiones humanizadas del anticuerpo DS6.

Fragmentos de anticuerpo

[0095] Los anticuerpos de la presente invención incluyen tanto los anticuerpos de longitud completa analizados anteriormente, como los fragmentos a unión a epítipo. Como se usa en este documento, "fragmentos de anticuerpo" incluye cualquier parte de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse al epítipo reconocido por el anticuerpo de longitud completa, generalmente llamados "fragmentos de unión a epítipo". Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, aunque sin limitación, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv con puente disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden una región V_L o V_H. Los fragmentos de unión a epítipo, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender la región o regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una parte de los siguientes: región bisagra, dominios C_{H1}, C_{H2}, y C_{H3}.

[0096] Dichos fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab o el fragmento F(ab')₂. Preferiblemente, los fragmentos de anticuerpo contienen las seis CDR del anticuerpo completo, aunque también son funcionales fragmentos que contienen no todas estas regiones, tales como tres, cuatro o cinco CDR. Además, los fragmentos pueden ser o pueden combinarse con miembros de una cualquiera de las siguientes clases de inmunoglobulina: IgG, IgM, IgA, IgD, o IgE, y las subclases de las mismas.

[0097] Los fragmentos Fab y F(ab')₂ pueden producirse por escisión proteolítica, usando enzimas tales como papaina (fragmentos Fab) o pepsina (fragmentos F(ab')₂).

[0098] Los fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) son fragmentos de unión a epítipo que contienen al menos un fragmento de una región variable de cadena pesada de anticuerpo (V_H) unido a al menos un fragmento de una región variable de cadena ligera de anticuerpo (V_L). El enlazador puede ser un péptido corto, flexible seleccionado para asegurar que exista el plegamiento tridimensional apropiado de las regiones (V_L) y (V_H) una vez se han unido para mantener la especificidad de unión a la molécula diana del anticuerpo completo del que se obtiene el fragmento de anticuerpo de cadena sencilla. El extremo carboxilo de la secuencia (V_L) o (V_H) puede estar unido covalentemente por un enlazador al aminoácido terminal de una secuencia (V_L) o (V_H) complementaria.

[0099] Los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla de la presente invención contienen secuencias de aminoácidos que tienen las regiones variables o determinantes de complementariedad (CDR) de los anticuerpos completos descritos en esta memoria descriptiva, pero que carecen de algunos o todos los dominios constantes de esos anticuerpos. Estos dominios constantes no son necesarios para la unión al antígeno, pero constituyen una parte principal de la estructura de los anticuerpos completos. Los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla, por lo tanto, pueden superar algunos de los problemas asociados con el uso de anticuerpos que contienen una parte o todo un dominio constante. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla tienden a estar libres de interacciones indeseadas entre moléculas biológicas y la región constante de cadena pesada, u otra actividad biológica no deseada. Adicionalmente, los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla son considerablemente más pequeños que los anticuerpos completos y por lo tanto pueden tener mayor permeabilidad capilar que los anticuerpos completos, permitiendo que los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla se localicen y se unan a sitios de unión a antígeno diana de forma más eficaz. Además, los fragmentos de anticuerpo pueden producirse a una escala relativamente grande en células procariotas, facilitando de este modo su producción. Adicionalmente, el tamaño relativamente pequeño de los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla los hace ser menos probables a provocar una respuesta inmune en un receptor que los anticuerpos completos.

[00100] Los fragmentos de unión a anticuerpo de cadena sencilla pueden generarse por clonación molecular, biblioteca de presentación en fagos de anticuerpo o técnicas similares bien conocidas para los especialistas en la técnica. Estas proteínas pueden producirse, por ejemplo, en células eucariotas o células procariotas, incluyendo bacterias. Los fragmentos de unión a epítipo de la presente invención también pueden generarse usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, los dominios del anticuerpo funcional se presentan en la superficie de partículas fágicas que portan las secuencias polinucleotídicas que los codifican. En particular, dicho fago puede utilizarse para presentar dominios de unión a epítipo expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). El fago expresa un dominio de unión a epítipo que se une al antígeno de interés puede seleccionarse o identificarse con el antígeno, por ejemplo, usando un antígeno marcado unido o capturado en una superficie sólida o perla. El fago usado en estos métodos es típicamente un fago filamentoso que incluye los dominios de unión fd y M13 expresados a partir del fago con Fab, Fv o dominios de anticuerpos Fv estabilizados con puente disulfuro fusionados de forma recombinante con la proteína del gen III o gen VIII del fago.

[00101] Los ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para preparar los fragmentos de unión a epítipo de la presente invención incluyen los descritos en Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic et al., 1997, Gene 187:9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology 57:191-280; publicación PCT WO 92/014047; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes de Estados Unidos N° 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

[00102] Después de la selección del fago, las regiones del fago que codifican los fragmentos pueden aislarse y usarse para generar los fragmentos de unión a epítipo a través de la expresión en un hospedador seleccionado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias, usando tecnología de ADN recombinante, por ejemplo, como se describe a continuación en detalle. Por ejemplo, también pueden emplearse técnicas para producir de forma recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ usando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, BioTechniques 12(6):864-869; Sawai et al., 1995, AJRI 34:26-34; y Better et al., 1988, Science 240:1041-1043. Los ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir Fv de cadena sencilla y anticuerpos incluyen las descritas en las patentes de Estados Unidos N° 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., 1991, Methods in Enzymology 203:46-88; Shu et al., 1993, PNAS 90: 7995-7999; Skerra et al., 1988, Science 240:1038-1040.

Equivalentes funcionales

[00103] La expresión "equivalentes funcionales" incluye anticuerpos con secuencias homólogas, anticuerpos quiméricos, anticuerpos artificiales y anticuerpos modificados, por ejemplo, donde cada equivalente funcional está definido por su capacidad de unirse a CA6. Los especialistas en la técnica entenderán que existe un solapamiento en el grupo de moléculas llamadas "fragmentos de anticuerpos" y el grupo llamado "equivalentes funcionales". Los métodos para producir equivalentes funcionales se describen, por ejemplo, en la solicitud PCT WO 93/21319, la solicitud de patente Europea N° 239.400; la solicitud PCT WO 89/09622; la solicitud de patente Europea N° 338.745; y la solicitud de patente Europea EP 332.424.

[00104] Los anticuerpos con secuencias homólogas son aquellos anticuerpos con secuencias de aminoácidos que tienen homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-CA6 y un anticuerpo anti-CA6 humanizado de la presente invención. Preferiblemente, la homología es con la secuencia de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo anti-CA6 y el anticuerpo anti-CA6 humanizado de la presente invención. "Homología de secuencia" que se aplica a una secuencia de aminoácidos en este documento se define como una secuencia con una homología de secuencia de al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, ó 94%, y más preferiblemente una homología de secuencia de al menos aproximadamente el 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% con otra secuencia de aminoácidos, determinada, por ejemplo, por el método de búsqueda FASTA de acuerdo con Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85.2444-2448 (1988).

[00105] Como se usa en este documento, un anticuerpo quimérico es uno en el que diferentes partes de un anticuerpo se obtienen de diferentes especies animales. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una región variable obtenida de un anticuerpo monoclonal murino apareada con una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; patentes de Estados Unidos N° 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.

[00106] Las formas humanizadas de anticuerpos quiméricos se preparan sustituyendo las regiones determinantes de complementariedad de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, en un dominio flanqueante humano, por ejemplo, véase la publicación PCT N° W092/22653. Los anticuerpos quiméricos humanizados preferiblemente tienen regiones constantes y regiones variables diferentes de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) obtenidas sustancial o exclusivamente de las regiones de anticuerpo humano correspondientes y las CDR obtenidas sustancial o exclusivamente de un mamífero diferente a un ser humano.

[00107] Los anticuerpos artificiales incluyen fragmentos scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y mru (véanse las revisiones de Winter, G. y Milstein, C., 1991, Nature 349:293-299; Hudson, P.J., 1999, Current Opinion in Immunology 11: 548-557), cada uno de los cuales tiene capacidad de unión a antígeno. En el fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), los dominios VH y VL de un anticuerpo se unen por un péptido flexible. Típicamente, este péptido enlazador es de aproximadamente 15 restos aminoácidos de longitud. Si el enlazador es mucho más pequeño, por ejemplo de 5 aminoácidos, se forman diacuerpos, que son dímeros scFv bivalentes. Si el enlazador se reduce a menos de 3 restos aminoácidos, se forman estructuras triméricas y tetraméricas que se llaman

triacuerpos y tetracuerpos. La unidad de unión más pequeña de un anticuerpo es una CDR, típicamente la CDR2 de la cadena pesada que tiene suficiente reconocimiento específico y unión que puede usarse por separado. Dicho fragmento se llama unidad de reconocimiento molecular o mru. Pueden unirse varias de dichas mru junto con cortos péptidos enlazadores, formando por lo tanto una proteína de unión artificial con mayor avidez que un único mru.

[00108] Los equivalentes funcionales de la presente solicitud también incluyen anticuerpos modificados, por ejemplo, anticuerpos modificados por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos modificados incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. La unión covalente no evita que el anticuerpo genere una respuesta anti-idiotípica. Estas modificaciones pueden realizarse por técnicas conocidas incluyendo, aunque sin limitación, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, los anticuerpos modificados pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

[00109] Los equivalentes funcionales pueden producirse intercambiando diferentes CDR sobre diferentes cadenas en diferentes regiones flanqueantes. Por tanto, por ejemplo, son posibles diferentes clases de anticuerpo para una serie dada de CDR por sustitución de diferentes cadenas pesadas, por lo cual pueden producirse, por ejemplo, tipos e isotipos de anticuerpos IgG1-4, IgM, IgA1-2, IgD, IgE. Así mismo, pueden producirse anticuerpos artificiales dentro del alcance de la invención incluyendo una serie dada de CDR en una región flanqueante completamente sintética.

[00110] Los equivalentes funcionales pueden producirse fácilmente por mutación, delección y/o inserción en las secuencias de región variable y/o constante que flanquean una serie particular de CDR, usando una amplia diversidad de métodos conocidos en la técnica.

[00111] Los fragmentos de anticuerpo y equivalentes funcionales de la presente invención abarcan aquellas moléculas con un grado detectable de unión a CA6, en comparación con el anticuerpo DS6. Un grado detectable de unión incluye todos los valores en el intervalo de al menos el 10-100%, preferiblemente de al menos el 50%, 60%, ó 70%, más preferiblemente de al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ó 99% de la capacidad de unión del anticuerpo DS6 murino a CA6.

Anticuerpos mejorados

[00112] Las CDR son de gran importancia para el reconocimiento de epítipo y la unión del anticuerpo. Sin embargo, pueden hacerse cambios de los restos que comprenden las CDR sin interferir con la capacidad del anticuerpo para reconocer y unirse a su epítipo afín. Por ejemplo, pueden hacerse cambios que no afectan al reconocimiento de epítipo, pero aumentan la afinidad de unión del anticuerpo por el epítipo.

[00113] Varios estudios han examinado los efectos de introducir uno o más cambios de aminoácidos en diversas posiciones de la secuencia de un anticuerpo, en base al conocimiento de la secuencia primaria del anticuerpo, sobre sus propiedades tales como la unión y el nivel de expresión (Yang, W. P. et al., 1995, J. Mol. Biol., 254, 392-403; Rader, C. et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 8910-8915; Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539).

[00114] En estos estudios, se han generado equivalentes del anticuerpo primario cambiando las secuencias de los genes de cadena pesada y ligera en la CDR1, CDR2, CDR3, o las regiones flanqueantes, usando métodos tales como mutagénesis dirigida al sitio mediada por oligonucleótido, mutagénesis de casete, PCR propensa a errores, arrastre de ADN, o cepas de mutación de E. Coli (Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539; Adey, N. B. et al., 1996, Chapter 16, pág. 277-291, en "Phage Display of Peptides and Proteins", Eds. Kay, B. K. et al., Academic Press). Estos métodos para cambiar la secuencia del anticuerpo primario han provocado afinidades mejoradas de los anticuerpos secundarios (Gram, H. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3576-3580; Boder, E. T. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 10701-10705; Davies, J. y Riechmann, L., 1996, Immunotechnology, 2, 169-179; Thompson, J. et al., 1996, J. Mol. Biol., 256, 77-88; Short, M. K. et al., 2002, J. Biol. Chem., 277, 16365-16370; Furukawa, K. et al., 2001, J. Biol. Chem., 276, 27622-27628).

[00115] Mediante una estrategia dirigida similar para cambiar uno o más restos de aminoácidos el anticuerpo, pueden usarse las secuencias de anticuerpo descritas en esta invención para desarrollar anticuerpos anti-CA6 con funciones mejoradas, incluyendo afinidad mejorada por CA6.

[00116] Los anticuerpos mejorados también incluyen aquellos anticuerpos que tienen características mejoradas que se preparan por las técnicas convencionales de inmunización animal, formación de hibridomas y selección de anticuerpos con características específicas.

Agentes citotóxicos

[00117] El agente citotóxico usado en el conjugado citotóxico de la presente invención puede ser cualquier compuesto que provoque la muerte de una célula, o induzca la muerte celular, o disminuya de algún modo la viabilidad celular. Los agentes citotóxicos preferidos incluyen, por ejemplo, maitansinoides y análogos de maitansinoides, taxoides, CC-1065 y análogos de CC-1065, dolastatina y análogos de dolastatina, definidos a continuación. Estos agentes citotóxicos se conjugan con los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, equivalentes funcionales, anticuerpos mejorados y sus análogos descritos en este documento.

[00118] Los conjugados citotóxicos pueden prepararse por métodos in vitro. Para unir un fármaco o profármaco al anticuerpo, se usa un grupo enlazador. Los grupos enlazadores adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen grupos de disulfuro, grupos tioéter, grupos inestables en ácido, grupos fotolabiles, grupos inestables en peptidasa y grupos inestables en esterasa. Los grupos enlazadores preferidos son grupos disulfuro y grupos tioéter.

Por ejemplo, pueden construirse conjugados usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter entre el anticuerpo y el fármaco o profármaco.

Maitansinoides

[00119] Entre los agentes citotóxicos que pueden usarse en la presente invención para formar un conjugado citotóxico, están los maitansinoides y los análogos de maitansinoides. Los ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Los maitansinoides son fármacos que inhiben la formación de microtúbulos y que son altamente tóxicos para las células de mamífero.

[00120] Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones. Dichos maitansinoides adecuados se describen en las patentes de Estados Unidos N° 4.424.219; 4.256.746; 4.294.757; 4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; y 5.846.545.

[00121] Los ejemplos de análogos adecuados de maitansinol que tienen un anillo aromático modificado incluyen:

[00122] (1) C-19-descloro (patente de Estados Unidos N° 4.256.746) (preparado por reducción con LAH de ansamitocina P2);

[00123] (2) C-20-hidroxi (o C-20-desmetilo) +/-C-19-descloro (patentes de Estados Unidos N° 4.361.650 y 4.307.016) (preparado por desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* o descloración usando LAH); y

[00124] (3) C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (patente de Estados Unidos N° 4.294.757) (preparado por acilación usando cloruros de acilo).

[00125] Los ejemplos de análogos adecuados de maitansinol que tienen modificaciones de otras posiciones incluyen:

[00126] (1) C-9-SH (patente de Estados Unidos N° 4.424.219) (preparado por la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅);

[00127] (2) C-14-alcoximetilo (desmetoxi/CH₂OR) (patente de Estados Unidos N° 4.331.598);

[00128] (3) C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH₂OH o CH₂OAc) (patente de Estados Unidos N° 4.450.254) (preparado a partir de *Nocardia*);

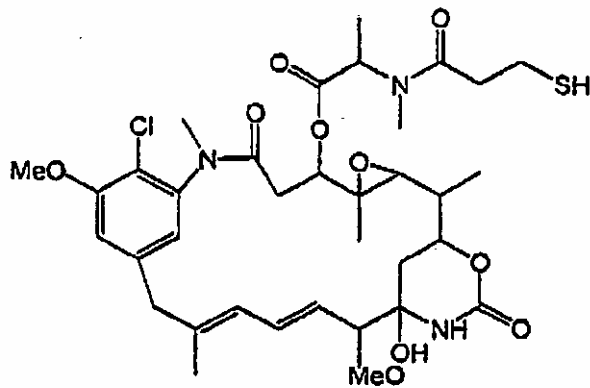
[00129] (4) C-15-hidroxi/aciloxi (patente de Estados Unidos N° 4.364.866) (preparado por la conversión de maitansinol por *Streptomyces*);

[00130] (5) C-15-metoxi (patentes de Estados Unidos N° 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de *Trewia nudiflora*);

[00131] (6) C-18-N-desmetilo (patentes de Estados Unidos N° 4.362.663 y 4.322.348) (preparado por la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y

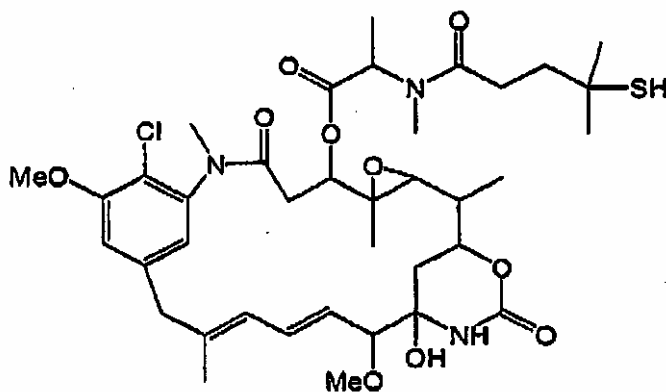
[00132] (7) 4,5-desoxi (patente de Estados Unidos N° 4.371.533) (preparado por la reducción con tricloruro de titanio/LAH del maitansinol).

[00133] En una realización preferida, los conjugados citotóxicos de la presente invención utilizan el maitansinoide que contiene tiol (DM1), formalmente llamado N²-desacetil- N²-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, como agente citotóxico. El DM1 está representado por la siguiente fórmula estructural (I):



(I)

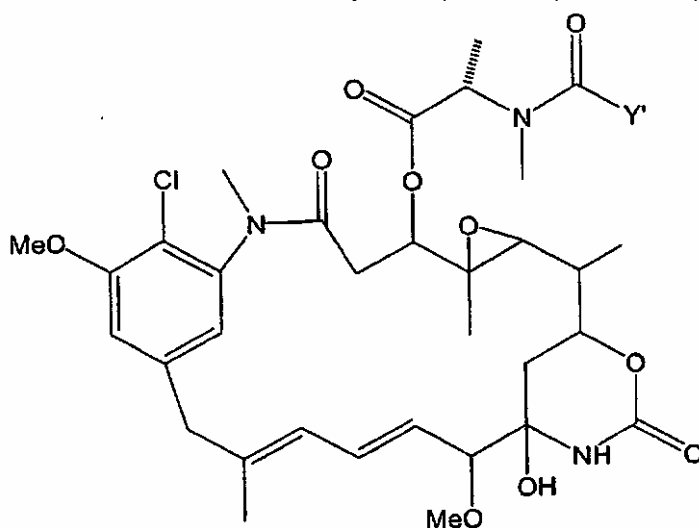
[00134] En otra realización preferida, los conjugados citotóxicos de la presente invención utilizan el maitansinoide que contiene tiol N²-desacetil-N²-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina como agente citotóxico. El DM4 está representado por la siguiente fórmula estructural (II):



(II)

[00135] En realizaciones adicionales de la invención, pueden usarse otras maitansinas, incluyendo maitansionides que contienen tiol y disulfuro que albergan una sustitución mono o di-alquilo en el átomo de carbono que alberga el átomo de azufre. Estos incluyen un maitansinoide que tiene, en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo, o C-20 desmetilo, una cadena lateral de aminoácido acilada con un grupo acilo que alberga un grupo sulfhidrilo impedido, donde el átomo de carbono del grupo acilo que alberga la funcionalidad tiol tiene uno o dos sustituyentes, siendo dichos sustituyentes CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y adicionalmente donde uno de los sustituyentes puede ser H, y donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

[00136] Dichas maitansinas adicionales incluyen compuestos representados por la fórmula (III):



(III)

15 en la que:

Y' representa $CR_7CR_8)(CR_9=CR_{10})_pC=C_qAr(CR_5CR_6)_mD_u(CR_{11}CR_{12})_r(C=C)_sB_t(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ$,
 donde:

18 R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser H;
 20 A, B, D son cicloalquilo o cicloalqueno que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

23 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁, y R₁₂ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;
 25 l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que la menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en cualquier momento dado; y

28 Z es H, SR o -COR, donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

[00137] Las realizaciones preferidas de fórmula (III) incluyen compuestos de fórmula (III) en la que:

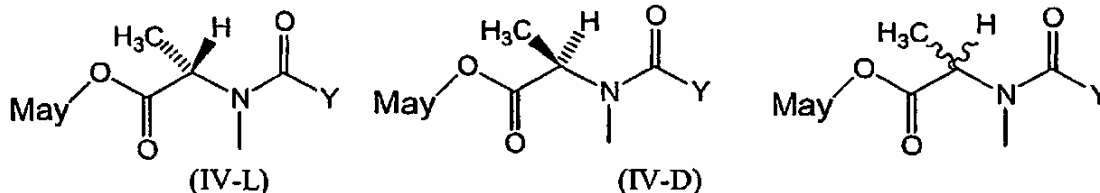
30 R₁ es H, R₂ es metilo y Z es H.

R₁ y R₂ son metilo y Z es H.

35 R₁ es H, R₂ es metilo, y Z es -SCH₃.

R₁ y R₂ son metilo, y Z es -SCH₃.

[00138] Dichas maitansinas adicionales también incluyen compuestos representados por la fórmula (IV-L), (IV-D), o (IV-D,L):



(IV-D,L)

5

en la que:

Y representa (CR₇CR₈)(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_nCR₁R₂SZ,

donde:

10

R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser H;

15

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0;

Z es H, SR o -COR donde R es alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo; y

20

May representa un maitansinoide que alberga la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo o C-20 desmetilo.

[00139] Las realizaciones preferidas de las fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D,L) incluyen compuestos de fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D,L) en las que:

25

R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es H.

R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es H.

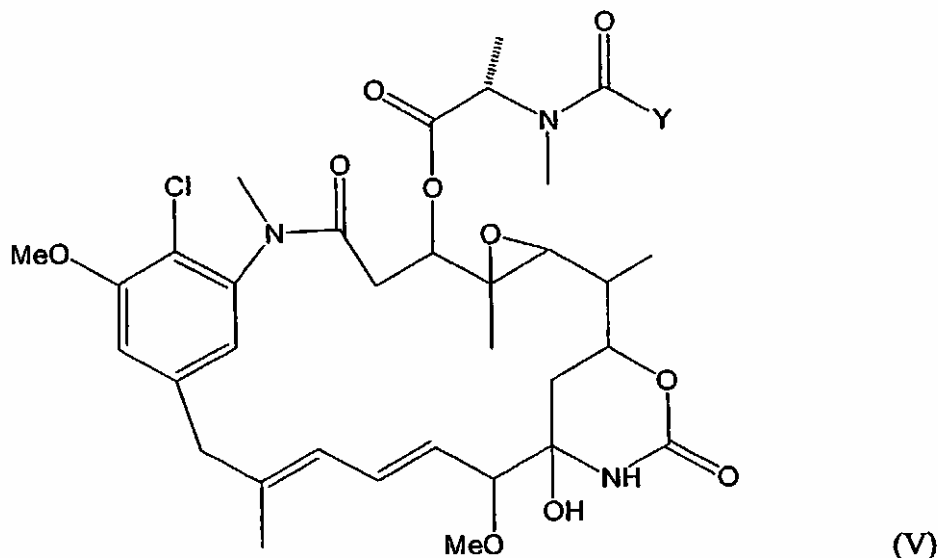
R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

30

[00140] Preferiblemente el agente citotóxico está representado por la fórmula (IV-L).

[00141] Dichas maitansinas adicionales también incluyen compuestos representados por la fórmula (V):



en la que:

35

Y representa (CR₇CR₈)(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_nCR₁R₂SZ,

donde:

R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo

sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H; R_3, R_4, R_5, R_6, R_7 y R_8 son cada uno independientemente H, CH_3, C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo; l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y Z es H, SR o -COR, donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

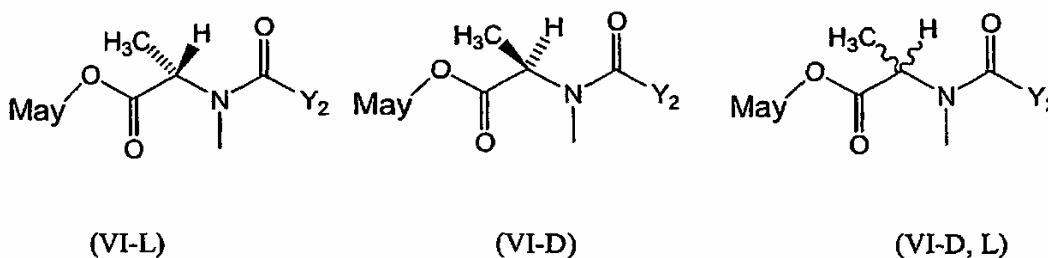
10 **[00142]** Las realizaciones preferidas de fórmula (V) incluyen compuestos de fórmula (V) en la que:

R_1 es H, R_2 es metilo, R_5, R_6, R_7 , y R_8 son cada uno H; l y m son cada uno 1; n es 0; y Z es H.

R_1 y R_2 son metilo; R_5, R_6, R_7, R_8 son cada uno H, l y m son 1; n es 0; y Z es H.

15 R_1 es H, R_2 es metilo, R_5, R_6, R_7 , y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es $-SCH_3$.
 R_1 y R_2 son metilo, R_5, R_6, R_7, R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es $-SCH_3$.

[00143] Dichas maitansinas adicionales incluyen adicionalmente compuestos representados por la fórmula (VI-L), (VI-D), o (VI-D,L):

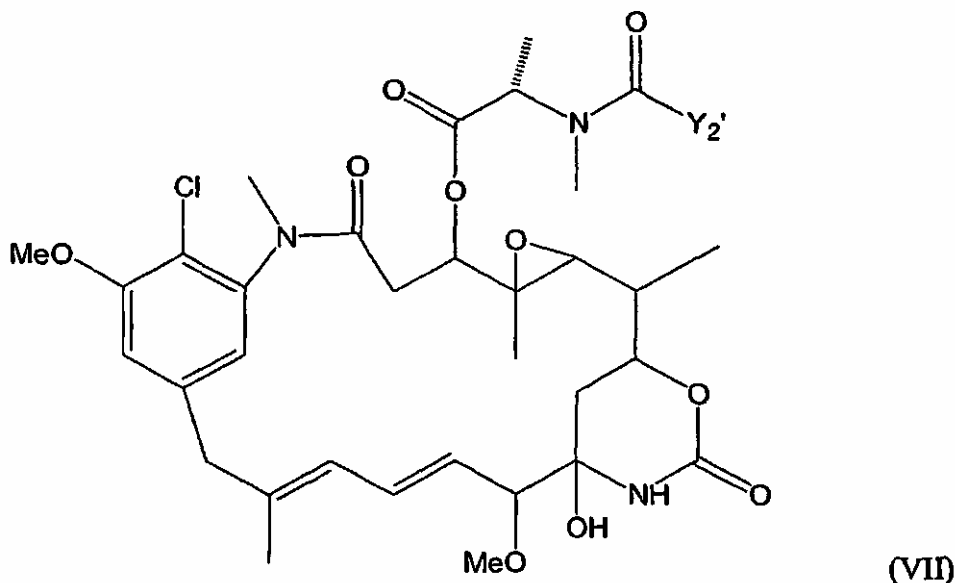


20 en la que:

donde: Y_2 representa $(CR_7CR_8)_l(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

25 R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3, C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;
 30 R_3, R_4, R_5, R_6, R_7 y R_8 son cada uno independientemente H, CH_3, C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;
 35 l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0;
 Z_2 es SR o COR, donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo; y
 May es un maitansinoide.

[00144] Dichas maitansinas adicionales también incluyen compuestos representados por la fórmula (VII):



40 en la que:

Y_2' representa $(CR_7CR_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C=C)_qA_r(CR_5CR_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C=C)_sB_t(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

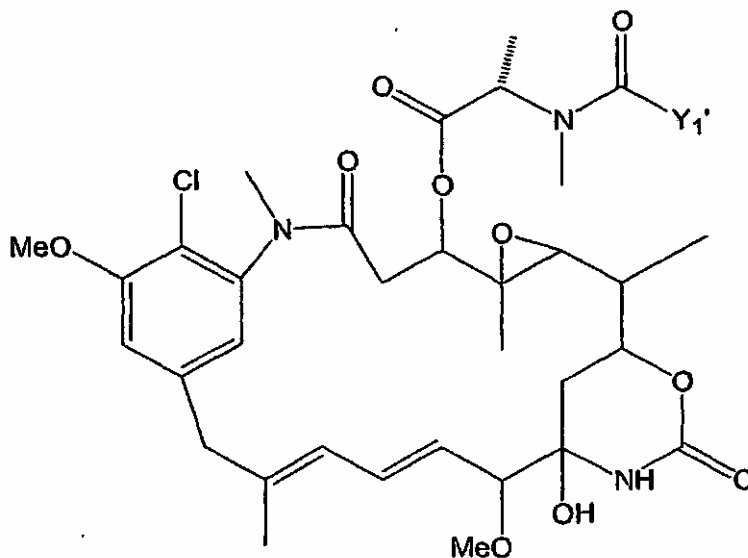
donde:

- 5 R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;
- 10 A, B, y D cada uno independientemente es cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;
- R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{11} , y R_{12} son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, arilo o alquenilo ramificado o lineal que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;
- 15 l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en cualquier momento dado; y
- Z_2 es SR o -COR, donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3 - 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

20 **[00145]** Las realizaciones preferidas de fórmula (VII) incluyen compuestos de fórmula (VII) en la que: R_1 es H y R_2 es metilo.

25 **[00146]** Los maitansinoides mencionados anteriormente pueden conjugarse con un anticuerpo anti-CA6 DS6, o un homólogo o fragmento del mismo, donde el anticuerpo es una al maitansinoide usando la funcionalidad tiol o disulfuro que está presente en el grupo acilo de una cadena lateral de aminoácido acilada encontrada en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo o C-20 desmetilo del maitansinoide, y donde el grupo acilo de la cadena lateral de aminoácido acilada tiene su funcionalidad tiol o disulfuro en un átomo de carbono que tiene uno o dos sustituyentes, siendo dichos sustituyentes CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además uno de los sustituyentes puede ser H, y donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

30 **[00147]** Un conjugado preferido de la presente invención es uno que comprende al anticuerpo anti-CA6 DS6, o un homólogo o fragmento del mismo, conjugado con un maitansinoide de fórmula (VIII):



(VIII)

35 en la que:

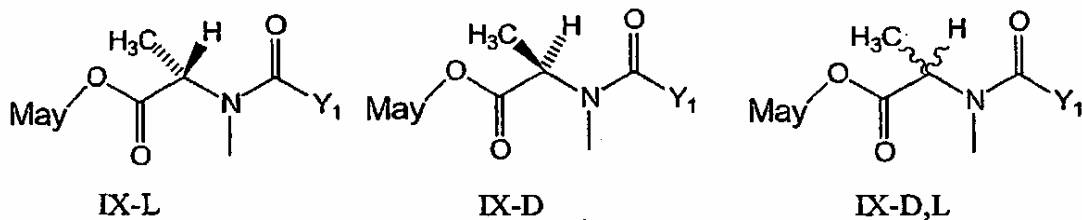
Y_1' representa $(CR_7CR_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C=C)_qA_r(CR_5CR_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C=C)_sB_t(CR_3CR_4)_nCR_1R_2S-$,

40 donde:

- A, B, y D, cada uno independientemente es cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;
- 45 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{11} , y R_{12} son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo; y
- l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en cualquier momento dado.

50 **[00148]** Preferiblemente, R_1 es H y R_2 es metilo o R_1 y R_2 son metilo.

[00149] Un conjugado incluso más preferido de la presente invención es uno que comprende el anticuerpo anti-CA6 DS6, o un homólogo o fragmento del mismo, conjugado con un maitansinoide de fórmula (IX-L), (IX-D), o (IX-D,L):



en la que:

5 Y, representa $(CR_7CR_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2S-$,

donde:

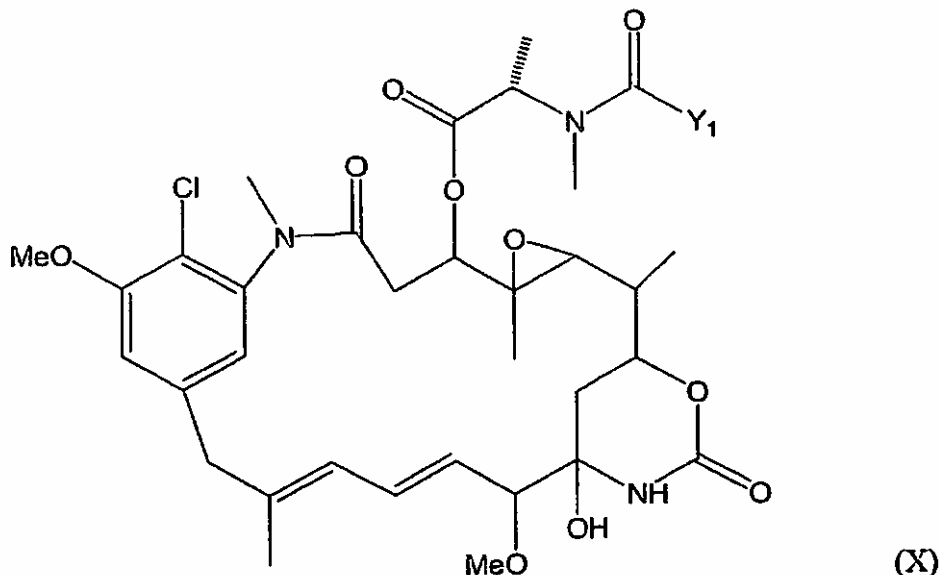
10 R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser H;
 15 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;
 15 1, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y
 May representa un maitansinol que alberga la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo o C-20 desmetilo.

20 **[00150]** Realizaciones preferidas de las fórmulas (IX-L), (IX-D) y (IX-D,L) incluyen compuestos de fórmulas (IX-L), (IX-D) y (IX-D,L) en las que:

20 R₁ es H y R₂ es metilo o R₁ y R₂ son metilo,
 R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H; l y m son cada uno 1; n es 0,
 R₁ y R₂ son metilo; R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H; l y m son 1; n es 0.

25 **[00151]** Preferiblemente, el agente citotóxico está representado por la fórmula (IX-L).

[00152] Un conjugado preferido adicional de la presente invención es uno que comprende el anticuerpo anti-CA6 DS6, o un homólogo o fragmento del mismo, conjugado con un maitansinoide de fórmula (X):



30 en la que los sustituyentes son como se han definido para la fórmula (IX) anterior.

[00153] Son especialmente preferidos cualquiera de los compuestos descritos anteriormente, donde R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0.

35 **[00154]** Además son especialmente preferidos cualquiera de los compuestos descritos anteriormente, donde R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

[00155] Además, se prefiere el estereoisómero L-aminoácido.

40 **[00156]** Cada uno de los maitansinoides mostrados en la publicación de patente de Estados Unidos en trámite número US 2004235840, también puede usarse en el conjugado citotóxico de la presente invención.

Grupos enlazadores que contienen disulfuro

5 [00157] Para enlazar el maitansinoide a un agente de unión celular, tal como el anticuerpo DS6, el maitansinoide comprende un resto enlazador. El resto enlazador contiene un enlace químico que permite la liberación de maitansinoides completamente activos en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen enlaces disulfuro, enlaces inestables en ácido, enlaces fotolábiles, enlaces inestables en peptidasa y enlaces inestables en esterasa. Se prefieren los enlaces disulfuro.

10 [00158] El resto enlazador también comprende un grupo químico reactivo. En una realización preferida, el grupo químico reactivo puede unirse covalentemente al maitansinoide mediante un resto enlazador de enlace disulfuro.

[00159] Los grupos químicos reactivos particularmente preferidos son ésteres de *N*-succinimidilo y ésteres de *N*-sulfosuccinimidilo.

15 [00160] Los maitansinoides particularmente preferidos que comprende un resto enlazador que contiene un grupo químico reactivo son ésteres C-3 de maitansinol y sus análogos donde el resto enlazador contiene un enlace disulfuro y el grupo reactivo químico comprende un éster de *N*-succinimidilo o *N*-sulfosuccinimidilo.

20 [00161] Muchas posiciones en los maitansinoides pueden servir como la posición para enlazar químicamente el resto enlazador. Por ejemplo, la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo se espera que todas sean útiles. Sin embargo, se prefiere la posición C-3 y la posición C-3 del maitansinol es especialmente preferida.

25 [00162] Aunque se describe la síntesis de ésteres de maitansinol que tienen un resto enlazador en términos de restos enlazadores que contienen un enlace disulfuro, un especialista en la técnica entenderá que también pueden usarse restos enlazadores con otros enlaces químicos (como se ha descrito anteriormente) con la presente invención, así como otros maitansinoides. Los ejemplos específicos de otros enlaces químicos incluyen enlaces inestables en ácido, enlaces fotolábiles, enlaces inestables en peptidasa y enlaces inestables en esterasa. La descripción de la patente de Estados Unidos N° 5.208.020, incorporada en este documento, muestra la producción de maitansinoides que albergan dichos enlaces.

30 [00163] La síntesis de maitansinoides y derivados de maitansinoides que tienen un resto disulfuro que alberga un grupo reactivo se describe en las patentes de Estados Unidos N° 6.441.163 y 6.333.410, y la publicación de Estados Unidos US 2003055226.

35 [00164] Los maitansinoides que contienen un grupo reactivo, tal como DM1, se hacen reaccionar con un anticuerpo, tal como el anticuerpo DS6, para producir conjugados citotóxicos. Estos conjugados pueden purificarse por HPLC o por filtración en gel.

40 [00165] Se proporcionan varios esquemas excelentes para producir dichos conjugados de anticuerpo-maitansinoide en la patente de Estados Unidos N° 6.333.410, y las solicitudes de Estados Unidos N°

45 [00166] US 6441163, US 2003055226, US 2004001838.

[00167] En general, puede incubarse una solución de un anticuerpo en tampón acuoso con un exceso molar de maitansinoides que tienen un resto disulfuro que alberga un grupo reactivo. La mezcla de reacción puede inactivarse por la adición de un exceso de amina (tal como etanolamina, taurina, etc.). El conjugado de maitansinoide-anticuerpo después puede purificarse por filtración en gel.

50 [00168] La cantidad de moléculas de maitansinoide unidas por molécula de anticuerpo puede determinarse midiendo espectrofotométricamente la proporción de la absorbancia a 252 nm y 280 nm. Se prefiere un promedio de 1-10 moléculas de maitansinoide/moléculas de anticuerpo.

55 [00169] Los conjugados de anticuerpos con fármacos maitansinoides pueden evaluarse para su capacidad de suprimir la proliferación de diversas líneas celulares indeseadas *in vitro*. Por ejemplo, pueden usarse fácilmente líneas celulares tales como la línea de carcinoma epidermoide humano A-431, la línea celular de cáncer pulmonar microcítico humano SW2, la línea de tumor de mama humano SKBR3 y la línea de linfoma de Burkitt Namalwa para la evaluación de la citotoxicidad de estos compuestos. Las células a evaluar pueden exponerse a los compuestos durante 24 horas y medirse las fracciones supervivientes de las células en ensayos directos por métodos conocidos. Después pueden calcularse los valores de IC₅₀ a partir de los resultados de los ensayos.

Grupos enlazadores que contienen PEG

65 [00170] Los maitansinoides también pueden enlazarse a agentes de unión celular usando grupos enlazadores de PEG, como se expone en la publicación de Estados Unidos US 2004001838. Estos grupos enlazadores de PEG son solubles tanto en agua como en disolventes no acuosos, y pueden usarse para unir uno o más agentes citotóxicos a un agente de unión celular. Los grupos enlazadores de PEG ejemplares incluyen enlazadores de PEG hetero-bifuncionales que se unen a agentes citotóxicos y a agentes de unión celular en extremos opuestos de los enlazadores a través de un grupo sulfhidrilo o disulfuro funcional en un extremo, y un éster activo en el otro extremo.

70 [00171] Como ejemplo general de la síntesis de un conjugado citotóxico usando un grupo enlazador de PEG, se hace de nuevo referencia a la publicación de Estados Unidos US 2004001838 N° 10/024.290 para detalles específicos. La síntesis comienza con la reacción de uno o más agentes citotóxicos que albergan un resto PEG reactivo con un agente de unión celular, provocando el desplazamiento del éster activo terminal de cada resto de PEG reactivo por un resto aminoacídico del agente de unión celular, para producir un conjugado citotóxico que

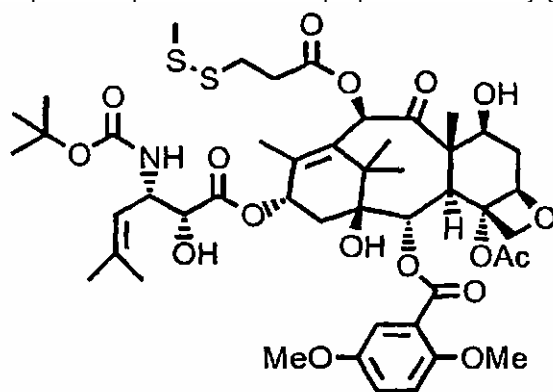
comprende uno o más agentes citotóxicos unidos covalentemente a un agente de unión celular a través de un grupo enlazador de PEG.

Taxanos

[00172] El agente citotóxico usado en los conjugados citotóxicos de acuerdo con la presente invención también puede ser un taxano o derivado del mismo.

[00173] Los taxanos son una familia de compuestos que incluye paclitaxel (Taxol), un producto natural citotóxico, y docetaxel (Taxotere), un derivado semi-sintético, dos compuestos que se usan ampliamente en el tratamiento del cáncer. Los taxanos son toxinas del huso mitótico que inhiben la despolimerización de la tubulina, provocando la muerte celular. Aunque el docetaxel y el paclitaxel son agentes útiles en el tratamiento del cáncer, su actividad antitumoral está limitada a causa de su toxicidad no específica hacia las células normales. Además, compuestos como el paclitaxel y el docetaxel por sí mismos no son suficientemente potentes para usarse en conjugados de agentes de unión celular.

[00174] Un taxano preferido para su uso en la preparación de conjugados citotóxicos es el taxano de fórmula (XI):



(XI)

[00175] Se describen con detalle métodos para sintetizar taxanos que pueden usarse en los conjugados citotóxicos de la presente invención, junto con métodos para conjugar los taxanos a agentes de unión celular tales como anticuerpos, en las patentes de Estados Unidos N° 5.416.064, 5.475.092, 6.340.701, 6.372.738 y 6.436.931, y en las publicaciones de Estados Unidos N° US 2004001838, US 6596757, US 1715795, WO 2004/013093 y US 2004024049.

Análogos de CC-1065

[00176] El agente citotóxico usado en los conjugados citotóxicos de acuerdo con la presente invención también puede ser CC-1065 o un derivado del mismo.

[00177] CC-1065 es un potente antibiótico anti-tumoral aislado del caldo de cultivo de *Streptomyces zelensis*. CC-1065 es aproximadamente 1000 veces más potente *in vitro* que los fármacos anti-cáncer habitualmente usados, tales como doxorubicina, metotrexato y vincristina (B.K. Bhuyan et al., Cancer Res., 42, 3532-3537 (1982)). CC-1065 y sus análogos se describen en las patentes de Estados Unidos N° 6.372.738, 6.340.701, 5.846.545 y 5.585.499.

[00178] La potencia citotóxica de CC-1065 se ha correlacionado con su actividad alquilante y su actividad de unión a ADN o intercalante en el ADN. Estas dos actividades residen en partes diferentes de la molécula. Por tanto, la actividad alquilante está contenida en la subunidad ciclopropapirrolindol (CPI) y la actividad de unión a ADN reside en las dos subunidades pirrolindol.

[00179] Aunque CC-1065 tienen ciertas características atractivas como agente citotóxico, tiene limitaciones en uso terapéutico. La administración de CC-1065 a ratones causaba una hepatotoxicidad retardada que conducía a mortalidad en el día 50 después de una única dosis intravenosa de 12,5 μ /kg (V. L. Reynolds et al., J. Antibiotics, XXIX, 319-334 (1986)). Esto ha estimulado los esfuerzos por desarrollar análogos que no causen toxicidad retardada, y se ha descrito la síntesis de análogos más simples modelados sobre CC-1065 (M.A. Warpehoski et al., J. Med. Chem., 31, 590-603 (1988)).

[00180] En otra serie de análogos, el resto CPI se reemplazó por un resto ciclopropabenzindol (CBI) (D.L. Boger et al., J. Org. Chem., 55, 5823-5833, (1990), D.L. Boger et al., BioOrg. Med. Chem. Lett., 1, 115-120 (1991)). Estos compuestos mantienen la elevada potencia *in vitro* del fármaco parental, sin causar toxicidad retardada en ratones. Como CC-1065, estos compuestos son agentes alquilantes que se unen al surco menor del ADN de un modo covalente para causar la muerte celular. Sin embargo, la evaluación clínica de los análogos más prometedores, Adozelesina y Carzelesina, ha conducido a resultados decepcionantes (B.F. Foster et al., Investigational New Drugs, 13, 321-326(1996); I. Wolff et al., Clin. Cancer Res., 2, 1717-1723 (1996)). Estos fármacos presentan pobres efectos terapéuticos a causa de su alta toxicidad sistémica.

[00181] La eficacia terapéutica de los análogos de CC-1065 puede mejorarse enormemente cambiando la distribución *in vivo* a través del suministro dirigido en el sitio del tumor, lo que provoca una toxicidad inferior en los tejidos no marcados como diana y, por tanto, toxicidad sistémica inferior. Para conseguir este objetivo, se han

descrito conjugados de análogos y derivados de CC-1065 con agentes de unión celular que se dirigen específicamente a células tumorales {patentes de Estados Unidos; 5.475.092; 5.585.499; 5.846.545}. Estos conjugados típicamente presentan alta toxicidad específica de diana *in vitro*, y actividad anti-tumoral excepcional en modelos de xenoinjerto de tumor humano en ratones {R.V. J. Chari et al., Cancer Res., 55, 4079-4084 (1995)}.

[00182] Se describen en detalle métodos para sintetizar análogos de CC-1065 que pueden usarse en los conjugados citotóxicos de la presente invención, junto con métodos para conjugar los análogos a agentes de unión celular tales como anticuerpos, en las patentes de Estados Unidos N° 5.475.092, 5.846.545, 5.585.499, 6.534.660 y 6.586.618 y en las publicaciones de Estados Unidos N° US 2003199519 y US 2003195365.

Otros fármacos

[00183] También son adecuados fármacos tales como metotrexato, daunorrubicina, doxorrubicina, vincristina, vinblastina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, caliqueamicina, tubulicina y análogos de tubulicina, duocarmicina y análogos de duocarmicina, dolastatina y análogos de dolastatina para la preparación de conjugados de la presente invención. Las moléculas de fármaco también pueden enlazarse a las moléculas de anticuerpo a través de una molécula vehículo intermediaria tal como albúmina sérica. Los compuestos Doxarrubicina y Danorrubicina, que se describen, por ejemplo, en la publicación de Estados Unidos N° US 20010036923, también pueden ser agentes citotóxicos útiles.

Composición terapéutica

[00184] La presente invención también proporciona una composición terapéutica que comprende:

- (a) una cantidad eficaz de uno o más conjugados citotóxicos, y
- (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[00185] Asimismo, la presente invención proporciona un método *in vitro* para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto las células diana, o el tejido que contiene las células diana, con una cantidad eficaz de un conjugado citotóxico, o agente terapéutico que comprende un conjugado citotóxico, solo o en combinación con otros agentes citotóxicos o terapéuticos.

[00186] La presente invención también comprende medicamentos y composiciones para tratar a un sujeto que tiene cáncer, comprendiendo dichos medicamentos y composiciones la composición terapéutica de la presente invención.

[00187] Los conjugados citotóxicos pueden evaluarse para la potencia y especificidad *in vitro* por métodos previamente descritos (véase, por ejemplo, R.V.J. Chari et al., Cancer Res. 55:4079-4084 (1995)). La actividad anti-tumoral puede evaluarse en modelos de xenoinjerto de tumor humano en ratones por métodos también descritos previamente (véase, por ejemplo, Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8618-8623 (1996)).

[00188] Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos y pueden determinarlos los especialistas en la técnica que justifiquen la situación clínica. Como se usa en este documento, los vehículos incluyen diluyentes y excipientes.

[00189] Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH ~ 7,4, que contiene o no contiene aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina sérica humana, (2) solución salina al 0,9% (cloruro sódico (NaCl) al 0,9% p/v), y (3) dextrosa al 5% (p/v); y también puede contener un antioxidante tal como triptamina y un agente estabilizador tal como Tween 20.

[00190] El método para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas puede ponerse en práctica *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*. Como se usa en este documento, inhibir el crecimiento significa ralentizar el crecimiento de una célula, disminuir la viabilidad celular, causar la muerte de una célula, lisar una célula e inducir la muerte celular, ya sea en un periodo corto o largo de tiempo.

[00191] Los ejemplos de usos *in vitro* incluyen tratamientos de médula ósea autóloga antes de su trasplante en el mismo paciente para eliminar las células enfermas o malignas; tratamientos de médula ósea antes de su trasplante para eliminar las células T competentes y evitar la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD); tratamientos de cultivos celulares para eliminar todas las células excepto las variantes deseadas que no expresan el antígeno diana; o para eliminar las variantes que expresan antígeno indeseado.

[00192] Las condiciones de uso no clínico *in vitro* las determinan fácilmente los especialistas en la técnica.

[00193] Los ejemplos de uso clínico *ex vivo* son para eliminar las células tumorales o células linfoides de la médula ósea antes de su trasplante autólogo en el tratamiento contra el cáncer o en el tratamiento de una enfermedad autoinmune, o para eliminar las células T y otras células linfoides de médula ósea o tejido autólogo o alogénico antes de su trasplante para evitar la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD). El tratamiento puede realizarse de siguiente modo. Se recoge la médula ósea del paciente u otro individuo y después se incuba en medio que contiene suero al que se añade el agente citotóxico de la invención. Las concentraciones varían de aproximadamente 10 μ M a 1 pM, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37°C. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación, es decir, la dosis, las determinan fácilmente los especialistas en la técnica. Después de la incubación, las células de la médula ósea se lavan con medio que contiene suero y se devuelven al paciente por infusión *i.v.* de acuerdo con métodos conocidos. En circunstancias en las que el paciente recibe otro tratamiento tal como un tratamiento de quimioterapia ablativa o irradiación total del cuerpo entre el tiempo de recolección de la médula y la reinfusión de las células tratadas, las células de la médula tratadas se almacenan congeladas en nitrógeno líquido usando un equipo médico convencional.

[00194] Para uso clínico *in vivo*, el conjugado citotóxico de la invención se suministrará en forma de soluciones que se ensayan para su esterilidad y para los niveles de endotoxina. Los ejemplos de protocolos adecuados de administración del conjugado citotóxico son los siguientes. Los conjugados se dan semanalmente durante 4 semanas en forma de un bolo i.v. cada semana. Las dosis en embolada se dan en 50 a 100 ml de solución salina normal a la que puede añadirse de 5 a 10 ml de albúmina sérica humana. Las dosificaciones serán de 10 µg a 100 mg por administración, i.v. (intervalo de 100 ng a 1 mg/kg por día). Más preferiblemente, las dosificaciones variarán de 50 µg a 30 mg. Más preferiblemente, las dosificaciones variarán de 1 mg a 20 mg. Después de cuatro semanas de tratamiento, el paciente puede continuar recibiendo tratamiento en una base semanal. Los especialistas en la técnica pueden determinar los protocolos clínicos específicos con respecto a la vía de administración, los excipientes, los diluyentes, las dosificaciones, los tiempos, etc., que justifiquen la situación clínica.

[00195] Los ejemplos de afecciones médicas que pueden tratarse con los medicamentos y composiciones descritos en este documento incluyen malignidades de cualquier tipo incluyendo, por ejemplo, cáncer de pulmón, de mama, de colon, de próstata, de riñón, de páncreas, de ovario, de cuello del útero y de órganos linfáticos, osteosarcoma, carcinoma sinovial, un sarcoma o un carcinoma en el que se exprese CA6, y otros cánceres aún por determinar en los que se exprese el glucótopo CA6 de forma predominante; enfermedades autoinmunes, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide, y esclerosis múltiple; rechazo de injertos, tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante hepático, rechazo de trasplante pulmonar, rechazo de trasplante cardíaco, y rechazo de trasplante de médula ósea; la enfermedad de injerto contra hospedador; infecciones víricas, tales como infección por mV, infección por VIH, SIDA, etc.; e infecciones por parásitos, tales como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis, y otras determinadas por los especialistas en la técnica.

Kit

[00196] La presente invención también incluye kits, por ejemplo, que comprenden un conjugado citotóxico descrito e instrucciones para el uso del conjugado citotóxico para eliminar tipos celulares particulares. Las instrucciones pueden incluir directrices para usar los conjugados citotóxicos *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

[00197] Típicamente, el kit tendrá un compartimiento que contiene el conjugado citotóxico. El conjugado citotóxico puede estar en forma liofilizada, forma líquida, u otra forma susceptible de incluirse en un kit. El kit también puede contener elementos adicionales necesarios para poner en práctica el método descrito en las instrucciones del kit, tales como una solución esterilizada para reconstituir un polvo liofilizado, agentes adicionales para combinarlos con el conjugado citotóxico antes de administrarlo a un paciente, y herramientas que ayuden a la administración del conjugado a un paciente.

Realizaciones adicionales

[00198] La presente invención proporciona adicionalmente anticuerpos humanizados y fragmentos de unión a epítipo de los mismos que se marcan adicionalmente para su uso en aplicaciones de investigación o diagnóstico. En realizaciones preferidas, el marcador es un radiomarcador, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de formación de imágenes o un ión metálico.

[00199] También se proporciona un método para diagnóstico en el que dichos anticuerpos o fragmentos de unión a epítipo de los mismos marcados se administran a un sujeto que se sospecha que tiene un cáncer, y se mide o controla la distribución del marcador en el cuerpo del sujeto.

Ejemplos

[00200] El amplio alcance de esta invención es entendido mejor con referencia a los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar la invención a las realizaciones específicas.

Ejemplo 1: Identificación de líneas celulares positivas y negativas al antígeno por ensayos de unión por citometría de flujo

[00201] Se usó un análisis citométrico de flujo para localizar el epítipo de DS6, CA6, en la superficie celular. Las líneas celulares humanas se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) con la excepción de OVCARS (Kearse et al., Int. J. Cancer 88(6):866-872 (2000)), las células OVCAR8 y IGROV1 (M. Seiden, Massachusetts General Hospital). Todas las células se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 4 mM, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina (Cambrex Bio Science, Rockland, ME) y suero bovino fetal al 10% v/v (Atlas Biologicals, Fort Collins, CO), mencionado a partir de ahora como medio de cultivo. Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C, al 5% de CO₂.

[00202] Las células (1-2 x 10⁵ células/pocillo) se incubaron en hielo durante 3-4 h, con concentraciones diluidas en serie del anticuerpo DS6 preparado en tampón FACS (suero de cabra al 2%, RPMI) en placas de 96 pocillos. Las células se agitaron en una centrífuga de sobremesa a 1500 rpm durante 5 min. a 4°C. Después de eliminar el medio, los pocillos se volvieron a cargar después con 150 µl de tampón FACS. Después se repitió la etapa de lavado. El anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con FITC (Jackson Immunoresearch) se diluyó 1:100 en tampón FACS y se incubó con las células durante 1 h en hielo. La placa se cubrió con una lámina metálica para evitar la fotodecoloración de la señal. Después de dos lavados, las células se fijaron con formaldehído al 1% y se analizaron en un citómetro de flujo.

[00203] De forma predominante, el epítipo CA6 se encontró en líneas celulares de origen ovárico, mamario, cervical, y pancreático (Tabla 3) como se había predicho a partir de la inmunohistoquímica del tumor. Sin embargo, algunas líneas celulares de otros tipos de tumor mostraban una expresión limitada de CA6. El anticuerpo DS6 se une con una K_D aparente de 135,6 pM (en células PC-3, Tabla 3). La fluorescencia media máxima (Tabla 3) de las curvas de unión (Figura 1) en las líneas celulares positivas al antígeno sugiere la densidad relativa del antígeno.

Tabla 3

Línea celular	Tejido	Antígeno	MMF*	Kd aparente (M)	Línea celular	Tejido	Antígeno	MMF*	Kd aparente (M)
HL-60	Sangre				Caov-3	Ovario	+	465,20	$5,478 \times 10^{-9}$
Jurkat	Sangre				Caov-4	Ovario	+	149,00	$4,043 \times 10^{-9}$
Namalwa	Sangre				ES-2	Ovario	-		
U-937	Sangre				IGROVI	Ovario	-		
T98G	Cerebro	+	35,94	$1,775 \times 10^{-10}$	OV-90	Ovario	-		
BT-20	Mama	+	232,20	$9,142 \times 10^{-10}$	OVCAR-3	Ovario	+	97,10	$1,473 \times 10^{-9}$
BT-474	Mama	+	1911,00	$1,366 \times 10^{-8}$	OVCAR5	Ovario	-		
BT-483	Mama	+	71,39	$1,046 \times 10^{-9}$	OVCAR8	Ovario	-		
BT-549	Mama	+	12,46	$2,330 \times 10^{-9}$	PA-1	Ovario	-		
CAMA-1	Mama	+	81,41	$2,890 \times 10^{-9}$	SK-OV-3	Ovario	-		
MCF-7	Mama	+	8,635	$1,972 \times 10^{-10}$	SW 626	Ovario	-		
MDA-MB-157	Mama	+	31,85	$1,460 \times 10^{-9}$	TOV-112D	Ovario	+	87,79	$3,067 \times 10^{-10}$
MDA-MB-231	Mama	+	71,58	$8,127 \times 10^{-10}$	TOV-21G	Ovario	+		
MDA-MB-468	Mama	+			AsPC-1	Páncreas	-		
SK-BR-3	Mama	+	559,58	$3,424 \times 10^{-9}$	BxPC-3	Páncreas	+	79,99	$5,263 \times 10^{-9}$
T-47D	Mama	+	811,67	$4,299 \times 10^{-9}$	HPAC	Páncreas	+	2228,00	$2,348 \times 10^{-8}$
ZR-75-1	Mama	+	242,50	$6,938 \times 10^{-10}$	HPAF-II	Páncreas	+	266,50	$2,81 \times 10^{-9}$
HeLa	Cuello del útero	+	119,56	$1,110 \times 10^{-9}$	Hs766T	Páncreas	+	182,90	$2,319 \times 10^{-9}$
KB	Cuello del útero	+	1133,55	$2,380 \times 10^{-9}$	MIAPaCa2	Páncreas	-		
WISH	Cuello del útero	+			MPanc96	Páncreas	-		
Colo205	Colon				SU.86.86	Páncreas	+	36,86	$1,043 \times 10^{-9}$
DLD-1	Colon				SW1990	Páncreas	+	36,17	$3,679 \times 10^{-10}$
HCT-8	Colon				PC-3	Próstata	+	24,81	$1,356 \times 10^{-10}$
HT-29	Colon				A375	Piel	-		
Caki-1	Riñón				SKMEL28	Piel	-		
A549	Pulmón				KLE	Útero	-		
SW2	Pulmón								

*fluorescencia media relativa máxima promedio

Ejemplo 2: Caracterización del epítipo de DS6

[00204] Las propiedades del antígeno de DS6, CA6, se analizaron por inmunotransferencia de los dot blot de lisados celulares CA6-positivos (Caov-3) que se digirieron con tratamientos proteolíticos (pronasa y proteinasa K) y/o glucolíticos (neuraminidasa y ácido peryódico). Para los controles positivos, se ensayaron otros anticuerpos que reconocen una diversidad de tipos de epítipos sobre los lisados de líneas celulares positivas al antígeno (Caov-3 y CM1; Colo205 y C242; SKMEL28 y R24). CM1 es un anticuerpo que reconoce un epítipo proteico del dominio de repetición en tándem de cantidad variable (VNTR) de Muc-1 y, por tanto, proporciona un control para un epítipo proteico. C242 se une a un nuevo glucótopo dependiente de ácido siálico específico de cáncer colorrectal en Muc-1 (CanAg) que proporciona un control para un glucótopo en una proteína. R24 se une al gangliósido GD3 que es específico de melanoma y por tanto proporciona un control para un glucótopo en una estructura no proteica.

[00205] Se sembraron células Caov-3, Colo205, y SKMEL28 en placas de cultivo tisular de 15 cm. El medio de cultivo (30 ml/placa) se renovó el día antes de la lisis. Un tampón RIPA modificado (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NP40 al 1%, desoxicolato sódico al 0,25%), inhibidores de proteasa (PMSF, Pepstatina A, Leupeptina, y Aprotinina), y PBS se pre-enfriaron en hielo. Después de aspirar el medio e cultivo de las placas, las células se lavaron dos veces con 10 ml de PBS enfriado. Todas las etapas posteriores se realizaron en hielo y/o en un sala fría a 4°C. Después aspirar el último lavado de PBS, las células se lisaron en 1-2 ml de tampón de lisis (tampón RIPA con inhibidores de proteasa recién añadidos a una concentración final de PMSF 1 mM, Pepstatina A 1 μM, 10 μg/ml de Leupeptina, y 2 μg/ml de Aprotinina). Los lisados se rasparon de las placas usando un raspador celular y se trituraron pipeteando las suspensiones arriba y abajo (5-10 veces) con una aguja 18G. Los lisados se rotaron durante 10 min. y después se centrifugaron en un microcentrífuga al máximo (13K rpm) durante 10 min. Los sedimentos se desecharon y los sobrenadantes se ensayaron después usando un kit de ensayo de proteínas de Bradford (Biorad).

[00206] Los lisados (2 μl) se pipetearon directamente sobre membranas de nitrocelulosa de 0,2 mm secas. Las manchas de transferencia se dejaron secar al aire durante aproximadamente 30 min. La membrana se seccionó en trozos que contenían cada uno una única mancha. Las manchas de transferencia se incubaron en presencia de pronasa (1 mg/ml de enzima, Tris 50 mM pH 7,5, CaCl₂ 5 mM), proteinasa K (1 mg/ml de enzima, Tris 50 mM pH 7,5, CaCl₂ 5 mM), neuraminidasa (20 mU/ml de enzima, acetato sódico 50 mM pH 5, CaCl₂ 5 mM, 100 μg/ml de BSA) o ácido peryódico (20 mM, acetato sódico 0,5 M pH 5) durante 1 h a 37°C. Los reactivos se adquirieron de Roche (enzimas) y VWR (ácido peryódico). Las membranas se lavaron (5 min.) en tampón de lavado T-TBS (Tween 20 al 0,1%, 1XTBS), se bloquearon en tampón de bloqueo (BSA al 3%, T-TBS) durante 2 h a temperatura ambiente, y se incubaron durante una noche con 2 μg/ml de anticuerpo primario (es decir DS6, CM1, C242, R24) en tampón de bloqueo a 4°C. Las membranas se lavaron tres veces durante 5 min. en T-TBS y después se incubaron en anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón (o humana) conjugado con (Jackson ImmunoResearch; dilución 1:2000 en tampón de bloqueo) durante 1 h a temperatura ambiente. Las inmunotransferencias se lavaron tres veces y se revelaron usando un sistema ECL (Amersham).

[00207] Las inmunotransferencias (Figura 2) de los lisados de control digeridos mostraron que la señal de CM1 se destruía por los tratamientos proteolíticos mientras que las señales de las digestiones glucolíticas no estaban afectadas como se esperaría para un anticuerpo que reconoce un epítipo proteico. La señal de C242 se destruyó por cualquiera de los tratamientos, proteolítico o glucolítico, como se esperaría para un anticuerpo que reconoce un glucótopo hallado en una proteína. La señal de R24, no afectada por los tratamientos proteolíticos, se suprimía con los tratamientos con neuraminidasa o peryodato como se esperaba para un anticuerpo que reconoce un gangliósido. La inmunotransferencia de DS6 de los dot blot del lisado Caov-3 digerido mostró pérdida de señal después del tratamiento con cualquiera de los compuestos, proteolíticos y glucolíticos. Por tanto, como C242, DS6 se une a un epítipo de carbohidrato sobre un núcleo proteico. Además, la señal de la inmunotransferencia de DS6 era sensible al tratamiento con neuraminidasa. Por lo tanto, CA6, como CanAg, es un glucótopo dependiente de ácido siálico.

[00208] Para confirmar la naturaleza de carbohidrato de CA6, el lisado Caov-3 se transfirió en manchas sobre una membrana PVDF y se trató con el agente químico desglucosilante, ácido trifluorometanosulfónico (TFMSA), en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 5 minutos. La transferencia se lavó con T-TBS y se inmunotransfirió con CM1 o DS6 (Figura 3). La señal de DS6 se destruyó después del tratamiento ácido lo que proporciona evidencias adicionales de que CA6 es un glucótopo. La potenciación de la señal de CM1 después del tratamiento con TFMSA indica que el tratamiento ácido no afectaba a la proteína en el filtro y sugiere que el tratamiento glucolítico exponía el epítipo proteico reconocido por CM1.

[00209] Para dilucidar adicionalmente la estructura del carbohidrato sobre el que reside CA6, los dot blot se digirieron con N-glucanasa, O-glucanasa, y/o sialidasa (Figura 4). Se incubaron lisados de células Caov-3 (100 μg, 30 μl) a 100°C durante 5 min. con 2,5 μl de tampón de desnaturalización (Glyko) que contiene SDS y β-mercaptoetanol. Los lisados desnaturalizados después se digirieron con 1 μl de N-glucanasa, O-glucanasa, y/o sialidasa A (Glyko) a 37°C durante 1 h. Los lisados digeridos después se transfirieron en manchas (2 μl) sobre nitrocelulosa y se inmunotransfirieron como se ha descrito anteriormente.

[00210] La N-glucanasa no tenía efecto aparente sobre las señales de inmunotransferencia de DS6. Sin embargo, las muestras digeridas con sialidasa no producían señal. Como la O-glucanasa no puede digerir carbohidratos O-unidos sialilados sin pretratamiento con sialidasa, la señal de DS6 de las muestras procesadas con O-glucanasa sola no estaría afectada. La N-glucanasa, en contraste, no requiere pretratamiento con ninguna enzima glucosídica para su actividad. El hecho de que el tratamiento con N-glucanasa no afecte a la señal de DS6 sugiere que el epítipo CA6 muy probablemente está presente en cadenas de carbohidrato O-unidas sialiladas.

Ejemplo 3: Esclarecimiento del antígeno sobre el que se encuentra el epítipo CA6

[00211] Para identificar el antígeno sobre el que se encuentra el sialoglucótopo CA6, se analizaron inmunoprecipitados de DS6 por SDS-PAGE y transferencia de Western. Los sobrenadantes del lisado celular (1

ml/muestra; 3-5 mg de proteína) se pre-aclararon con perlas de Proteína G (30 µl), se equilibraron con 1 ml de tampón RIPA, durante 1-2 h, con rotación, a 4°C. Todas las etapas posteriores se realizaron en hielo y/o en una sala fría a 4°C. Las perlas pre-aclaradas se agitaron brevemente (2-3 s) en una microcentrífuga. Los sobrenadantes pre-aclarados se transfirieron a tubos nuevos y se incubaron durante una noche con 2 µg de DS6, con rotación. Se añadieron perlas de Proteína G nuevas y equilibradas (30 µl) a los lisados y se incubaron durante 1 h, con rotación. Las suspensiones de perlas-lisado se agitaron brevemente en una microcentrífuga y las muestras de los lisados post-inmunoprecipitación se cogieron opcionalmente. Las perlas se lavaron 5-10 veces con 1 ml de tampón RIPA.

[00212] Las muestras de inmunoprecipitadas DS6 después se digirieron con 30 µl de neuraminidasa (20mU de neuraminidasa (Roche), acetato sódico 50 mM pH 5, CaCl₂ 5 mM, 100 µg/ml de BSA) o 30 µl de ácido peryódico (ácido peryódico 20 mM (VWR), acetato sódico 0,5 M pH 5) durante 1 h a 37°C. Después se resuspendieron en 30 µl de tampón de carga de muestra 2X (que contenía β-mercaptoetanol). Las perlas se hirvieron durante 5 min. y los sobrenadantes de tampón de carga se cargaron en geles de Tris-Glicina al 4-12% o 4-20% (Invitrogen). Los geles se procesaron en tampón de procesamiento de electroforesis de Laemmli a 125 V durante 1,5 h. Las muestras del gel se transfirieron, durante una noche a 20 mA, sobre membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm (Invitrogen) usando un aparato de transferencia Mini Trans-blot (Biorad). Las membranas se inmunotransfirieron con DS6 como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2.

[00213] Como alternativa, las perlas inmunoprecipitadas se desnaturalizaron primero y después se digirieron enzimáticamente con N-glucanasa, O-glucanasa y/o sialidasa A (Glyko). Las perlas se resuspendieron en 27 µl de tampón de incubación y 2 µl de solución de desnaturalización (Glyko) y se incubaron a 100°C durante 5 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió solución detergente (2 µl) y las muestras se incubaron con 1 µl de N-glucanasa, O-glucanasa, y/o sialidasa A a 37°C durante 4 h. Después de añadir tampón de carga de muestra 5X (7 µl), las muestras se hirvieron durante 5 min. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE y se inmunotransfirieron como se ha descrito anteriormente.

[00214] DS6 inmunoprecipita una banda de proteína de >250 kDa que puede observarse en lisados celulares positivos al antígeno (Figura 5A, B, y C). En algunas líneas celulares (es decir, T-47D), se observa un doblete. La banda de >250 kDa se suprime en inmunoprecipitados de Caov-3 que se trataron con neuraminidasa o ácido peryódico (Figura 5 A y B) lo que sugiere que el epítopo CA6 reside en la banda de >250 kDa. También se ha demostrado que la banda de >250 kDa es insensible al tratamiento con N-glucanasa de los inmunoprecipitados, coherente con que CA6 reside en un carbohidrato O-unido (Figura 5F). El hecho de que DS6 no inmunoprecipite dicha banda de células negativas al antígeno de DS6 (Figura 5D y E) apoya adicionalmente que la banda de 250 kDa es el antígeno CA6.

[00215] Varias líneas de evidencias sugerían que el antígeno CA6 era Muc1. A causa del alto peso molecular y la sensibilidad a enzimas glucolíticas específicas de carbohidrato O-unido, parece probable que el antígeno CA6 fuera una mucina. La sobre-expresión de mucina está bien caracterizada en tumores particularmente de mama y ovario, coherente con las reactividades tumorales principales de DS6. Además, CA6, como CanAg (un sialoglucótopo en Muc1), no es susceptible a la precipitación con ácido perclórico, lo que sugiere que el antígeno CA6 está muy O-glucosilado. La observación de que en algunas líneas celulares que expresan DS6, DS6 inmunoprecipitaba un doblete de >250 kDa sugería que CA6 era Muc1. Una característica distintiva de Muc1 en seres humanos es la presencia de dos alelos Muc1 distintos que difieren en la cantidad de repeticiones en tándem, lo que provoca la expresión de dos proteínas Muc1 de diferentes pesos moleculares.

[00216] Para ensayar si CA6 se halla en Muc1, los inmunoprecipitados con DS6 del lisado Caov-3 se sometieron a SDS-PAGE y se inmunotransfirieron con DS6 o un anticuerpo contra la VNTR de Muc1, CM1. Como puede observarse en la Figura 6A, CM1 reacciona fuertemente con la banda de >250 kDa inmunoprecipitada por DS6. En la Figura 6B, los inmunoprecipitados con DS6 y CM1 del lisado de células HeLa muestran el mismo doblete de >250 kDa cuando se inmunotransferían con DS6 o CM1. Estos resultados indican que el epítopo CA6 está, de hecho, localizado en la proteína Muc-1. El doblete con DS6 observado en células HeLa (y T-47D) puede explicarse por el hecho de que la expresión de Muc-1 está dirigida por distintos alelos que tienen cantidades variables de repeticiones en tándem.

[00217] Aunque CM1 y DS6 se unen a la misma proteína Muc-1, son epítopos distintos. La desglucosilación química de los dot blot del liado Caov-3 por ácido trifluorometanosulfónico (TFMSA) suprimía la señal de DS6 (Figura 3). Sin embargo, este mismo tratamiento potenciaba la señal de CM1. La desglucosilación puede haber puesto de manifiesto epítopos ocultos para el anticuerpo CM1. Además, una comparación de los resultados de unión por citometría de flujo de DS6 y CM1 (Tabla 4) demuestra que el epítopo CA6 no existe en todas las células que expresan Muc1. Es interesante observar que el epítopo CA6 no se expresa en Colo205 (Tabla 3), una línea celular que se sabe que expresa altos niveles del sialoglucótopo CanAg de Muc1.

Tabla 4

Línea celular	DS6		CM1		
	MMF*	Kd aparente (M)	MMF*	Kd aparente (M)	
DS6 positiva y CM1 positiva	BT549	71,39	1,046 x 10 ⁻⁰⁹	187,90	6,056 X 10 ⁻⁰⁹
	CaOV3	465,20	5,478 x 10 ⁻⁰⁹	1031,00	7,479 x 10 ⁻⁰⁹
	HeLa	242,50	6,938 x 10 ⁻¹⁰	334,80	2,907 x 10 ⁻⁰⁹
	KB	119,56	1,110 x 10 ⁻⁰⁹	338,00	5,345 x 10 ⁻⁰⁹
DS6 negativa y CM1 positiva	MCF7	81,41	2,890 x 10 ⁻⁰⁹	1023,00	8,694 x 10 ⁻⁰⁹
	KLE	27,48	-	561,70	8,156 x 10 ⁻⁰⁹
	OVCAR3	21,19	-	192,50	5,949 x 10 ⁻⁰⁹

SKOV3	17,53	-	49,41	6,246 x 10 ⁻⁰⁹
*MMF = fluorescencia relativa media máxima				

Ejemplo 4: Análisis cuantitativo de epítipo CA6 circulante

5 **[00218]** Como el epítipo CA6 reside en Muc1, una molécula que se sabe que es circulante en el torrente
 10 sanguíneo en muchos pacientes con cáncer, se emprendió un enfoque cuantitativo para determinar si dichos niveles
 serían prohibitivos para la terapia con anticuerpo DS6. Se cree que la unión del anticuerpo en circulación al antígeno
 conduce a una rápida eliminación de los complejos inmunes de la sangre. Si se elimina rápidamente una parte
 significativa de la dosis de anticuerpo administrada de la circulación, es probable que la cantidad que alcanza el
 tumor esté disminuida produciendo una actividad anti-tumoral disminuida del agente terapéutico de anticuerpo.

15 **[00219]** Ensayos clínicos recientes de agentes terapéuticos de anticuerpo ha generado información en cuanto al
 impacto de la concentración de antígeno circulante sobre la farmacocinética. Por ejemplo, en ensayos clínicos con
 trastuzumab (Herceptina), un anticuerpo usado para el tratamiento de cáncer de mama metastásico que expresa
 her2/neu, la farmacocinética de la eliminación de trastuzumab se mostraba inalterada cuando el nivel de Her2/neu
 20 circulante era menor de 500 ng/ml (Pegram et al., J. Clin. Oncol. 16(S):2659-71 (1998)). Suponiendo un peso
 molecular de Her2/neu circulante de 110.000 Dalton, una concentración molar de Her2/neu circulante por debajo de
 4,5 nM parece tener poca influencia sobre la farmacocinética.

25 **[00220]** En otro ejemplo, un ensayo clínico con cantuzumab mertansina (huC242-DM1) indicó que no había
 correlación con los niveles pretratamiento de CanAg circulante (epítipo de C242) y la farmacocinética de la
 eliminación del anticuerpo (Tolcher et al., J. Clin. Oncol. 21(2):211-22 (2003)). El epítipo CanAg, similar al epítipo
 CA6 reconocido por DS6, es un sialoglucótopo O-unido específico de tumor único en Muc1. Sin embargo, la
 naturaleza heterogénea del epítipo CanAg hace difícil cuantificarlo en términos molares. En la población general, los
 alelos Muc1 varían en longitud dependiendo de la cantidad de repeticiones en tándem en el dominio de repetición en
 30 tándem de cantidad variable (VNTR). Existen varios sitios para la glucosilación O-unida en cada repetición en
 tándem. Además de la complejidad de la expresión de CanAg está la variación entre células en la actividad glucosil
 transferasa inherente. Por tanto, es posible una amplia serie de epítipos CanAg por molécula Muc1 incluso en un
 único paciente. Además, la proporción de epítipo CanAg por molécula Muc1 será diferente dentro de una población
 de pacientes. Por esta razón, se mide el CanAg circulante en muestras séricas por ELISA tipo sándwich donde C242
 35 captura la Muc1 circulante con epítipo CanAg y se detecta por un sistema de C242 biotinilado/estreptavidina HRP.
 El CanAg circulante se cuantifica en unidades normalizadas (U) proporcionales a la cantidad de epítipos por ml de
 suero en lugar de por una concentración molar de Muc1. Por analogía, sucede una situación similar para la
 cuantificación de epítipos CA6 circulantes. En contraste, para trastuzumab existe solamente un epítipo por
 molécula her2/neu circulante, lo que simplifica enormemente la cuantificación del antígeno circulante.

40 **[00221]** Para relacionar los niveles del epítipo circulante CA6 con los encontrados en ensayos clínicos con
 trastuzumab y cantuzumab mertansina, se desarrolló un método para obtener las concentraciones molares de
 epítipos circulantes complejos tales como sialoglucótopos en Muc1. Primero, se estableció un ensayo ELISA tipo
 sándwich simple para DS6. Se muestra una representación del ensayo en la Figura 7A. Se usó DS6 para capturar
 Muc1 que tiene el epítipo CA6. Como cada molécula Muc1 tiene múltiples epítipos CA6, también se usó DS6
 45 biotinilado como anticuerpo indicador. El DS6 biotinilado unido a CA6 capturado se detectó por estreptavidina-HRP
 usando ABTS como sustrato. El epítipo CA6 se capturó de suero de un paciente con cáncer de ovario o de patrones
 que provienen de un kit de ensayo de Muc1 disponible en el mercado (CA15-3) usado para controlar Muc1 circulante
 en pacientes con cáncer de mama. Las unidades de DS6/ml se establecieron arbitrariamente a las unidades de
 patrón CA15-3/ml.

50 **[00222]** En la Figura 7B se muestran los resultados del ELISA tipo sándwich de DS6 en el que se usaron patrones
 CA15-3. La curva generada es muy similar a la obtenida con patrones CA15-3 en el ensayo CA15-3. Para convertir
 las unidades de DS6/ml en una concentración molar de CA6, se requiere una curva patrón para DS6 biotinilado que
 convierte la señal en picogramos de DS6. Suponiendo una estequiometría uno a uno entre el epítipo CA6 y el
 55 anticuerpo DS6 biotinilado y un peso molecular de 160.000 Dalton para el DS6 biotinilado, pueden computarse los
 moles de CA6 capturado por volumen de muestra añadida.

60 **[00223]** En la Figura 8A y B están las representaciones de dos medios alternativos para generar una curva patrón
 para DS6 biotinilado. En la Figura 8A, se usa anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón para capturar el DS6
 biotinilado que a su vez se detecta de un modo idéntico al usado en el ensayo ELISA tipo sándwich mostrado en la
 Figura 7. En el método mostrado en la Figura 8B, el DS6 biotinilado se siembra directamente en la placa ELISA y se
 detecta como en la Figura 8A. Como se observa en la Figura 8C, las curvas patrón de DS6 biotinilado generadas por
 cada método están en buena concordancia.

65 **[00224]** En la Tabla 5 se muestra el análisis de las muestras séricas de pacientes con cáncer de ovario para
 diversos antígenos circulantes. El ELISA CA125 generalmente se usa para controlar el tratamiento de pacientes con
 cáncer de ovario midiendo las unidades de CA125 circulante/ml. El estado de CA125 se proporcionó con las
 muestras séricas. El ELISA CA15-3 generalmente se usa para controlar el tratamiento de pacientes con cáncer de
 mama midiendo las unidades/ml de Muc1 circulante usando anticuerpos de captura y detección que reconocen
 70 epítipos distintos de los reconocidos por DS6. En la Tabla 5, se mide CA15-3 en muestras séricas de pacientes con
 cáncer de ovario.

Suero Nº	CA125 ¹ (U/ml)	CA15-3 ¹ (U/ml)	DS6 ² (U/ml)	DS6 ³ (pM)	DS6 ⁴ (pM)
-------------	------------------------------	-------------------------------	----------------------------	--------------------------	--------------------------

4	72,80	117,72	29,79	52,13	188,94
5	3651,90	98,19	567,02	654,44	>2560,00
6	930,50	87,08	504,15	667,56	2505,00
7	76,00	72,70	135,65	246,94	778,25
8	32,50	18,44	39,96	65,19	239,88
9	551,70	292,39	>975,61	1512,31	>2560,00
10	90,00	42,40	49,48	85,19	305,88
11	200,50	60,58	92,32	152,38	526,75
12	283,00	35,67	83,65	135,81	485,06
13	197,50	20,61	35,92	61,06	216,25
14	100,60	6,13	12,39	23,19	88,06
15	34,60	59,18	199,85	286,63	1228,56
17	196,40	56,75	66,53	130,44	405,88
18	16,90	30,45	34,43	60,81	223,69
19	22,00	263,93	118,98	191,69	728,94
22	110,70	21,44	16,46	29,94	111,38

¹ determinado por kit ELISA comercial

² determinado por patrones CA15-3 comerciales (1 U CA15-3 = 1 U DS6)

³ anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón y curva patrón de biotina-DS6

⁴ curva patrón de biotina-DS6

[00225] Para los valores de CA15-3 presentados en la Tabla 5, se usó un kit de inmunoensayo enzimático CA15-3 disponible en el mercado de CanAg Diagnostics. Para las unidades de DS6/ml, se generó una curva patrón usando los patrones CA15-3 (del kit de inmunoensayo enzimático CA15-3 de CanAg Diagnostics) en el ELISA tipo sándwich de DS6. Las unidades de DS6/ml se establecieron arbitrariamente igual a las unidades de CA15-3/ml. En las dos últimas columnas se calculó la concentración de CA6 circulante picomolar (pM) usando las curvas patrón de DS6 biotinilado mostradas en la Figura 8C.

[00226] Para el análisis cuantitativo de los niveles de CanAg, los niveles séricos de CanAg fueron los presentados para pacientes que participaban en un ensayo clínico con cantuzumab mertansina antes del tratamiento (Tolcher et al., *J. Clin. Oncol.* 21(2):211-22 (2003)). Se usó un ensayo ELISA análogo al descrito para DS6 para generar una curva patrón de CanAg usando patrones CanAg. Se usó C242 para capturar los patrones CanAg. La detección de CanAg capturado se consiguió usando el indicador C242 biotinilado seguido de revelado con estreptavidina-HRP usando ABTS como sustrato. Se construyó una curva patrón de C242 biotinilado, como se hizo para DS6 biotinilado, que permitía la conversión de unidades/ml a una concentración molar de epítomos CanAg circulantes. En la Tabla 6 se presentan los niveles de CanAg de pacientes del ensayo clínico con cantuzumab mertansina junto con las concentraciones molares calculadas correspondientes de CanAg circulante.

Tabla 6		
CanAg ¹ (U/ml)	CanAg ² (pM)	CanAg ³ (pM)
31240	19185,7	34592,8
8687	3535	9619,3
7456	4579	8256,2
3686	2263,7	4081,6
1447	888,7	1602,3
1262	775	1397,4
718	441	795,1
547	335,9	605,7
394	242	436,3
381	234	421,9
329	202,1	364,3
322	197,8	356,6
306	187	338,8
284	174,4	314,5
247	151,7	273,5
242	148,6	268
229	140,6	253,6
227	139,4	251,4
184	113	203,7
120	73,7	132,9
107	65,7	118,5
100	61,4	110,7
81	49,7	89,7
81	49,7	89,7
67	41,1	74,2
53	32,5	58,7
45	27,6	49,8
43	26,4	47,6
39	24	43,2
36	22,1	39,9
24	14,7	26,6
18	11,1	19,9
17	10,4	18,8

<10	6,1	11,3
<10	6,1	11,3
<10	6,1	11,3
<10	6,1	11,3

¹ niveles pre-tratamiento de CanAg circulante medidos por ELISA tipo sándwich
² anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón y curva patrón de biotina-C242
³ curva patrón de biotina-C242

[00227] Una comparación de los niveles pM de CA6 circulante en pacientes con cáncer de ovario con los calculados para CanAg circulante en pacientes con cáncer CanAg-positivo muestra que, en general, los niveles de CA6 circulante son similares a los niveles de CanAg circulante. Además, solamente 2 de las 16 muestras séricas de pacientes con cáncer de ovario tienen potencialmente niveles de CA6 mayores de 4,5 nM (muestras séricas 5 y 9 para las que la señal estaba fuera del rango de la curva patrón), el nivel por encima del cual se observaba una farmacocinética alterada de herceptina en ensayos clínicos con pacientes con cáncer de mama Her2/neu-positivo. Se observaron niveles de CanAg por encima de 4,5 nM solamente en 3 de los 37 pacientes del ensayo clínico. En este ensayo clínico no hubo correlación con los niveles de CanAg circulante y la eliminación más rápida de cantuzumab mertansina. Sin embargo, el paciente con el mayor nivel de CanAg (31240 U/ml) solamente se muestreó durante 8 horas después de la transfusión. Estos resultados indican que ciertos epítomos de Muc1, tales como CA6 y CanAg, aunque son circulantes en pacientes con cáncer, no son circulantes a niveles prohibitivos para el tratamiento terapéutico con anticuerpo.

Ejemplos 6: Clonación de las regiones variables del anticuerpo DS6 murino

[00228] Los anticuerpos monoclonales murinos tales como DS6 tienen utilidad limitada en un entorno clínico porque se reconocen como extraños por el sistema inmune humano. Los pacientes desarrollan rápidamente anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) lo que provoca que rápida eliminación de los anticuerpos murinos. Por esta razón, la región variable de DS6 murino (muDS6) se revisió para producir anticuerpos DS6 humanizados (huDS6).

[00229] Se clonaron las regiones variables del anticuerpo DS6 murino por RT-PCR. El ARN total se purificó de un matraz T175 confluyente de células de hibridoma DS6 usando el kit Qiagen RNeasy miniprep. Las concentraciones de ARN se determinaron por espectrofotometría UV y se hicieron reacciones RT con 4-5 µg de ARN total usando el kit Gibco Superscript II y cebadores hexaméricos aleatorios.

[00230] Las reacciones de PCR se realizaron con cebadores degenerados basados en los descritos en Wang Z et al., J Immunol Methods. Ene 13; 233 (1-2): 167-77 (2000). La mezcla de reacción RT se usó directamente para reacciones de PCR degeneradas. Se usaron el cebador de cadena ligera 3', HindKL,

(TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC) (SEC ID N°: 25)

y el cebador de cadena pesada 3', BamIlgG1,

(GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC) (SEC ID N°: 26), y los cebadores de PCR del extremo 5' fueron SaclMK

(GGGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA) (SEC ID N°: 27) para la cadena ligera y una mezcla igual de EcoR1MH1 (CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC) (SEC ID N°: 28) y EcoR1MH2 (CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG) (SEC ID N°: 29) para la cadena pesada (bases mixtas: H = A+T+C, S = G+C, Y = C+T, K = G+T, M = A+C, R = A+G, W = A+T, V = A+C+G, N = A+T+G+C).

[00231] Las reacciones de PCR fueron convencionales excepto en que se suplementaron con DMSO al 10% (las mezclas de reacción de 50 µl contenían concentraciones finales de tampón de reacción 1X (ROCHE), 2 mM de cada dNTP, 1 mM de cada cebador, 2 µl de reacción RT, 5 µl de DMSO, y 0,5 µl de Taq (ROCHE)). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador MJ Research usando un programa adaptado de Wang Z et al., (J Immunol Methods. Ene 13; 233 (1-2): 167-77 (2000)): 1) 94°C, 3 min.; 2) 94°C, 15 segundos; 3) 45°C, 1 min.; 4) 72°C, 2 min.; 5) el ciclo de nuevo desde la etapa nº 2 29 veces; 6) acabado con una etapa de extensión final a 72°C durante 10 min. Los productos de PCR se clonaron en pBluescript II SK+ (Stratagene) usando enzimas de restricción creadas por los cebadores de PCR. Los servicios de secuenciación Seqwright secuenciaron los clones de cadena pesada y ligera.

[00232] Para confirmar las secuencias de ADNc del extremo 5', se realizaron PCR y clonaciones adicionales. Las secuencias de ADNc de cadena ligera y cadena pesada de DS6, determinadas a partir de los clones de PCR degenerados, se introdujeron en el sitio web de búsqueda Blast de NCBI y se guardaron las secuencias del anticuerpo murino con la secuencia señal propuesta. Se diseñaron cebadores de PCR a partir de estos péptidos señal usando tramos conservados entre las secuencias de ADN relacionadas. Se añadieron sitios de restricción EcoRI a los cebadores de secuencia líder (Tabla 7) y estos se usaron en reacciones de RT-PCR como se ha descrito anteriormente.

Tabla 7

Cebadores degenerados de la secuencia señal de DS6

Nombre	Secuencia
Cadena pesada - DS6HClead	tttgaattcaataactacaggtgccact - SEC ID N°: 30
Cadena ligera - KTLIClead	tttgagctccagatttcagcttctgct - SEC ID N°: 31

[00233] Se secuenciaron varios clones de cadena ligera y pesada individuales para identificar y evitar posibles

errores de secuencia generados por la polimerasa. Se obtuvo solamente una secuencia para los clones de RT-PCR tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Estas secuencias fueron suficientes para diseñar cebadores que pudieran amplificar las secuencias de cadena ligera y pesada de DS6 murino que se extienden en la secuencia señal. Los clones posteriores a partir de estas reacciones de PCR de seguimiento confirmaron las secuencias del extremo 5' de la región variable que se habían alterado por los cebadores degenerados originales. Los resultados acumulativos de los diversos clones de ADNc proporcionaron las secuencias finales de cadena ligera y pesada de DS6 murino presentadas en la Figura 9. Usando las definiciones de Kabat y AbM, se identificaron las tres CDR de cadena ligera y cadena pesada (Figuras 9 y 10). Una búsqueda de la base de datos IgBlast de NCBI indica que la región variable de cadena ligera del anticuerpo muDS6 deriva muy probablemente del gen de la línea germinal IgV α 4 murino mientras que la región variable de cadena pesada muy probablemente deriva del gen de la línea germinal IgV λ 5.41 murino (Figura 11).

Ejemplo 7: Determinación de los restos superficiales de la región variable del anticuerpo DS6

[00234] Las técnicas de revestimiento de anticuerpos descritas por Pedersen et al. (1994) y Roguska et al. (1996) empiezan prediciendo los restos superficiales de las secuencias variables del anticuerpo murino. Un resto superficial se define como un aminoácido que tiene al menos un 30% de su área superficial total accesible a una molécula de agua. En ausencia de una estructura resuelta para encontrar los restos superficiales para muDS6, se alinearon los diez anticuerpos con las secuencias más homólogas en la serie de 127 archivos de estructura de anticuerpos (Figura 12). La accesibilidad del disolvente para cada posición de Kabat se promedió para estas secuencias alineadas (Figuras 13A y B).

[00235] Las posiciones superficiales con accesibilidades promedio entre el 25% y el 35% se sometieron a una segunda ronda de análisis comparando una subserie de anticuerpos que contenían dos restos idénticos flanqueantes en cada lado (Figuras 13A y B). Después de la segunda ronda de análisis, los 21 restos superficiales predichos para la cadena pesada de muDS6 se aumentaron a 23, añadiendo Tyr3 y Lys23 a la lista de restos con accesibilidad superficial predicha mayor del 30%. En la mayoría de los anticuerpos revestidos se usa la definición de Kabat de la CDR1 de cadena pesada, pero para DS6 se usó inadvertidamente la definición AbM durante los cálculos de modo que el resto T28 de la cadena pesada no se definió como un resto superficial flanqueante como pudiera haber sido de otro modo. La cantidad de posiciones superficiales de cadena ligera se redujo de 16 a 15 porque la accesibilidad superficial predicha de la Ala80 se redujo del 30,5% al 27,8% en la segunda ronda de análisis. En conjunto, las secuencias variables de cadena pesada y ligera de muDS6 tienen 38 restos flanqueantes accesibles en superficie predichos.

Ejemplo 8: Selección de anticuerpos humanos

[00236] Las posiciones superficiales de la región variable de DS6 murino se compararon con las posiciones correspondientes en las secuencias del anticuerpo humano en la base de datos de Kabat (Johnson G, Wu TT. Nucleic Acids Res. Ene 1; 29(1): 205-6 (2001)). Se usó el software de gestión de bases de datos de anticuerpos SR (Searle, 1998) para extraer y alinear los restos superficiales de los pares de anticuerpos humanos de cadena pesada y ligera naturales. Se eligió la superficie de la región variable del anticuerpo humano con los restos superficiales más idénticos, dando especial consideración a las posiciones que están en 5 Å de una CDR, para reemplazar los restos superficiales de la región variable del anticuerpo DS6 murino.

Ejemplo 9: Vector de expresión para anticuerpos quiméricos y humanizados

[00237] Las secuencias apareadas de cadena ligera y pesada se clonaron en un único vector de expresión de mamíferos. Los cebadores de PCR para las secuencias variables humanas crearon sitios de restricción que permitieron añadir la secuencia señal humana en el vector de clonación pBluescriptII. Las secuencias variables después pudieron clonarse en el plásmido de expresión de mamíferos con EcoRI y BsiWI o HindIII y ApaI para la cadena ligera o la cadena pesada respectivamente (Figura 14). Las secuencias variables de cadena ligera se clonaron en fase en la región constante de IgKappa humana y las secuencias variables de cadena pesada se clonaron en la secuencia de la región constante de IgGammal humana. En los plásmidos de expresión finales, promotores CMV humanos dirigen la expresión de las secuencias de ADNc tanto de cadena ligera como de cadena pesada.

Ejemplo 10: Identificación de restos que pueden afectar negativamente a la actividad de DS6

[00238] En la mayoría de las humanizaciones hasta la fecha, se ha construido un modelo molecular del presente anticuerpo para identificar los restos próximos a una CDR como restos problemáticos potenciales. Con una cantidad en expansión de anticuerpos revestidos a partir de los cuales trabajar, la experiencia histórica es al menos tan eficaz para predecir problemas como la construcción de un modelo, así que no se construyó un modelo molecular para DS6. En su lugar, se compararon los restos superficiales de DS6 murino con los de anticuerpos previamente revestidos y se identificaron los restos un riesgo bajo a alto de afectar a la actividad de unión del anticuerpo.

[00239] Se identificaron repetidamente series similares de restos que están en 5Å de una CDR en las estructuras de anticuerpo resueltas disponibles y los modelos moleculares de humanizaciones previas. Usando estos datos, la Tabla 1 da los restos de DS6 murino que probablemente están próximos a y posiblemente en 5Å de una CDR. Muchas de estas posiciones también se han cambiado en humanizaciones previas, pero solamente la posición 74 de la cadena pesada ha producido alguna vez una pérdida de la actividad de unión. El resto murino se retuvo en esta posición tanto en huC242 como en huB4 para conservar la actividad de unión del anticuerpo murino. Por otro lado, esta misma posición se cambió al resto humano correspondiente en 6.2G5C6 humanizado sin pérdida de actividad (6.2G5C6 es el anticuerpo anti-IGF1-R a menudo mencionado simplemente como anti-C6). Aunque cualquiera de los restos de la Tabla 1 podría presentar un problema en el anticuerpo humanizado, el resto P73 de la cadena pesada será de particular preocupación debido a experiencias previas en esta posición.

Ejemplo 11: Selección de la superficie humana más homóloga

[00240] Las superficies del anticuerpo humano candidato para el revestimiento de muDS6 se extrajeron de la base de datos de secuencias de anticuerpos de Kabat usando el software SR. Este software proporciona una interfaz para la búsqueda solamente de posiciones de restos especificados frente a la base de datos de anticuerpos. Para conservar los pares naturales, se compararon los restos superficiales de las cadenas tanto ligera como pesada. Se alinearon las superficies humanas más homólogas de la base de datos de Kabat para clasificar la identidad de secuencia. Las primeras 3 superficies alineadas por el software SR de la base de datos de Kabat se dan en la Tabla 2. Después se compararon las superficies para identificar qué superficies humanas requerirían los mínimos cambios en los restos identificados en la Tabla 1. En anticuerpo anti-Rh(D), 28E4 (Boucher et al., 1997), requiere la mínima cantidad de cambios de restos superficiales (11 en total) y solamente 3 de estos restos se incluyen en la lista de restos problemáticos potenciales. Como el anticuerpo 28E4 proporciona la superficie humana más homóloga, es el mejor candidato para revestir muDS6.

Ejemplo 12: Construcción de las secuencias de ADN para anticuerpos DS6 humanizados

[00241] Los 11 cambios de restos superficiales para DS6 se hicieron usando mutagénesis por PCR. La mutagénesis por PCR se realizó sobre los clones de ADNc de la región variable de DS6 murino para construir el gen DS6 humano revestido. Se diseñaron series de cebadores de humanización para hacer los cambios de aminoácidos necesarios para revestir DS6, mostrados a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8

Nombre del cebador	Secuencia del cebador	
DS6HCapa	cgatggcccttggtggaggctgcagagacagtgaccaga	SEC ID N°: 32
DS6LCBsi	tttctgtagcttcagctccagcttggt	SEC ID N°: 33
DS6HC5end	caggtgtactactcccaggcttatctccagcagtct	SEC ID N°: 34
huC6HCAPA	cgatggcccttggtggaggcggcagagacagtgaccaga	SEC ID N°: 35
ds6lc5et	caggtgtactactccgagattgttctcaccagctccagcaacc atgtctgcatct	SEC ID N°: 36
ds6LCr18	ggcactgcaggttatggtgacctctcccctggaga	SEC ID N°: 37
ds6lcs77f	caatcagcagcatggaggctgaaga	SEC ID N°: 38
ds6lcs77r	gcctccatgctgctgattgtgaga	SEC ID N°: 39
DS6HCvvpk	caggtgtactactcccaggctcagctcgtgcagtctggggctg agggtggaagcccggggcctcagt	SEC ID N°: 40
DS6HCt	ttgactgcagacacatctccagcaca	SEC ID N°: 41
ds6hcQT	gtgtctgcagtcattgtggccttgccctggaactctgat	SEC ID N°: 42
huDS6HCapa	cgatggcccttggtggaggcggcagagacagtgacaaga	SEC ID N°: 43

[00242] Las reacciones de PCR fueron convencionales excepto en que se suplementaron con DMSO al 10% (las mezclas de reacción de 50 µl contenían concentraciones final de tampón de reacción 1X (ROCHE), 2 mM de cada dNTP, 1 mM cada cebador, 100 ng de molde, 5 µl de DMSO, y 0,5 µl de Taq (ROCHE)). Se procesaron en un termociclador MJ Research con el siguiente programa: 1) 94°C, 1 min.; 2) 94°C, 15 segundos; 3) 55°C, 1 min.; 4) 72°C, 1 min.; 5) el ciclo de nuevo desde la etapa n° 2 29 veces; 6) acabado con una etapa de extensión final a 72°C durante 4 min. Los productos de PCR se digirieron con sus enzimas de restricción correspondientes y se clonaron en los vectores de clonación pBluescript. Los clones se secuenciaron para confirmar los cambios de aminoácidos.

[00243] Como el cambio del resto P73 de la cadena pesada ha causado problemas en el pasado, se construyeron dos versiones de la cadena pesada, una con el 28E4 T73 humano y una con la retención de P73 murino. Los otros 10 restos superficiales se cambiaron del resto muro al resto 28E4 humano en ambas versiones de DS6 humanizado (Tabla 2). De acuerdo con el método de denominación habitual, la versión más humana es la versión 1.0 ya que tiene los 11 restos superficiales humanos. La versión de cadena pesada que tiene el P73 murino se llama versión 1.2 en caso de que se requieran versiones adicionales, de modo que la versión 1.1 se reserva para una versión que contenga la cantidad máxima de restos murinos. Las secuencias de aminoácidos de las dos versiones humanizadas se muestran alineadas con la secuencia de aminoácidos de DS6 murina en la Figura 15A y B. Ambos genes del anticuerpo DS6 humanizado se clonaron en el plásmido de expresión de anticuerpos (Figura 14) para transfecciones transitorias y estables. Las secuencias de ADNc y de aminoácidos de las versiones humanizadas v1.0 y v1.2 son de la región variable de cadena ligera que son iguales y se muestran en la Figura 16. Las secuencias de ADNc y de aminoácidos de cadena pesada de las versiones humanizadas v1.0 y v1.2 se muestran en la Figura 17A y B.

Ejemplo 13: Expresión y purificación de huDS6 en células CHO y mediciones de la afinidad

[00244] Para determinar si las versiones DS6 humanizadas retenían la afinidad de unión de muDS6, fue necesario expresar y purificar los anticuerpos. Se transfectaron células CHO con los plásmidos de expresión de anticuerpos respectivos. Como los niveles de expresión transitoria de huDS6 eran muy bajos, se seleccionaron líneas celulares estables.

[00245] Se sembraron células CHODG44 ($4,32 \times 10^6$ células/placa) en placas de 15 cm en medio no selectivo (Alfa MEM + nucleótidos (Gibco), suplementado con L-glutamina 4 mM, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin, y FBS al 10% v/v) y se colocaron en un incubador humidificado a 37°C, de CO₂ al 5%. El siguiente día, las células se transfectaron con los plásmidos de expresión de huDS6 v1.0 y v1.2 usando una versión modificada del protocolo recomendado de Qiagen para transfección Polyfect. El medio no selectivo se aspiró de las células. Las placas se lavaron con 7 ml de PBS pre-calentado (37°C) y se recargaron con 20 ml de medio no selectivo. El ADN plasmídico (11 µg) se diluyó en 800 µl de Hybridoma SFM (Gibco). Después, se añadieron 70 µl de Polyfect (Qiagen) a la mezcla de ADN/SFM. La mezcla Polyfect después se agitó con vórtice suavemente durante varios segundos y se incubó durante 10 min. a temperatura ambiente. Se añadió medio no selectivo (2,7 ml) a la mezcla. Esta mezcla final se incubó con las células sembradas durante 24 h.

[00246] La mezcla de transfección/medio se retiró de las placas y después las células se trataron con tripsina y se contaron. Las células después se sembraron en medio selectivo (Alfa MEM -nucleótidos, suplementado con L-glutamina 4 mM, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina, FBS al 10% v/v, 1,25 mg/ml de G418) en placas de 96 pocillos (250 µl/pocillos) a diversas densidades (1800, 600, 200, y 67 células/pocillo). Las células después se incubaron durante 2-3 semanas, suplementado el medio si fuera necesario. Los pocillos se exploraron para los niveles de producción de anticuerpos usando un ELISA cuantitativo. Se recubrió una placa Immulon 2HB de 96 pocillos con anticuerpo F(ab)₂ de cabra anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch; 1 µg/pocillo en 100 µl de tampón carbonato sódico 50 mM pH 9,6) y se incubó durante 1,5 h a temperatura ambiente, con balanceo. Todas las etapas posteriores se realizaron a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron dos veces con T-TBS (Tween-20 al 0,1%, TBS) y se bloquearon con 200 µl de tampón de bloqueo (BSA al 1%, T-TBS) durante 1 h. Los pocillos se lavaron dos veces con T-TBS. En una placa diferente, se diluyeron en serie el patrón de anticuerpo, EM164 (100 ng/ml), y los sobrenadantes de cultivo (1:2 o 1:3) en tampón de bloqueo. Estas diluciones (100 µl) se transfirieron a la placa ELISA y se incubaron durante 1 h. Los pocillos se lavaron 3 veces con T-TBS y se incubaron con 100 µl de Fc-AP de cabra anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch) diluido 1:3000 en tampón de bloqueo durante 45 min. Después de 5 lavados con T-TBS, los pocillos se revelaron usando 100 µl de reactivo de revelado PNPP (10 mg/ml de PNPP (fosfato de p-nitrofenilo, sal disódica; Pierce), tampón dietanolamina 0:1 M pH 10,3) durante 25 min. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de placa ELISA. Las lecturas de absorbancia (del sobrenadante de cultivo) en la parte lineal de la curva patrón se usaron para determinar los niveles de anticuerpos.

[00247] Los clones de mayor producción, identificados por el ELISA, se expandieron después y se prepararon soluciones mare celulares congeladas. Para producir una cantidad suficiente de anticuerpo para purificar, las células se expandieron en placas de 15 cm (~ 1 x 10⁶ células/placa) con 30 ml de medio selectivo y se incubaron durante 1 semana. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron en tubos cónicos de 250 ml, se agitaron en una centrifuga de sobremesa (2000 rpm, 5 min., 4°C), y después se filtraron a esterilidad a través de una aparato de filtro de 0,2 µm.

[00248] Para la purificación de DS6, se añadieron gránulos de NaOH a los sobrenadantes de cultivo filtrados hasta un pH final de 8,0. Se equilibró una columna Hi Trap rProtein A (Amersham) con 20-50 volúmenes de columna de tampón de unión. El sobrenadante se cargó en la columna usando una bomba peristáltica. Después, la columna se lavó con 50 volúmenes de columna de tampón de unión. El anticuerpo unido se eluyó de la columna usando tampón de elución (ácido acético 100 mM, NaCl 50 mM, pH 3) en tubos situados en un colector de fracciones. El anticuerpo eluido después se neutralizó usando tampón de neutralización (K₂HPO₄ 2 M, pH 10,0) y después se dializó durante una noche en PBS. El anticuerpo dializado se filtró a través de un filtro de jeringa 0,2 µm. Se midió la absorbancia a 280 nm para determinar la concentración final de proteína.

[00249] La afinidad de la huIgG purificada se comparó con muDS6 por citometría de flujo. En la primera serie de experimentos se midió la unión directa de una línea celular que expresaba CA6, WISH. Como se muestra en la Figura 18A, el DS6 quimérico, huDS6 v1.0, y huDS6 v1.2 muestran afinidades muy similares con K_d aparentes de 3,15 nM, 3,71 nM, y 4,2 nM, respectivamente, lo que sugiere que el revestimiento no ha alterado las CDR. Estas afinidades son sólo ligeramente inferiores que para muDS6 (K_d = 1,93 nM) mostrado en la Figura 18B.

Para confirmar que las versiones huDS6 retienen la afinidad de muDS6, se realizaron experimentos de unión competitiva. La ventaja de este formato es que se usa el mismo sistema de detección para anticuerpos tanto murinos como humanos; que es biotina-muDS6/estreptavidina-DTAF. En algunos casos, la K_d aparente experimentalmente medida puede variar simplemente a causa del reactivo secundario usado para detectar indirectamente la unión. Esto se ilustra por una comparación de la K_d aparente de biotina-DS6 con cuando se usa anticuerpo de cabra anti-ratón-FITC (K_d = 2,80 nM; Figura 18B) o cuando se usa estreptavidina-DTAF (K_d = 6,76 nM; Figura 19A). Los resultados del ensayo de unión competitiva que compara la capacidad de muDS6, huDS6 v1.0, y huDS6 v1.2 de competir con biotina-DS6 se muestran en la Figura 19B. Las EC₅₀ aparentes son 12,18 nM, 37,07 nM, y 22,64 nM para muDS6, huDS6 v1.0, y huDS6 v1.2, respectivamente. Estos resultados indican que el revestimiento de muDS6 para producir un DS6 humanizado causa poca reducción en la afinidad de unión.

Ejemplo 14: Preparación de conjugado citotóxico DS6-DM1

[00250] El anticuerpo DS6 (8 mg/ml) se modificó usando un exceso molar de factor 8 de N-succinimidil-4-(2-piridiliditio) pentanoato (SPP) para introducir grupos ditiopiridilo. La reacción se realizó en tampón A al 95% v/v (KPi 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5) y DMA al 5% v/v durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción ligeramente hinchada se filtró en gel a través de una columna NAP o Sephadex G25 (equilibrada en tampón A). El grado de modificación se determinó midiendo la absorbancia del anticuerpo a 280 nm y la 2-mercaptopiridina (Spy) liberada por el DTT a 280 y 343 nm. Después se conjugó el DS6 modificado a 2,5 mg de Ab/ml usando un exceso molar de factor 1,7 de N²¹-desacetil-N²¹(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (L-DM1) sobre SPy. La reacción se realizó en tampón A (97% v/v) con DMA (3% v/v). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante una noche durante ~20 h. La mezcla de reacción opaca se centrifugó (1162 x g, 10 min.) y el sobrenadante después se filtró en gel a través de una columna NAP-25 o S300 (Tandem 3, columnas de desalado 3x 26/10, medio G25) equilibrada en tampón B (1X PBS pH 6,5). El sedimento se desechó. El conjugado se filtró a esterilidad usando un filtro Millex-GV de 0,22 µm y se dializó en tampón B con un Slide-A-Lyzer. La cantidad de moléculas DM1 unidas por molécula de DS6 se determinó midiendo la absorbancia tanto a 252 nm como a 280 nm del material filtrado. Se descubrió que la proporción DM1/Ab era 4,36 y el rendimiento de la etapa de DS6 conjugado era del 55%. La concentración de anticuerpo conjugado era de 1,32 mg/ml. El conjugado purificado se caracterizó bioquímicamente por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) y se descubrió que era del 92% de monómero. El análisis de DM1 en forma conjugada purificada indicó que el 99% estaba covalentemente unido al anticuerpo. En la Figura 20, la unión por citometría de flujo del conjugado DS6-DM1 y el DS6 no modificado a células Caov-3 muestra que la conjugación de DS6 provoca solamente una ligera pérdida de la afinidad.

Ejemplo 15: Citotoxicidad in vitro de DS6-DM1

[00251] Como anticuerpo desnudo, DS6 ha mostrado ausencia de actividad proliferativa o inhibidora del crecimiento en cultivos celulares (Figura 21) Sin embargo, cuando se incubó el DS6 con células en presencia de un

conjugado de DM1 con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón de cadena pesada y ligera, DS6 es muy eficaz dirigiendo y suministrando este conjugado a la célula, provocando citotoxicidad indirecta (Figura 21). Para ensayar adicionalmente la actividad inherente del DS6 desnudo, se realizó un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) usando DS6 murino y humanizado. Se sembraron células HPAC y ZR-75-1 (25000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos, en presencia de suero humano y de conejo al 5% y diversas diluciones de DS6 murino o humanizado, en 200 μ l de medio RHBP (RPMI-1640, BSA al 0,1%, HEPES 20 mM (pH 7,2-7,4), 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin). Las células se incubaron durante 2 h a 37°C. Después se añadió reactivo azul Alamar (10% de la concentración final) (Biosource) al sobrenadante. Las células se incubaron durante 5-24 h antes de medir la fluorescencia. El DS6 tanto murino como humanizado no tenía efecto en un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (Figura 22). Esto sugiere que la aplicación terapéutica de DS6 requeriría la conjugación de una molécula efectora tóxica.

[00252] Se examinó la citotoxicidad del anticuerpo DS6 conjugado con maitansinoide usando 2 formatos de ensayo diferentes en diversas líneas celulares positivas a DS6. Se realizaron ensayos clonogénicos donde las células (1000-2500 células/pocillo) se sembraron en placas de 6 pocillos en 2 ml de conjugado diluido en medio de cultivo. Las células se expusieron de forma continua al conjugado a varias concentraciones, generalmente entre 3×10^{-11} M a 3×10^{-9} M, y se incubaron en una cámara humidificada a 37°C, de CO₂ al 6% durante 5-9 días. Los pocillos se lavaron con PBS y las colonias se tiñeron con una solución de violeta cristal al 1% p/v/formaldehído al 10% v/v/PBS. El colorante no unido después se lavó minuciosamente de los pocillos con agua destilada, y se dejó que las placas se secaran. Las colonias se contaron usando un microscopio de disección Leica StereoZoom 4.

[00253] La eficacia de siembra (PE) se calculó como la cantidad de colonias/cantidad de células sembradas. La fracción superviviente se calculó como la PE de células tratadas/PE de células no tratadas. La concentración IC₅₀ se determinó haciendo un gráfico de la fracción superviviente de células frente a la concentración molar del conjugado. En un ensayo clonogénico (Figura 23), DS6-DM1 era eficaz eliminando células Caov-3 con una IC₅₀ estimada de 800 pM. Las células negativas al antígeno, A375, estaban sólo ligeramente afectadas por el conjugado a una concentración de 3×10^{-9} M, la mayor concentración de DS6-DM1 ensayada, lo que demuestra que la actividad de eliminación celular del conjugado está específicamente dirigida hacia células que expresan el antígeno. Sin embargo, a pesar de la sensibilidad aparente a maitansina, muchas de las otras líneas celulares positivas a DS6 no eran particularmente sensibles al inmunconjugado. Todas las líneas celulares cervicales (HeLa, KB, y WISH) eran sensibles al conjugado mientras que solamente una cantidad selecta de las líneas celulares de ovario y mama mostró algún efecto citotóxico. Ninguna de las líneas celulares pancreáticas pareció verse afectada.

[00254] En el ensayo de MTT, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 1000-5000 células/pocillo. Las células se sembraron con diluciones en serie de DS6 desnudo o inmunconjugado DS6-DM1 en 200 μ l de medio de cultivo. Las muestras se procesaron por triplicado. Las células y las mezclas de anticuerpo/conjugado después se incubaron durante 2-7 d, momento en el cual se evaluó la viabilidad celular por un ensayo de MTT (bromuro de [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]). Se añadió MTT (50 μ g/pocillo) al sobrenadante de cultivo y se dejó incubar durante 3-4 h a 37°C. El medio se retiró y el MTT formazán se solubilizó en DMSO (175 μ l/pocillo). Se midió la absorbancia a 540-545 nm. En un ensayo de viabilidad celular de MTT (Figura 24C), el inmunconjugado era capaz de eliminar de forma eficaz células Caov-3 con una IC₅₀ estimada de 1,61 nM. Los pocillos con las mayores concentraciones de conjugado no contenían células viables en comparación con el anticuerpo desnudo que no tenía ningún efecto (Figuras 21 y 24).

[00255] Los resultados de los ensayos de MTT sobre las otras líneas celulares fueron ligeramente diferentes (Figura 24A, B, y D-I). En muchos casos, aunque se observó algo de citotoxicidad, el conjugado fue incapaz de eliminar completamente la población completa de células (con la excepción de las células WISH). Las células BT-20, OVCAR5, y HPAC fueron particularmente resistentes: en los pocillos de mayor concentración de conjugado (32 nM), más del 50% de las células era aún viable.

Ejemplo 16: Actividad anti-tumoral del conjugado in vivo

[00256] Para demostrar la actividad in vivo del conjugado DS6-DM1, se establecieron xenoinjertos de tumor humano en ratones SCID. Se desarrolló un modelo subcutáneo de la línea celular de carcinoma cervical humano, KB. Las células KB se cultivaron in vitro, se recogieron, y se inyectaron 5×10^6 células en 100 μ l de medio sin suero bajo la paletilla derecha de cada ratón y se dejaron crecer durante 6 días hasta un volumen de tumor promedio de 144 ± 125 mm³, momento en el cual se inició el tratamiento con fármaco. Se administró a los ratones PBS, conjugado a 150 μ g/kg de DM1, o conjugado a 225 μ g/kg de DM1 (2 ratones por grupo) por vía intravenosa cada día durante 5 días. Las respuestas tóxicas se controlaron diariamente durante el tratamiento. Los volúmenes de los tumores (Figura 25A) y los pesos corporales correspondientes (Figura 25B) se controlaron durante todo el estudio.

[00257] Los tumores KB tratados con PBS de control crecieron rápidamente con un tiempo de duplicación de aproximadamente 4 días. En contraste, los dos grupos de ratones tratados con conjugado mostraron una regresión completa del tumor 14 días y 18 días después del inicio del tratamiento para los grupos de dosis de 225 μ g/kg y 150 μ g/kg, respectivamente. A la dosis de 150 μ g/kg el recuento del tumor era de aproximadamente 70 días. El tratamiento a 225 μ g/kg produjo curación ya que no hubo evidencias de reincidencia del tumor al final del estudio en el día 120. Como se observa en la Figura 25B, los ratones en el grupo de 150 μ g/kg no mostraron pérdida de peso, lo que indica que la dosis se toleraba bien. A la dosis más alta, los ratones experimentan una reducción del 3% solamente temporal en el peso corporal. Durante el ciclo de tratamiento de 5 días, los ratones no mostraron signos visibles de toxicidad. Tomado en conjunto, este estudio demuestra que el tratamiento con DS6-DM1 puede curar a los ratones de tumores de xenoinjerto KB a una dosis no tóxica.

[00258] La actividad de DS6-DM1 se ensayó adicionalmente en un panel de modelos de xenoinjerto subcutáneo (véase la Figura 26). Las líneas celulares tumorales usadas para hacer los xenoinjertos presentaban un intervalo de sensibilidades in vitro a maitansina y de densidades del epítipo CA6 (siguiente Tabla 9). Las células OVCAR5 y TOV-21G son líneas celulares de tumor de ovario; HPAC es una línea celular de tumor pancreático; HeLa es una

línea celular de tumor cervical. Las células OVCAR5 y TOV-21G tienen baja expresión superficial de CA6; las células HeLa tienen un nivel intermedio de expresión superficial de CA6; las células HPAC tienen una alta densidad de CA6 de expresión superficial. Las células TOV-21G y HPAC son sensibles a maitansina; las células OVCAR5 y HeLa son 2-7 veces menos sensibles a maitansina.

5

Tabla 9

Línea celular	MMF*	Kd aparente (M)	Ensayo clonogénico IC ₅₀ maitansina (M)	Ensayo clonogénico IC ₅₀ conjugado (M)	Ensayo MTT EC ₅₀ conjugado (M)
BT-20	232,20	$9,14 \times 10^{-10}$	$3,50 \times 10^{-10}$	$> 3,00 \times 10^{-09}$	$1,44 \times 10^{-06}$
BT-483	1911,00	$1,37 \times 10^{-06}$	$1,50 \times 10^{-10}$	$1,00 \times 10^{-10}$	N/A
Caov-3	465,20	$5,48 \times 10^{-09}$	$3,20 \times 10^{-11}$	$8,00 \times 10^{-10}$	$1,61 \times 10^{-09}$
Caov-4	149,00	$4,04 \times 10^{-09}$	$6,00 \times 10^{-10}$	$> 3,00 \times 10^{-09}$	N/A
HeLa	242,50	$6,94 \times 10^{-10}$	$1,00 \times 10^{-10}$	$1,80 \times 10^{-09}$	N/A
HPAC	2228,00	$2,35 \times 10^{-08}$	$5,50 \times 10^{-11}$	$1,80 \times 10^{-09}$	$1,84 \times 10^{-09}$
HPAF-II	266,50	$2,81 \times 10^{-09}$	$6,00 \times 10^{-10}$	$> 3,00 \times 10^{-09}$	$1,00 \times 10^{-06}$
Hs766T	182,90	$2,32 \times 10^{-09}$	$> 3,00 \times 10^{-09}$	$> 3,00 \times 10^{-09}$	$> 3,20 \times 10^{-08}$
KB	119,56	$1,11 \times 10^{-10}$	$3,00 \times 10^{-11}$	$1,40 \times 10^{-09}$	$3,01 \times 10^{-09}$
OVCAR5	97,10	$1,47 \times 10^{-09}$	$3,20 \times 10^{-10}$	$> 3,00 \times 10^{-09}$	$8,46 \times 10^{-07}$
T-47D	559,58	$3,42 \times 10^{-09}$	$1,20 \times 10^{-10}$	$> 3,00 \times 10^{-09}$	N/A
TOV-21G	87,79	$3,07 \times 10^{-10}$	$4,80 \times 10^{-11}$	$2,00 \times 10^{-09}$	$6,88 \times 10^{-06}$
WISH	1133,55	$2,38 \times 10^{-09}$	$9,00 \times 10^{-11}$	$4,60 \times 10^{-10}$	$6,69 \times 10^{-10}$
ZR-75-1	811,67	$4,30 \times 10^{-09}$	$1,00 \times 10^{-10}$	N/A	$9,45 \times 10^{-10}$

* fluorescencia media relativa máxima promedio

[00259] Las 4 líneas celulares se cultivaron in vitro, se recogieron, y se inyectaron 1×10^7 células en 100 μ l de medio sin suero bajo la peltilla derecha de cada ratón (6 ratones por modelo) y se dejaron crecer durante 6 días hasta un volumen de tumor promedio de $57,6 \pm 6,7$ y $90,2 \pm 13,4$ mm³ para los grupos de ensayo y de control respectivamente de OVCARS, $147,1 \pm 29,6$ y $176,2 \pm 18,9$ mm³ para los grupos de ensayo y de control respectivamente de HPAC, $194,3 \pm 37,2$ y $201,7 \pm 71,7$ mm³ para los grupos de ensayo y de control respectivamente de HeLa, y $96,6 \pm 22,8$ y $155,6 \pm 13,4$ mm³ para los grupos de ensayo y de control respectivamente de TOV-21G, momento en el cual se inició el tratamiento con fármaco. Para cada modelo, se trataron tres ratones de control con dos dosis semanales de PBS y se trataron tres ratones de ensayo con dos dosis semanales de conjugado (600 μ g/kg de DM1) por vía intravenosa. Las respuestas tóxicas se controlaron diariamente durante el tratamiento y se controlaron los volúmenes de los tumores y los pesos corporales en todo el estudio. La eficacia del conjugado para los diversos modelos se muestra gráficamente en la Figura 26A, C, E, y G y los pesos corporales correspondientes se representan en la Figura 26B, D, F, y H. Las líneas celulares OVCAR5, TOV-21G, y HPAC forman tumores agresivos como puede observarse en los controles de PBS para cada modelo. El modelo HeLa tenía aproximadamente un periodo de retardo de 3 semanas antes del empezar el crecimiento exponencial. En todos los modelos, el tratamiento con el conjugado DS6-DM1 provocó una regresión tumoral completa en todos los ratones. Para los modelos TOV-21G, HPAC, y HeLa los ratones permanecen sin tumor en el día 61. En el modelo OVCAR5 los tumores reaparecían en aproximadamente el día 45 después de la inoculación del tumor. Por tanto, el tratamiento con DS6-DM1 en este modelo provoca un retardo en el crecimiento del tumor de aproximadamente 34 días. El retardo del crecimiento es significativo ya que las células OVCAR5 son menos sensibles a maitansina y tienen una baja expresión del epítipo CA6. En modelos en los que la densidad del epítipo CA6 es mayor o el modelo tiene mayor sensibilidad a maitansina, la regresión del tumor es más contundente. Es importante observar que se administraron solamente 2 dosis. Claramente, el programa de dosificación usado en este estudio era no tóxico para los ratones ya que no se observó pérdida de peso. Es probable que pudiera conseguirse la curación con dosis de conjugado adicionales o mayores.

[00260] El cáncer de ovario humano es en gran medida una enfermedad del peritoneo. Las células OVCAR5 crecen de forma agresiva como un modelo intraperitoneal (IP) en ratones SCID que forman nódulos tumorales y producen fluido ascítico de un modo similar a la enfermedad humana. Para demostrar la actividad en un modelo IP, se usó DS6-DM1 para tratar a ratones que albergaban tumores IP OVCAR5 (Figura 27). Las células OVCAR5 se cultivaron in vitro, se recogieron y se inyectaron 1×10^7 células en 100 μ l de medio sin suero por vía intraperitoneal. Se dejó que los tumores crecieran durante 6 días, momento en el cual se inició el tratamiento. Los ratones se trataron semanalmente durante 2 semanas con PBS o conjugado DS6-DM1 a una dosis de 600 μ g/kg de DM1 y se controlaron para la pérdida de peso resultante de la enfermedad peritoneal. En el día 28, el grupo de ratones de PBS había perdido más del 20% del peso corporal y se sacrificaron por eutanasia. El grupo tratado se sacrificó en el día 45 después de exceder una pérdida de peso corporal del 20%. Este estudio demuestra que DS6-DM1 es capaz de retardar el crecimiento tumoral en el modelo IP OVCAR5 agresivo a pesar del hecho de que las células OVCAR5 son menos sensibles a maitansina y tienen menos epítipos CA6 por célula. Como el programa de dosificación usado no provocaba signos visibles de toxicidad, es probable que pudieran usarse dosis adicionales y mayores para conseguir un retardo adicional del crecimiento tumoral o su curación.

Ejemplo 17: Síntesis y caracterización del conjugado citotóxico DS6-SPP-taxoide MM1-202

[00261] El DS6 se modificó con el enlazador 4-nitro-2-piridil-pentanoato de *N*-sulfosuccinimidilo (SSNPP). A 50 mg de Ab DS6 en tampón A al 90%, DMA al 10% se añadieron 10 equivalentes de SSNPP en DMA. La concentración final de Ab fue 8 mg/ml. La reacción se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente, después se purificó por cromatografía G25. El grado de modificación del anticuerpo se midió espectrofotométricamente usando la absorbancia a 280 nm (anticuerpo) y 325 (enlazador) y se descubrió que tenía 3,82 enlazadores/anticuerpo. La recuperación del anticuerpo fue de 43,3 mg dando un rendimiento del 87%. La conjugación de DS6-nitroSPP se hizo con taxoide MM1-202 (1812 P.16). La conjugación se realizó a una escala de 42 mg en tampón A al 90%, DM1 al 10%. El taxoide se añadió en 4 alícuotas de 0,43 equiv./enlazador (cada alícuota) durante un periodo de aproximadamente 20 horas. En este momento la reacción se había vuelto notablemente turbia. Después de la

purificación con G25, el conjugado resultante, recuperado en aproximadamente un 64% de rendimiento tenía aproximadamente 4,3 taxoides/Ab y aproximadamente 1 equivalente de enlazador sin reaccionar sobrante. Para inactivar el enlazador sin reaccionar, se añadió 1 equivalente de cisteína/enlazador sin reaccionar al conjugado con agitación durante una noche. Fue apreciable un matiz amarillento definido después de la adición de cisteína, lo que indica liberación de tiopiridina. La solución de reacción después se dializó en tampón B/Tween 20 al 0,01% seguido de diálisis adicional en tampón B solo durante varios días. El conjugado final tenía 2,86 fármacos/anticuerpo. La recuperación del anticuerpo fue de 14,7 mg, dando un rendimiento global del 35%. El conjugado además se caracterizó bioquímicamente por SEC y se descubrió que tenía un 89% de monómeros, un 10,5% de dímeros y un 0,5% de agregado de mayor peso molecular.

[00262] Se muestran los resultados de un análisis de citometría de flujo que compara la unión de DS6-SPP-taxoide MM1-202 frente al anticuerpo DS6 en células HeLa en la Figura 28. Los resultados indican que DS6 retiene la actividad de unión cuando se conjuga a un taxano.

LISTA DE SECUENCIAS

[00263]

<110> ImmunoGen, Inc.
 PAYNE, Gillian
 CHUN, Philip
 TAVARES, Daniel

<120> CONJUGADO CITOTÓXICO ESPECÍFICO PARA EL ANTÍGENO CA6 Y MÉTODOS PARA USAR EL MISMO

<130> F179122
 <150> 60/488.447
 <151> 21-07-2003
 <160> 63
 <170> PatentIn versión 3.2
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 1

 Ser Tyr Asn Met His
 1 5

<210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2

 Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly
 <210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3

 Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 4

 Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met His
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 5

Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 6

Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 7

10 <211> 321

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> exón

15 <222> (1)..(321)

<400> 7

caa att gtt ctc acc caa tct cca gca atc atg tct gca tct cca ggg 48
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

gag aag gtc acc ata acc tgc agt gcc cac tca agt gta agt ttc atg 96
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met
20 25 30

cac tgg ttc cag cag aag cca ggc act tct ccc aaa ctc tgg att tat 144
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

agc aca tcc agc ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc ggt ggc agt 192
Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser
50 55 60

gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc cga atg gag gct gaa 240
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

gat gct gcc act tat tac tgc cag caa agg agt agt ttc ccg ctc acg 288
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
85 90 95

ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgt 321
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 8

20 <211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo murino humanizado

25 <220>

<221> exón

<222> (1)..(321)

<400> 8

ES 2 360 403 T3

gag att gtt ctc acc cag tct cca gca acc atg tct gca tct cca ggg	48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Ala Ser Pro Gly	
1 5 10 15	
gag agg gtc acc ata acc tgc agt gcc cac tca agt gta agt ttc atg	96
Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met	
20 25 30	
cac tgg ttc cag cag aag cca ggc act tct ccc aaa ctc tgg att tat	144
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr	
35 40 45	
agc aca tcc agc ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc ggt ggc agt	192
Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser	
50 55 60	
gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc agc atg gag gct gaa	240
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu	
65 70 75 80	
gat gct gcc act tat tac tgc cag caa agg agt agt ttc ccg ctc acg	288
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr	
85 90 95	
ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgt	321
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg	
100 105	

5 <210> 9
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> exón
 <222> (1)..(351)
 10 <400> 9

cag gct tat ctc cag cag tct ggg gct gag ctg gtg agg tct ggg gcc	48
Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt acc agt tac	96
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
20 25 30	
aat atg cac tgg gta aag cag aca cct gga cag ggc ctg gaa tgg att	144
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga tat att tat cct gga aat ggt gct act aac tac aat cag aag ttc	192
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe	
50 55 60	
aag ggc aag gcc aca ttg act gca gac cca tcc tcc agc aca gcc tac	240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Pro Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg cag atc agc agc ctg aca tct gaa gac tct gcg gtc tat ttc tgt	288
Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys	
85 90 95	
gca aga gga gat tgc gtc ccg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctt	336
Ala Arg Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu	
100 105 110	
gtc act gtc tct gca	351
Val Thr Val Ser Ala	
115	

- 5 <210> 10
- <211> 351
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> secuencia de anticuerpo murino humanizado
- <220>
- 10 <221> exón
- <222> (1)..(351)
- <400> 10

cag gct cag ctc gtg cag tct ggg gct gag gtg gtg aag ccc ggg gcc	48
Gln Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt acc agt tac	96
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
20 25 30	
aat atg cac tgg gta aag cag aca cct gga cag ggc ctg gaa tgg att	144
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	

<400> 12

Gln Val Thr Ala Ile Pro Lys Pro Gly Gly Ala Ser Arg Glu Lys
 1 5 10 15

5 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

Glu Val Thr Ala Thr Pro Arg Pro Gly Gly Ala Ser Ser Glu Lys
 1 5 10 15

10 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 14

Glu Val Thr Gly Thr Pro Arg Pro Gly Gly Asp Ser Arg Glu Lys
 1 5 10 15

20 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15

Glu Val Thr Gly Thr Pro Arg Pro Gly Gly Asp Ser Arg Glu Lys
 1 5 10 15

25 <210> 16
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 16

Gln Tyr Gln Ala Leu Arg Ser Lys Lys Pro Gly Gln Gln Lys Lys Gly
 1 5 10 15

Pro Ser Ser Ser Glu Gln Ser
 20

30 <210> 17
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 17

Gln Gln Val Ala Val Lys Pro Lys Lys Pro Gly Gln Gln Lys Gln Gly
 1 5 10 15

Thr Ser Ser Ser Glu Gln Ser
 20

40 <210> 18
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

Gln Val Ala Val Lys Pro Lys Lys Pro Gly Gln Gln Lys Gln Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Glu Gln Ser
 20

5 <210> 19
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

Gln Val Ala Val Lys Pro Lys Lys Pro Gly Gln Gln Lys Gln Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Glu Gln Ser
 20

10 <210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 20

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
 1 5 10

15 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 20 <400> 21

Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn
 1 5 10

25 <210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 22

Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr
 1 5

30 <210> 23
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 23

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Pro
 85 90 95

<210> 24
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 24

5

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg

<210> 25
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR

10

15

<400> 25
 tatagagctc aagcttgat ggtggaaga tggatacagt tgggtc 46

<210> 26

	<211> 36		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> Cebador de PCR		
	<400> 26		
	ggagatcca tagacagatg ggggtgctgt tttggc	36	
10	<210> 27		
	<211> 32		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
15	<400> 27		
	gggagctcga yattgtgmts acmcarwctm ca	32	
20	<210> 28		
	<211> 32		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
25	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (18)..(18)		
	<223> n es a, c, g, o t		
	<400> 28		
30	cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc	32	
35	<210> 29		
	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
	<220>		
	<221> misc feature		
	<222> (18)..(18)		
40	<223> n es a, c, g, o t		
	<400> 29		
	cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg	35	
45	<210> 30		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador degenerado		
50	<400> 30		
	tttgaattc aataactaca ggtgtccact	30	
55	<210> 31		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador degenerado		
60	<400> 31		
	tttgagctc cagatttca gctcctgct	30	
65	<210> 32		
	<211> 40		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
	<400> 32		
70	cgatgggccc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccaga	40	
75	<210> 33		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		

	<400> 33 tttcgtacg ttcagctcc agcttggt	28	
5	<210> 34 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador de PCR		
10	<400> 34 caggtgtaca ctcccaggct tatctccagc agtct	35	
15	<210> 35 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador de PCR		
20	<400> 35 cgatgggccc ttggtggagg cggcagagac agtgaccaga	40	
25	<210> 36 <211> 56 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador de PCR		
30	<400> 36 caggtgtaca ctccgagatt gttctcacc agtctccagc aaccatgtct gcatct	56	
35	<210> 37 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador de PCR		
40	<400> 37 ggcactgcag gttatggga ccctctcccc tggaga	36	
45	<210> 38 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador de PCR		
50	<400> 38 caatcagcag catggaggct gaaga	25	
55	<210> 39 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador de PCR		
60	<400> 39 gcctccatgc tgctgattgt gaga	24	
65	<210> 40 <211> 67 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador de PCR <400> 40 caggtgtaca ctcccaggct cagctccagg tgctggggc tgagggtgtg aagcccggg cctcagt		60 67
70	<210> 41 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador de PCR		
75	<400> 41 ttgactgcag acacatcctc cagcaca	27	

<210> 42
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 42
 ggtctgcag tcaatgtggc ctggccctgg aactctgat 40

10 <210> 43
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador de PCR
 <400> 43
 cgatgggccc ttggtggagg cggcagagac agtgacaaga 40

20 <210> 44
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 44
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Phe Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Asn Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ser Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Ile Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

25 <210> 45
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 30 <220>
 <221> misc feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 45

Xaa Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Asn Ile
 20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ser Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Gly Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 46
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 46

5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Ser Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Thr Tyr Pro Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

10

<210> 47
 <211> 108

<212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 47

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Ile
 85 90 95

Thr Phe Gly Val Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

5
 <210> 48
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 10 <400> 48

Gln Ile Val Ser Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Arg Ser Tyr Met
 20 25 30

Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser Tyr Thr Phe Gly
 85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 49
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 49

5

Gln Thr Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Ile
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Ser Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Trp Ser Ser Lys Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

10

ES 2 360 403 T3

<210> 50
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 50

5

Gln Ser Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Ile Met Thr Cys Ser Pro Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Gly
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Phe Ser Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser His Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 51
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 51

10

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ala Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Thr
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ala Ser Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro
 85 90 95

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 52
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 52

5

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
 85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 100 105 110

<210> 53
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 53

10

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ala Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Glu Thr Ser Pro Lys Pro Trp
 35 40 45

Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Tyr Pro
 85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 54
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 54

5

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Lys Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 55
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 55

5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Arg Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ile Phe Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Gly Gly Ser Tyr Arg Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 56
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 56

10

Gln Gly Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

Trp Val Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Asn Lys Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Tyr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Gly Asn Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 57
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 57

5

ES 2 360 403 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

- <210> 58
- <211> 121
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 58

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Val Glu Leu Val Arg Ala Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn
 20 25 30

Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Asn Asn Pro Gly Asn Gly Tyr Ile Ala Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Glu Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Lys Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

- <210> 59
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 59

5

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Lys Thr Thr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 60
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 60

5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Gly Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly His Ser Tyr Tyr Phe Tyr Asp Gly Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 61
 <211> 124
 <212> PRT

ES 2 360 403 T3

<213> Mus musculus
<400> 61

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ala Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Gly Val Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Gly Lys Gly Tyr Leu Ser Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ala Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Phe Tyr Gly Gly Ser Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Phe Asp
 100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 62
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 62

ES 2 360 403 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 63
- <211> 116
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 63

5

ES 2 360 403 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

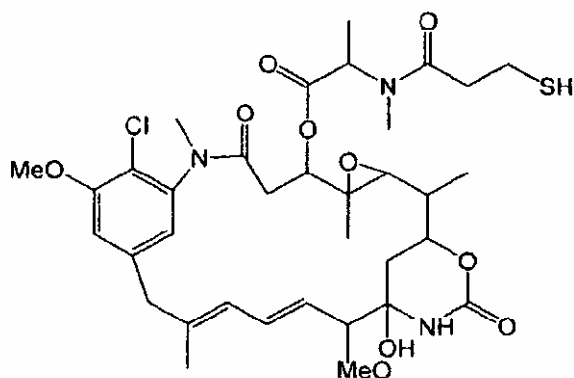
Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Asp Asp Asn Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val
 115

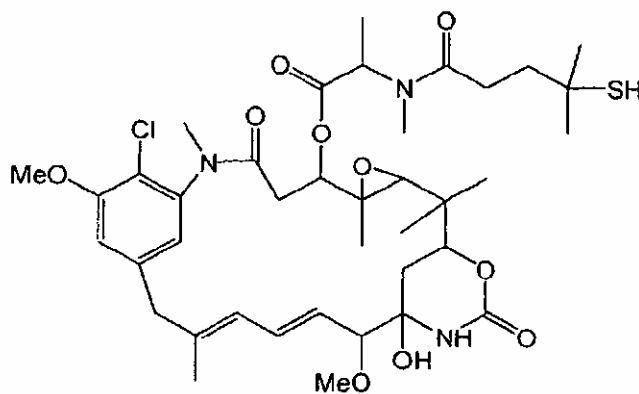
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo humanizado o fragmento de unión a epítopo del mismo que comprende al menos una región variable de cadena pesada al menos un 98% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 10 ó 11 y al menos una región variable de cadena ligera al menos un 98% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 8, en el que dicha al menos una región variable de cadena pesada o fragmento de la misma comprende tres regiones determinantes de complementariedad secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por las SEC ID N°: 1, 21 y 3, respectivamente y en el que dicha al menos una región variable de cadena ligera o fragmento de la misma comprende tres regiones determinantes de complementariedad secuenciales que tienen secuencias de aminoácidos representadas por las SEC ID N°: 4, 5 y 6 respectivamente.
- 10 2. El anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo de la reivindicación 1, en el que dicha región variable de cadena ligera o fragmento de la misma tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 8.
- 15 3. El anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo de la reivindicación 1, en el que dicha región variable de cadena pesada o fragmento de la misma tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:10 o la SEC ID N°:11.
- 20 4. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a epítopo del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.
- 25 5. Un polinucleótido que codifica una cadena ligera o pesada de un anticuerpo o un fragmento de unión a epítopo del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.
- 30 6. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4.
- 35 7. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 5.
- 40 8. El vector de la reivindicación 6, siendo dicho vector un vector de expresión que expresa dicho anticuerpo o fragmento de unión a epítopo.
- 45 9. El vector de la reivindicación 7, siendo dicho vector un vector de expresión que expresa dicho anticuerpo o fragmento de unión a epítopo.
- 50 10. Un conjugado citotóxico que comprende un agente de unión celular y un agente citotóxico, en el que dicho agente de unión celular comprende el anticuerpo humanizado o fragmento de unión a epítopo del mismo de las reivindicaciones 1-3.
- 55 11. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho agente de unión celular y dicho agente citotóxico están unidos covalentemente.
- 60 12. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho agente de unión celular y dicho agente citotóxico están unidos covalentemente a través de un grupo enlazador de PEG.
13. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho agente de unión celular y dicho agente citotóxico están unidos covalentemente a través de una funcionalidad tiol o disulfuro de dicho agente citotóxico.
14. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho fragmento de un anticuerpo se selecciona entre el grupo compuesto por un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fd, un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fv unido por disulfuro (sdFv) y un fragmento que comprende un dominio VL o VH.
15. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho agente citotóxico es un miembro seleccionado entre el grupo compuesto por un compuesto maitansinoide, un compuesto taxoide, un compuesto CC-1065, un compuesto de dolastatina, un compuesto de daunorrubicina, y un compuesto de doxorubicina.
16. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho agente citotóxico es la maitansina DM1 de fórmula (I):



(I).

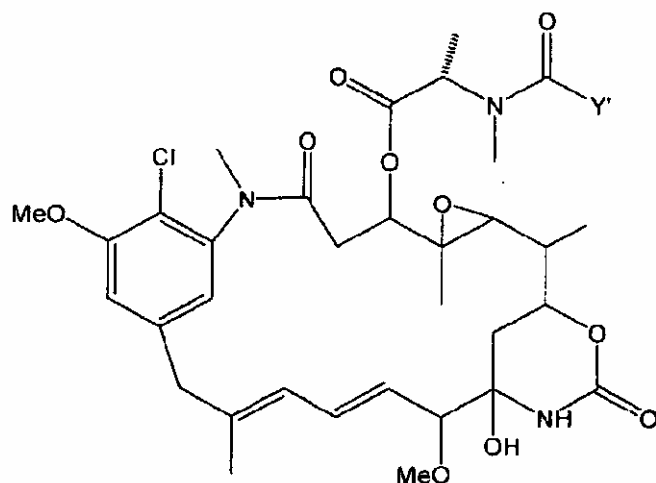
17. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho agente citotóxico es la maitansina DM4 de fórmula (II):



(II).

5

18. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho agente citotóxico es una maitansina de fórmula (III):



(III)

10

en la que:

Y' representa

$(CR_7CR_8)(CR_9=CR_{10})_pC=C_qAr(CR_5CR_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_rC=C_sB_t(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ$,

donde:

15

R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser H;

20

A, B, D son cicloalquilo o cicloalqueno que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁, y R₁₂ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en cualquier momento dado; y Z es H, SR o -COR, donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

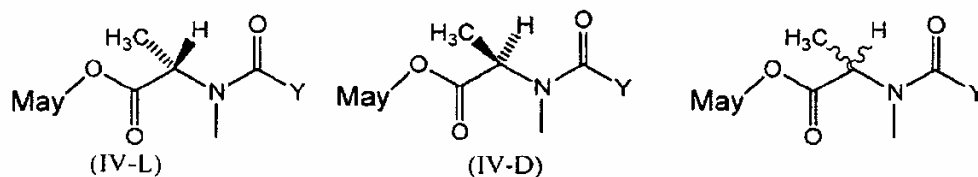
19. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 18, en el que R₁ es H, R₂ es metilo y Z es H.

20. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 18, en el que R₁ y R₂ son metilo y Z es H.

21. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 18, en el que R₁ es H, R₂ es metilo, y Z es -SCH₃.

22. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 18, en el que R₁ y R₂ son metilo, y Z es -SCH₃.

23. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho agente citotóxico es una maitansina seleccionada entre el grupo compuesto por las fórmulas (IV-L), (IV-D), y (IV-D,L):



(IV-D,L)

en las que:

Y representa (CR₇R₈)_l(CR₅R₆)_m(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ,

donde:

R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser H;

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0;

Z es H, SR o -COR donde R es alquilo o alqueno lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo; y

May representa un maitansinoide que alberga la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo o C-20 desmetilo.

24. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 23, en el que R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es H.

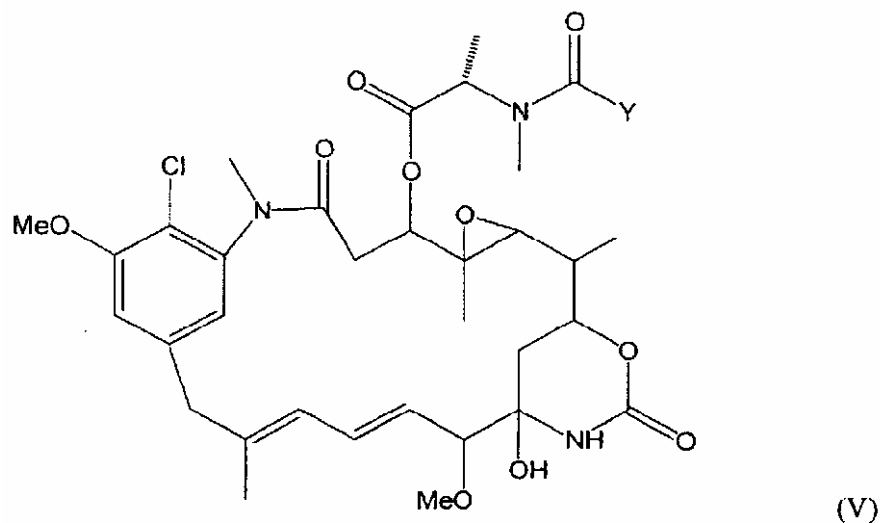
25. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 23, en el que R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es H.

26. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 23, en el que R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

27. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 23, en el que R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

28. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 23, en el que el agente citotóxico está representado por la fórmula (IV-L).

29. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho agente citotóxico es una maitansina de fórmula (V):



en la que:

Y representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

donde:

R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y

Z es H, SR o -COR, donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

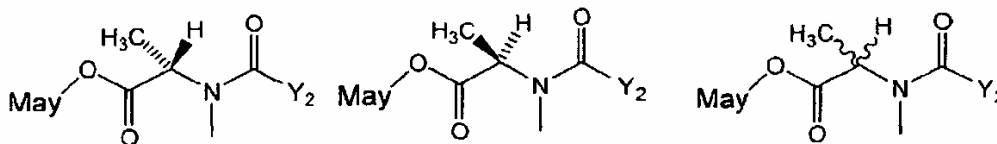
30. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 29, en el que R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H; l y m son cada uno 1; n es 0; y Z es H.

31. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 29, en el que R_1 y R_2 son metilo; R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1; n es 0; y Z es H.

32. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 29, en el que R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y 7, es $-SCH_3$.

33. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 29, en el que R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es $-SCH_3$.

34. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho agente citotóxico es una maitansina seleccionada entre el grupo compuesto por las fórmulas (VI-L), (VI-D), y (VI-D,L):



(VI-L)

(VI-D)

(VI-D, L)

en las que:

Y_2 representa $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

donde:

R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

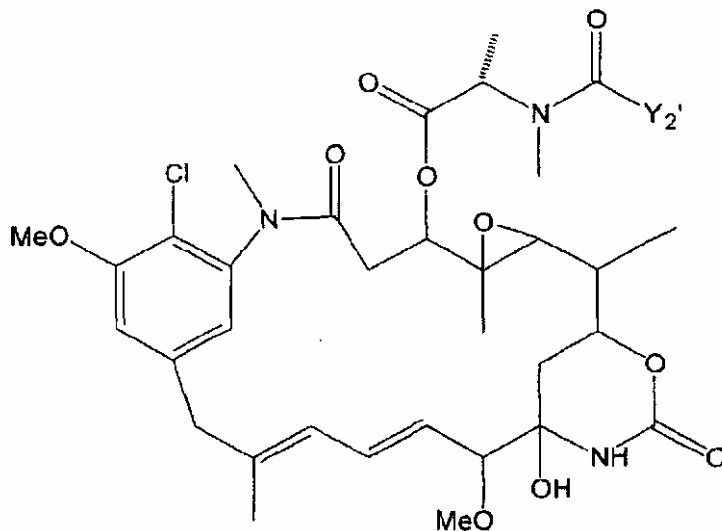
R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0;

Z_2 es SR o COR, donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o

alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo; y
May es un maitansinoide.

- 5 35. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho agente citotóxico es una maitansina de fórmula (VII):



(VII)

en la que:

Y_2' representa

$(CR_7R_8)(CR_9=CR_{10})_p(C=C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_t(C=C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

donde:

R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

A, B, y D cada uno independientemente es cicloalquilo o cicloalqueno que tiene 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

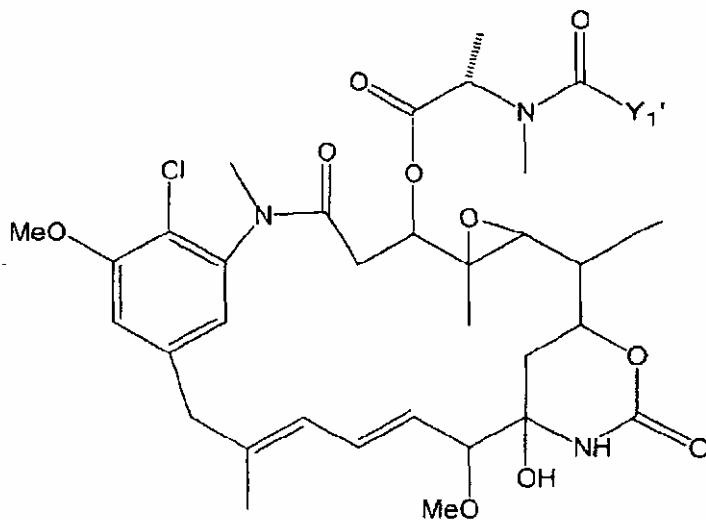
R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{11} , y R_{12} son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en cualquier momento dado; y

Z_2 es SR o -COR, donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene 3-10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

36. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 35, en el que R_1 es H y R_2 es metilo.

37. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho agente citotóxico es una maitansina de fórmula (VIII):



(VIII)

en la que:

Y₁' representa

(CR₇CR₈)_l(CR₉=CR₁₀)_p(C≡C)_qA_r(CR₅CR₆)_mD_u(CR₁₁=CR₁₂)_r(C≡C)_sB_t(CR₃CR₄)_nCR₁R₂S⁻,

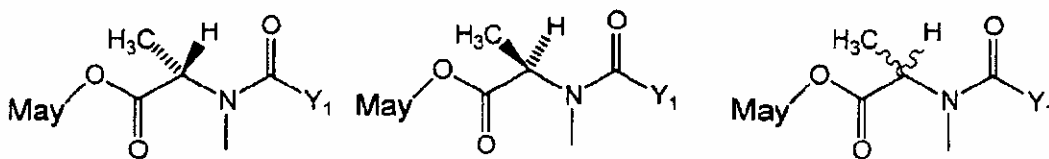
donde:

- 5 A, B, y D, cada uno independientemente es cicloalquilo o cicloalqueno que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;
 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁, y R₁₂ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo; y
 10 l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en cualquier momento dado.

38. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 37, en el que R₁ es H y R₂ es metilo.

15 39. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 37, en el que R₁ y R₂ son metilo.

40. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho agente citotóxico es una maitansina seleccionada entre el grupo compuesto por las fórmulas (IX-L), (IX-D), y (IX-D,L):



IX-L

IX-D

IX-D,L

20 en las que:

Y₁ representa (CR₇R₈)_l(CR₅R₆)_m(CR₃R₄)_nCR₁R₂S⁻,

donde:

- 25 R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser H;
 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;
 30 l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y
 May representa un maitansinol que alberga la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo o C-20 desmetilo.

35 41. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 40, en el que R₁ es H y R₂ es metilo o R₁ y R₂ son metilo.

42. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 40, en el que R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H; l y m son cada uno 1; n es 0.

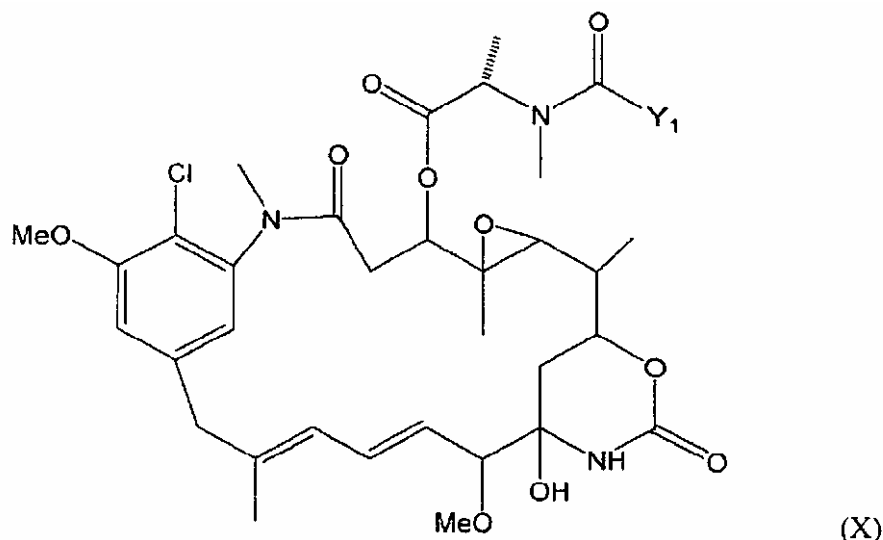
40 43. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 40, en el que R₁ y R₂ son metilo; R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H; l y m son 1; n es 0.

44. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 41, en el que el maitansinoide está representado por la fórmula (IX-L).

45 45. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 42, en el que el maitansinoide está representado por la fórmula (IX-L).

46. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 43, en el que el maitansinoide está representado por la fórmula (IX-L).

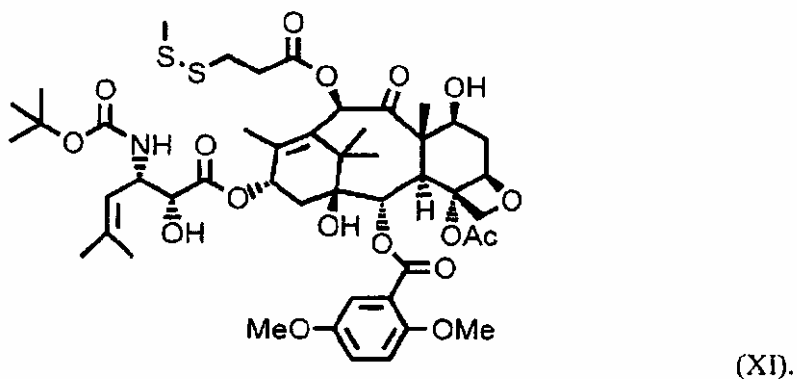
50 47. El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 15, en que dicho agente citotóxico es una maitansina de fórmula (X):



en la que:

Y_1 representa $(CR_7R_8)(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$,
donde:

- 5 R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;
- 10 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;
- l , m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y
- May representa un maitansinol que alberga la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo o C-20 desmetilo.
- 15 **48.** El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 47, en el que R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H; l y m son cada uno 1, y n es 0.
- 49.** El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 47, en el que R_1 y R_2 son metilo; R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H; l y m son 1; y n es 0.
- 20 **50.** El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho agente citotóxico es DM1 o DM4.
- 51.** El conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho agente citotóxico es el taxano de fórmula (XI):



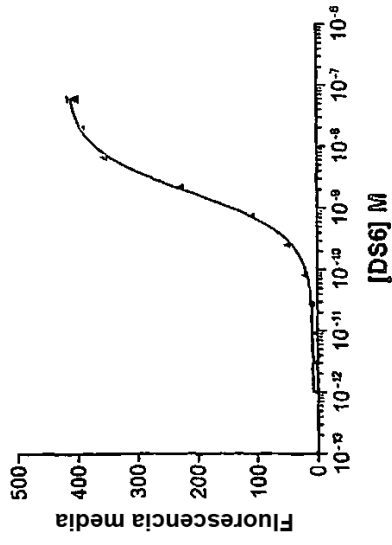
- 25 **52.** Un método in vitro para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glucótopo CA6, que comprende poner en contacto una célula que expresa el glucótopo CA6 con el conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 10.
- 30 **53.** El método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glucótopo CA6 de acuerdo con la reivindicación 52, en el que el conjugado citotóxico comprende una versión humanizada del anticuerpo murino DS6 o un fragmento de unión a epítipo del mismo como agente de unión celular y DM1 o DM4 como agente citotóxico.
- 35 **54.** El método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glucótopo CA6 de acuerdo con la reivindicación 52, en el que el conjugado citotóxico comprende una versión humanizada del anticuerpo

murino DS6 o un fragmento de unión a epítipo del mismo como agente de unión celular y un taxano como agente citotóxico.

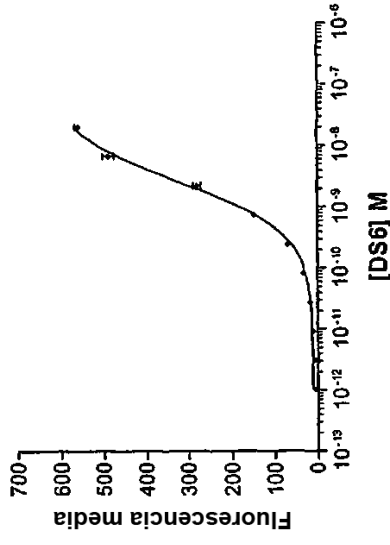
- 5 **55.** El método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glucótopo CA6 de acuerdo con la reivindicación 52, en el que dicha inhibición del crecimiento provoca la muerte de la célula.
- 56.** El método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glucótopo CA6 de acuerdo con la reivindicación 52, en el que dicho método se realiza ex vivo.
- 10 **57.** Una composición terapéutica, que comprende un conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 10 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 58.** La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 57, en la que el conjugado citotóxico comprende una versión humanizada del anticuerpo murino DS6 o un fragmento de unión a epítipo del mismo como agente de unión celular y DM1 o DM4 como agente citotóxico.
- 15 **59.** La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 57, en la que el conjugado citotóxico comprende una versión humanizada del anticuerpo murino DS6 o un fragmento de unión a epítipo del mismo como agente de unión celular y un taxano como agente citotóxico.
- 20 **60.** Uso de la composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 57, en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer.
- 61.** La composición terapéutica de la reivindicación 57, para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 25 **62.** El uso o composición de las reivindicaciones 60 y 61, en el que el conjugado citotóxico comprende una versión humanizada del anticuerpo murino DS6 o un fragmento de unión a epítipo del mismo como agente de unión celular y DM1 o DM4 como agente citotóxico.
- 30 **63.** El uso o composición de las reivindicaciones 60 y 61, en el que el conjugado citotóxico comprende una versión humanizada del anticuerpo murino DS6 o un fragmento de unión a epítipo del mismo como agente de unión celular y un taxano como agente citotóxico.
- 35 **64.** El uso o composición de las reivindicaciones 60 y 61, en el que el cáncer es uno en el que se expresa o sobre-expresa el glucótopo CA6.
- 65.** El uso o composición de las reivindicaciones 60 y 61, en el que el cáncer se selecciona entre el grupo compuesto por carcinoma de ovario seroso, carcinoma de ovario endometriode, neoplasma del cuello del útero, neoplasma del endometrio, neoplasma de la vulva, carcinoma de mama, tumor pancreático, y tumor del urotelio.
- 40 **66.** Un kit que comprende un conjugado citotóxico de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende adicionalmente:
a) un compartimiento que comprende el conjugado citotóxico.
- 45 **67.** El kit de acuerdo con la reivindicación 66, en el que dicho conjugado citotóxico comprende una versión humanizada del anticuerpo murino DS6 o un fragmento de unión a epítipo del mismo como agente de unión celular y DM1 o DM4 como agente citotóxico.
- 50 **68.** El kit de acuerdo con la reivindicación 66, en el que dicho conjugado citotóxico comprende una versión humanizada del anticuerpo murino DS6 o un fragmento de unión a epítipo del mismo como agente de unión celular y un taxano como agente citotóxico.
- 55 **69.** Un kit que comprende una composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 57, que comprende adicionalmente:
a) un compartimiento que comprende la composición terapéutica.
- 70.** El kit de acuerdo con la reivindicación 69, en el que el conjugado citotóxico de la composición terapéutica comprende una versión humanizada del anticuerpo murino DS6 o un fragmento de unión a epítipo del mismo como agente de unión celular y DM1 o DM4 como agente citotóxico.
- 60 **71.** El kit de acuerdo con la reivindicación 69, en el que el conjugado citotóxico de la composición terapéutica comprende una versión humanizada del anticuerpo murino DS6 o un fragmento de unión a epítipo del mismo como agente de unión celular y un taxano como agente citotóxico.

Figura 1

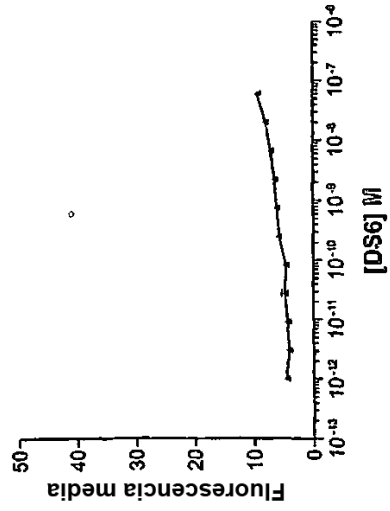
A. Caov-3



B. T-47D



C. SK-OV-3



D. Colo205

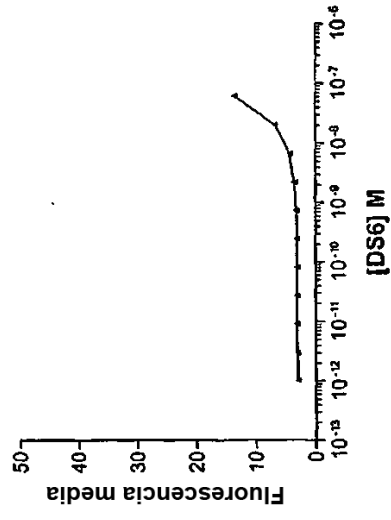


Figura 2

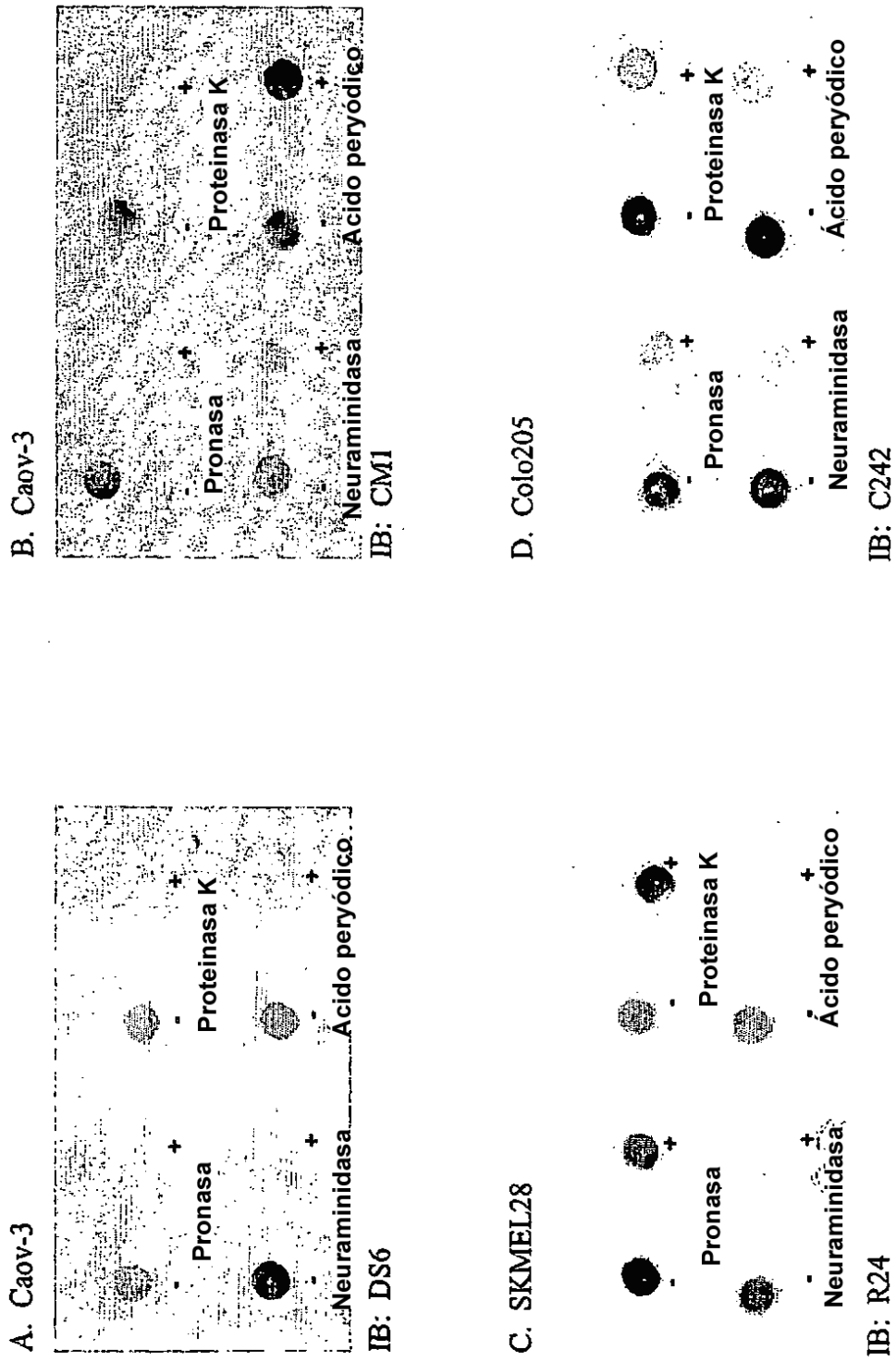


Figura 3

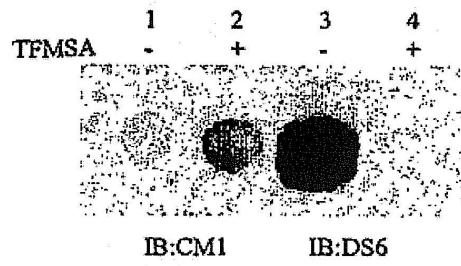


Figura 4

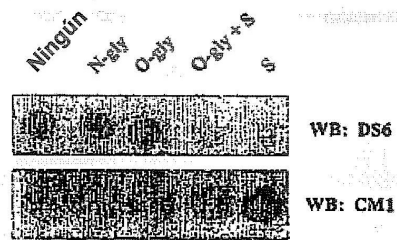


Figura 5

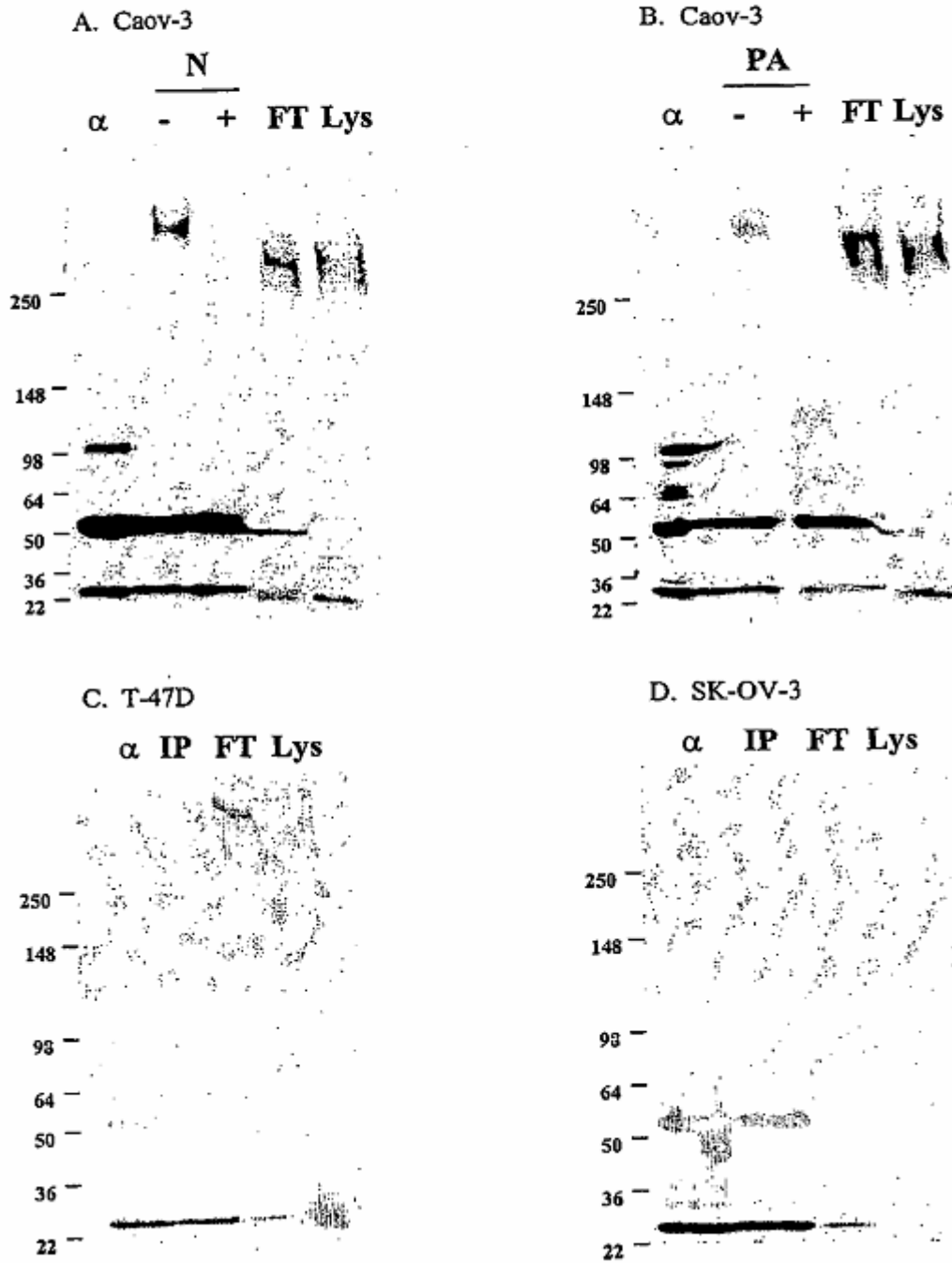


Figura 5 cont.

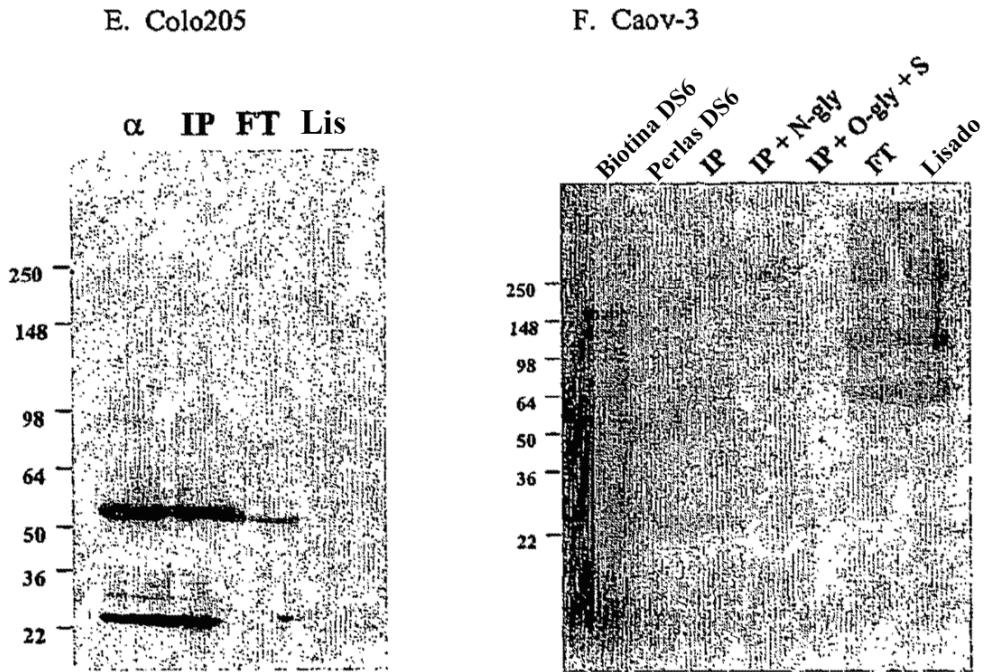
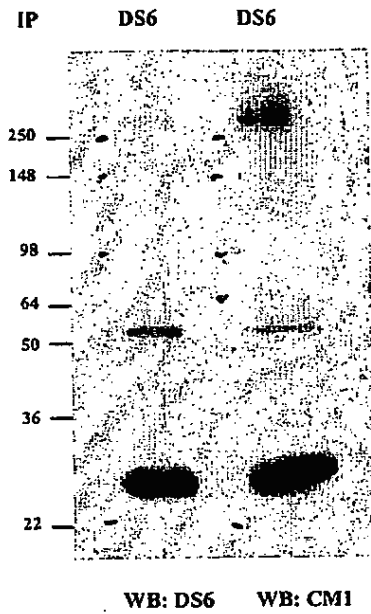


Figura 6

A. Caov-3



B. HeLa

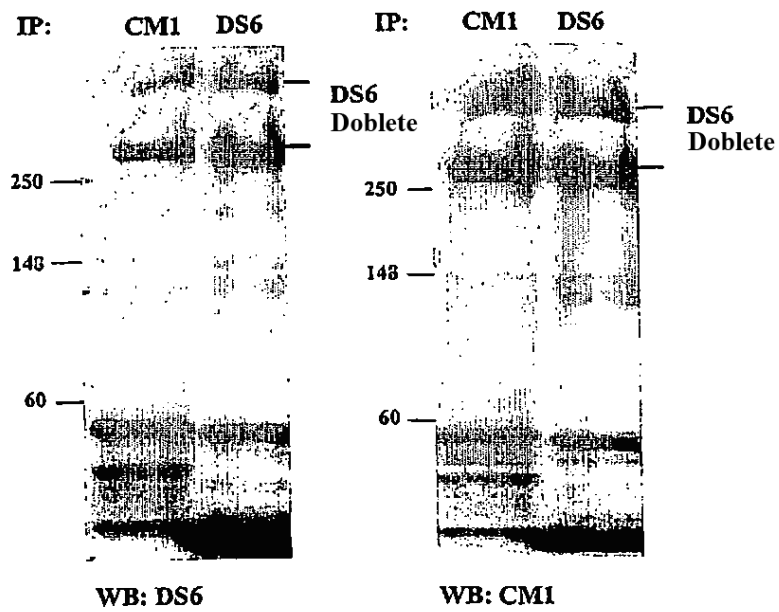
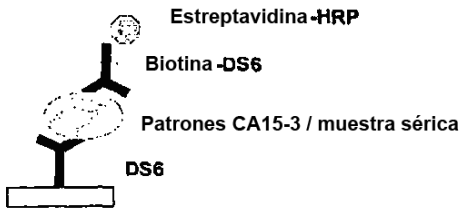


Figura 7

Antígeno circulante

A.



B.

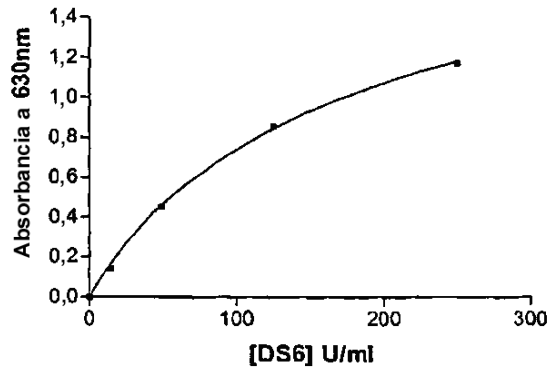
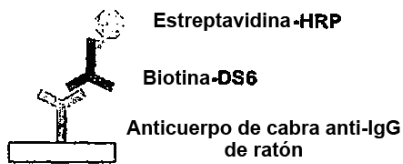
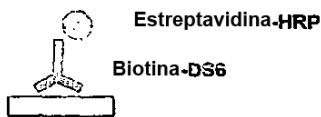


Figura 8

A. Patrón 1



B. Patrón 2



C. Curva patrón de detección de anticuerpo

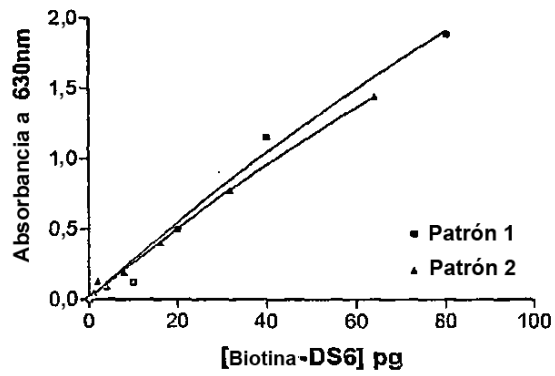


Figura 9

A. Cadena ligera - SEC ID N°:7

Q I V L T Q S P A I M S A S P G E
 1 CAAATGTTTC TCACCCAGTC TCCAGCAATC ATGTCTGCAT CTCCAGGGGA

CDR1
 K V T I T C S A H S S V S F M H
 51 GAAGGTCACC ATAACCTGCA GTGCCCACTC AAGTGTAAGT TTCATGCACT

W F Q Q K P G T S P K L W I Y S T
 101 GGTCCAGCA GAAGCCAGGC ACTTCTCCA AACTCTGGAT TTATAGCACA

CDR2
 S S L A S G V P A R F G G S G S G
 151 TCCAGCCTGG CTTCTGGAGT CCCTGCTCGC TTCGGTGGCA GTGGATCTGG

T S Y S L T I S R M E A E D A A
 201 GACCTCTTAC TCTCTCACAA TCAGCCGAAT GGAGGCTGAA GATGCTGCCA

CDR3
 T Y Y C Q Q R S S F P L T F G A G
 251 CTTATTACTG CCAGCAAAGG AGTAGTTTCC CGCTCACGTT CGGTGCTGGG

T K L E L K R
 301 ACCAAGCTGG AGCTGAAACG T

B. Cadena pesada - SEC ID N°:9

Q A Y L Q Q S G A E L V R S G A S
 1 CAGGCTTATC TCCAGCAGTC TGGGGCTGAG CTGGTGAGGT CTGGGGCCCTC

CDR1
 V K M S C K A S G Y T F T S Y N
 51 AGTGAAGATG TCCTGCAAGG CTTCTGGCTA CACATTTACC AGTTACAATA

M H W V K Q T P G Q G L E W I G Y
 101 TGCCTGGGT AAAGCAGACA CCTGGACAGG GCCTGGAATG GATTGGATAT

CDR2
 I Y P G N G A T N Y N Q K F K G K
 151 ATTTATCCTG GAAATGGTGC TACTAACTAC AATCAGAAGT TCAAGGGCAA

A T L T A D P S S S T A Y M Q I
 201 GGCCACATG ACTGCAGACC CATCCTCCAG CACAGCCTAC ATGCAGATCA

S S L T S E D S A V Y F C A R G D
 251 GCAGCCTGAC ATCTGAAGAC TCTGCGGTCT ATTTCTGTGC AAGAGGAGAT

CDR3
 S V P F A Y W G Q G T L V T V S A
 301 TCGGTCCCGT TTGCTTACTG GGGCCAAGG ACTCTTGTC A CTGTCTCTGC A

Figura 10

A. Cadena ligera

CDR1: S A H S S V S F M H - SEC ID N°: 4

CDR2: S T S S L A S - SEC ID N°: 5

CDR3: Q Q R S S F P L T - SEC ID N°: 6

B. Cadena pesada

CDR1: S Y N M H - SEC ID N°: 1

CDR2: Y I Y P G N G A T N Y N Q K F K G - SEC ID N°: 2

CDR3: G D S V P F A Y - SEC ID N°: 3

C. Cadena pesada AbM

CDR1: G Y T F T S Y N M H - SEC ID N°: 20

CDR2: Y I Y P G N G A T N - SEC ID N°: 21

CDR3: G D S V P F A Y - SEC ID N°: 22

Figura 11

<i>Cadena ligera</i>	
	1 50
IgVKap4 (1)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQOKPGTSPKLWIYST
muDS6LC (1)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAHSVSEFMHWFQOKPGTSPKLWIYST
	51 95
IgVKap4 (51)	SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYP
muDS6LC (51)	SSLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFPL
<i>Cadena pesada</i>	
	1 50
IgVh J558.41 (1)	QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY
muDS6HC (1)	QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY
	51 98
IgVh J558.41 (51)	IYPGNGGTNYNQKFKGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCAR
muDS6HC (51)	IYPGNGGTNYNQKFKGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCAR

Figura 12

Las diez secuencias de cadena ligera más homólogas con las estructuras		
	1	60
muDS6LC	(1)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAHS--SVSFMHWFQKPGTSPKLWIYSTSSLASGVP
lfor	(1)	QIVLTQSPAIMSAFPGEKVTITCSATS--SVNYMHWFQKPGTSPKLWIYSSNLASGVP
lpsk	(1)	XIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASS--SVSNHWFQKPGTFPKLWIYSTSTLASGVP
layl	(1)	DIQMTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASS--SVSYMYWYQKPGSSPRLLIYDSTNLASGVP
lbaf	(1)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASS--SVYYMYWYQKPGSSPRLLIYDSTNLASGVP
lmim	(1)	QIVTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSRS---YMQWYQKPGTSPKRWIYDTSKLASGVP
lclo	(1)	QTVLSQSPAILLSASPGEKVTMTCRASS--SVTYIHWFYQKPGSSPKSWIYATSNLASGVP
la6t	(1)	QSVLSQSPAILLSASPGEKVTMTCSASS--SVSYMQWYQKPGSSPKPWIYSTSNLASGVP
lfig	(1)	ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMACRASSSVSSTYLHWYQKQKSGASPKLLIYSTSNLASGVP
l5c8	(1)	DIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSNLHWYQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVP
liai	(1)	DIQLTQSPAFMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQKSETSPKPWIYGTSNLASGVP
	61	111
muDS6LC	(59)	ARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEADAATYYCQQRSSFP-LTFGAGTKLELK-- (SEC ID N°: 7)
lfor	(59)	ARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEADAATYYCQQRSSYP-ITFGSGTKLEIKR- (SEC ID N°: 44)
lpsk	(59)	GRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEADAATYYCQQRSGYP-FTFGSGTKLEIKR- (SEC ID N°: 45)
layl	(59)	VRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEADAATYYCQWSTYP-LTFGAGTKLELKR- (SEC ID N°: 46)
lbaf	(59)	VRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEADAATYYCQWSSYPPIITFGVGTKELELKR- (SEC ID N°: 47)
lmim	(59)	ARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEADAATYYCHORSS---YTFGGTKLEIKR- (SEC ID N°: 48)
lclo	(59)	ARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEADAATYYCQHWSSKP-PTFGGTKLEIKR- (SEC ID N°: 49)
la6t	(59)	GRFSGSGSGTSYSLTISGVEAEADAATYYCQYSSHP-LTFGGTKLELKR- (SEC ID N°: 50)
lfig	(61)	ARFSGSGSGTSYSLTISVEAEADAATYYCQYSGYP-LTFGAGTKLELKR- (SEC ID N°: 51)
l5c8	(61)	ARFSGSGSGTSYSLTISMEAEADAATYYCHQYHRSP-YTFGGTKLEIKRA (SEC ID N°: 52)
liai	(61)	VRFSGSGSGTSYSLTISMEAEADAATYYCQWNSYP-YTFGGTKLEIKR- (SEC ID N°: 53)
Las diez secuencias de cadena pesada más homólogas con las estructuras		
	1	70
muDS6HC	(1)	QAYLQQSGAELVRGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWKQTPGQGLEWIGYIYPNGATNYNQKFRGKATL
1PLG	(1)	QIQQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYIHWVKQRPGEGLWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL
1NMB	(1)	QVQLQQPGAELVKPGASVVMKASGYTFTNINMYWVKQSPGQGLEWIGIFYPNGDTSYNQKFKDKATL
1FOR	(1)	QQQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSFWVNVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDNKYNKFKGKATL
1NQB	(1)	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYNMHWKQRPGRGLEWIGRIIDPNSGGTKYNEKFKGKATL
6FAB	(1)	EVQLQQSGVELVRAGSVMKMSCKASGYTFTSNGINWVKQRPQGLEWIGYNNPNGNYIAYNEKFRGKATL
1AE6	(1)	QIQQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYINWVKQRPQGLEWIGWIDPNSGNTKYNEKFKGKATL
1D5B	(1)	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKATGYTFTSYNHWKQRPGRGLEWIGIILPNSGGTKYNEKFKGKATL
1FAI	(1)	QVQLQQSGAELVRAGSVMKMSCKASGYTFTSYGVNWKQRPQGLEWIGYINPGKGYLSYNEKFKGKATL
1MLB	(1)	QVQLQESGAELVKPGASVKISCKATGYTFTSYNHWKQRPGRGLEWIGIILPNSGGTKYNEKFKGKATL
1JHL	(1)	QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPQGLEWIGNIYPSDSYTNYNQKFKDKATL
	71	124
muDS6HC	(71)	TADPSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGDSVP-----FA-YWGQGLTVTVSA (SEC ID N°: 9)
1PLG	(71)	TVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGGK-----FAMDYWGQGSTVTVSS (SEC ID N°: 54)
1NMB	(71)	TADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSGGSYRY--DGGFDYWGQGTTLTVSS (SEC ID N°: 55)
1FOR	(71)	TADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSGN-Y----PYAMDYWGQGSTVTVSS (SEC ID N°: 56)
1NQB	(71)	TVDRPSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARYDYGS----SYFDYWGQGSTVTVSS (SEC ID N°: 57)
6FAB	(71)	TVDRSSSTAYMQLRSLTSEDSAVYFCARSEYYG---GSYKFDYWGQGTTLTVSS (SEC ID N°: 58)
1AE6	(71)	TVDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCAREKTTY----YAMDYWGQGSTVTVSA (SEC ID N°: 59)
1D5B	(71)	TADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARHSSYFY--DG--DYWGQGSTVTVSS (SEC ID N°: 60)
1FAI	(71)	TVDRSSSTAYMQLRSLTSEDAVYFCARSFYGGSDLAHYFDSWGQGTTLTVSS (SEC ID N°: 61)
1MLB	(71)	TADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGDNGY-----YWGQGTTLTVSS (SEC ID N°: 62)
1JHL	(71)	TVDRSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARTRDDNYG-----AMDYWGQGTTVTV-- (SEC ID N°: 63)

Figura 13

A. Cálculos de superficie de la cadena ligera de muDS6

25-35	% acc. prom.	>30	25-35	flanq.	sup.	N° Kabat	N° SR	sup. SR	sec.	% acc. prom.	>30	25-35	flanq.	sup.	N° Kabat	N° SR	sup. SR
O	53,59	1			1	1	2	2	P	19,01					59	66	
I	4,63					2	3		A	47,39	60			60	60	67	67
V	35,63	3			3	3	4	4	R	15,49					61	68	
L	4,02					4	5		F	2,19					62	69	
T	30,41	5	???	33.144	5	5	6	6	G	25,02		???	0		63	70	
Q	7,10					6	7		G	7,03					64	71	
S	29,08		???	29.604		7	8		S	26,00		???	28.46 2		65	72	
P	21,80					8	9		G	19,35					66	73	
A	31,98	9	???	31.567	9	9	10	10	S	38,04	67			67	67	74	74
I	37,67	10			10	10	11	11	G	17,95					68	75	
M	14,99					11	12		T	24,68					69	76	
S	27,16		???	26.2		12	13		S	28,93		???	28.05 9		70	77	
A	1,99					13	14		Y	1,55					71	78	
S	17,20					14	15		S	12,99					72	79	
P	34,43	15	???	33.573	15	15	16	16	L	0,03					73	80	
G	23,43					16	17		T	10,88					74	81	
E	25,59		???	25.601		17	18		I	0,06					75	82	
K	45,67	18			18	18	19	19	S	24,84					76	83	
V	2,97					19	20		R	32,14	77	???	46.08 7	77	77	84	84
T	28,62		???	26.845		20	21		M	0,67					78	85	
I	0,79					21	22		E	24,97					79	86	
T	20,78					22	23		A	30,52	80	???	27.85		80	87	
C	0,13					23	24		E	36,62	81			81	81	88	88
S	25,81		???			24	25		D	1,24					82	89	
A	3,25					25	26		A	17,79					83	90	
H	31,44	26	???			26	27		A	3,37					84	91	
S	28,15		???			27	28		T	11,19					85	92	
S	33,75	27A	???			27A	29		Y	0,05					86	93	
V	5,59					27B	30		Y	4,28					87	94	
S	32,25	27C	???			27C	31		C	0,04					88	95	
	8,34					27D	32		Q	1,16					89	96	
	3,70					27E	33		Q	0,23					90	97	
	0,00					27F	34		R	16,47					91	98	
	0,00					28	35		S	22,54					92	99	
	0,00					29	36		S	23,05					93	100	
	0,00					30	37			3,13					94	101	
	0,00					31	38			0,89					95	102	
F	22,65					32	39		F	22,65					95E	107	
M	0,10					33	40		P	9,70					95F	108	
H	2,63					34	41		L	6,52					96	109	
W	0,30					35	42		T	11,97					97	110	
F	1,13					38	43		F	6,15					98	111	
Q	3,34					37	44		G	1,68					99	112	
Q	8,68					38	45		A	28,73		???	20.74		100	113	
K	22,43					39	46		G	4,48					101	114	
P	50,62	40			40	40	47	47	T	0,10					102	115	
G	44,24	41			41	41	48	48	K	29,39		???	29.57 3		103	116	
T	25,08		???	29.575		42	49		L	1,15					104	117	
S	15,21					43	50		E	27,47		???	27.17		105	118	
P	2,58					44	51		L	21,66					106	119	
K	27,85		???	29.675		45	52		K	35,78	107			107	107	121	121
L	9,44					46	53										
W	5,39					47	54										
I	0,34					48	55										
Y	17,69					49	56										
S	13,01					50	57										
T	5,88					51	58										
S	29,44		???			52	59										
S	28,16		???			53	60										
L	22,15					54	61										
A	9,23					55	62										
S	51,26	56				56	63										
G	38,57	57			57	57	64	64									
V	8,78					58	65										

B. Cálculos de superficie de la cadena pesada de muDS6

sec.	% acc. prom.	>30	25-35	flanq.	sup.	Nº Kabat	Nº SR	sup. SR	sec.	% acc. prom.	>30	25-35	flanq.	sup.	Nº Kabat	Nº SR	sup. SR
Q	64,68	1			1	1	2	2	K	39,08	64			64	64	70	70
A	15,65					2	3		G	39,4	65			65	65	71	71
Y	31,88	3	??*	31.88	3	3	4	4	K	16,66				66	66	72	
L	4,156					4	5		A	2,096				67	67	73	
Q	29,83		??*	30.16	5	5	6	6	T	25,55		??*	28.08	68	68	74	
Q	5,146					6	7		L	3,639				69	69	75	
S	21,64					7	8		T	25,85		??*	29.56	70	70	76	
G	20,31					8	9		A	13,24				71	71	77	
A	36,19	9			9	9	10	10	D	21,35				72	72	78	
E	21,29					10	11		P	36,15	73			73	73	79	79
L	49,11	11			11	11	12	12	S	48,82	74			74	74	80	80
V	10,25					12	13		S	24,62				75	75	81	
R	50,21	13			13	13	14	14	S	15,41				76	76	82	
S	34,2	14	??*	34.2	14	14	15	15	T	5,116				77	77	83	
G	29,89		??*	29.73		15	16		A	0,488				78	78	84	
A	18,34		??*	27.08		16	17		Y	15,94				79	79	85	
S	25,54					17	18		M	0,282				80	80	86	
V	4,2					18	19		Q	22,29				81	81	87	
K	36,48	19			19	19	20	20	I	1,738				82	82	88	
M	0,813					20	21		S	20,72				82A	82A	89	
S	13,11					21	22		S	31,21	82B	??*	31.18	82B	82B	90	90
C	0,529					22	23		L	0,63				82C	82C	91	
K	29,41		??*	31.16	23	23	24	24	T	26,26		??*	26.39	83	83	92	
A	3,823					24	25		S	35,72	84			84	84	93	93
S	21,79					25	26		E	38,86	85			85	85	94	94
G	26,57		??*			26	27		D	3,913				86	86	95	
Y	13,69					27	28		S	14,42				87	87	96	
T	34,52	28	??*			28	29		A	2,998				88	88	97	
F	3,192					29	30		V	16,13				89	89	98	
T	22,22					30	31		Y	1,019				90	90	99	
S	28,17		??*			31	32		F	2,811				91	91	100	
Y	0					32	33		C	0				92	92	101	
N	0					33	34		A	0,198				93	93	102	
M	14,35					34	35		R	5,789				94	94	103	
H	11,38					35	36		G	2,404				95	95	104	
	0,63					35A	37		D	15,92				96	96	105	
	1,018					35B	38		S	25,28		??*		97	97	106	
W	0,18					36	39		V	29,64		??*		98	98	107	
V	0,5					37	40		P	23,57				99	99	108	
K	5,459					38	41			18,79				100	100	109	
Q	10,08					39	42			12,87				100A	100A	110	
T	22,08					40	43			10,47				100B	100B	111	
P	46,17	41			41	41	44	44		2,039				100C	100C	112	
G	43,05	42			42	42	45	45		2,919				100D	100D	113	
Q	42,17	43			43	43	46	46		0,252				100E	100E	114	
G	11,9					44	47			0,522				100F	100F	115	
L	6,039					45	48			0				100G	100G	116	
E	19,21					48	49			0				100H	100H	117	
W	1,433					47	50		F	0,721				101	101	120	
I	0,123					48	51		A	12,13				102	102	121	
G	0					49	52		Y	24,24				103	103	122	
Y	4,983					50	53		W	7,003				104	104	123	
I	2,466					51	54		G	1,847				105	105	124	
Y	13,72					52	55		Q	36,46	106			106	106	125	125
P	2,189					52A	56		G	7,55				107	107	126	
	22,06					52B	57		T	1,038				108	108	127	
	39,1	52C				52C	58		L	25,8		??*	25.8	109	109	128	
G	25,76		??*			53	59		V	1,059				110	110	129	
N	0					54	60		T	25,56		??*	26.55	111	111	130	
G	0					55	61		V	7,217				112	112	131	
A	31,16	56	??*			56	62		S	41,68	113			113	113	132	132
T	22,29					57	63		A								
N	21,14					58	64										
Y	14,28					59	65										
N	6,902					60	66										
Q	47,15	61			61	61	67	67									
K	43,58	62			62	62	68	68									
F	4,24					63	69										

Figura 14

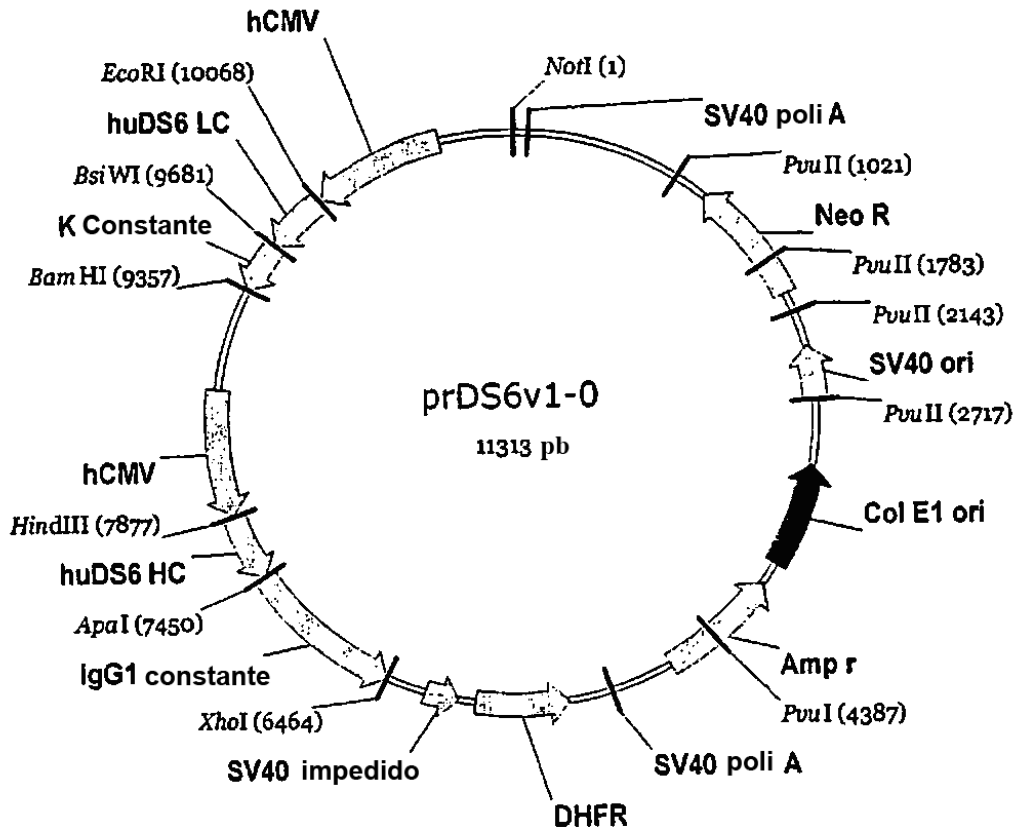


Figura 15

A. Secuencia de aminoácidos de cadena ligera (la variabilidad de restos murinos y humanos está sombreada)

N° Kabat	1	51
muDS6LC	QIVLTQSPATMSASPGERVTITCSAHSSVSFMHWFQOKPGTSPKLWIYST	
huDS6LC v1.0	EIVLTQSPATMSASPGERVTITCSAHSSVSFMHWFQOKPGTSPKLWIYST	
huDS6LC v1.2	EIVLTQSPATMSASPGERVTITCSAHSSVSFMHWFQOKPGTSPKLWIYST	
N° Kabat	52	101
muDS6LC	SSLASGVPARFGGSGSGTSSYSLTISSEMEADAATYYCQQRSSFPLTFGAG	
huDS6LC v1.0	SSLASGVPARFGGSGSGTSSYSLTISSEMEADAATYYCQQRSSFPLTFGAG	
huDS6LC v1.2	SSLASGVPARFGGSGSGTSSYSLTISSEMEADAATYYCQQRSSFPLTFGAG	
N° Kabat	102	
muDS6LC	TKLELKR - SEC ID N°: 7	
huDS6LC v1.0	TKLELKR - SEC ID N°: 8	
huDS6LC v1.2	TKLELKR - SEC ID N°: 8	

B. Secuencia de aminoácidos de cadena pesada (la variabilidad de restos murinos y humanos está sombreada)

N° Kabat	1	50
muDS6HC	QAVLQSGAEIVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY	
huDS6HC v1.0	QAVLQSGAEIVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY	
huDS6HC v1.2	QAVLQSGAEIVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY	
N° Kabat	51	96
muDS6HC	IYPNGATNYNQKFKGKATLTADPSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGD	
huDS6HC v1.0	IYPNGATNYNQKFKGKATLTADPSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGD	
huDS6HC v1.2	IYPNGATNYNQKFKGKATLTADPSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGD	
N° Kabat	97	114
muDS6HC	SVPFAYWGQGLVTVSA - SEC ID N°: 9	
huDS6HC v1.0	SVPFAYWGQGLVTVSA - SEC ID N°: 10	
huDS6HC v1.2	SVPFAYWGQGLVTVSA - SEC ID N°: 11	

Figura 16

Cadena ligera de huDS6 (v1.0 y v1.2) - SEC ID N°: 8

```

      E I V L T Q S P A T M S A S P G E
1  GAGATTG TTC TCACCCAGTC TCCAGCAACC ATGTCTGCAT CTCCAGGGGA

      R V T I T C S A H S S V S F M H
51 GAGGGTCACC ATAACCTGCA GTGCCCACTC AAGTGTAAGT TTCATGCACT

      W F Q Q K P G T S P K L W I Y S T
101 GGTCCAGCA GAAGCCAGGC ACTTCTCCCA AACTCTGGAT TTATAGCACA

      S S L A S G V P A R F G G S G S G
151 TCCAGCCTGG CTTCTGGAGT CCCTGCTCGC TTCGGTGGCA GTGGATCTGG

      T S Y S L T I S S M E A E D A A
201 GACCTCTTAC TCTCTCACAA TCAGCAGCAT GGAGGCTGAA GATGCTGCCA

      T Y Y C Q Q R S S F P L T F G A G
251 CTTATTACTG CCAGCAAAGG AGTAGTTTCC CGCTCACGTT CGGTGCTGGG

      T K L E L K R
301 ACCAAGCTGG AGCTGAAACG T

```

Figura 17**A. Cadena pesada de huDS6 v1.0 - SEC ID N°: 10**

Q A Q L V Q S G A E V V K P G A S
 1 CAGGCTCAGC TCGTGCAGTC TGGGGCTGAG GTGGTGAAGC CCGGGGCCTC

 V K M S C K A S G Y T F T S Y N
 51 AGTGAAGATG TCCTGCAAGG CTTCTGGCTA CACATTTACC AGTTACAATA

 M H W V K Q T P G Q G L E W I G Y
 101 TGCACTGGGT AAAGCAGACA CCTGGACAGG GCCTGGAATG GATTGGATAT

 I Y P G N G A T N Y N Q K F Q G K
 151 ATTTATCCTG GAAATGGTGC TACTAACTAC AATCAGAAGT TCCAGGGCAA

 A T L T A D T S S S T A Y M Q I
 201 GGCCACATTG ACTGCAGACA CATCCTCCAG CACAGCCTAC ATGCAGATCA

 S S L T S E D S A V Y F C A R G D
 251 GCAGCCTGAC ATCTGAAGAC TCTGCGGTCT ATTTCTGTGC AAGAGGAGAT

 S V P F A Y W G Q G T L V T V S A
 301 TCGGTCCCGT TTGCTTACTG GGGCCAAGGG ACTCTTGTC A CTGTCTCTGC

 351 C

B. Cadena pesada de huDS6 v1.2 - SEC ID N°: 11

Q A Q L V Q S G A E V V K P G A S
 1 CAGGCTCAGC TCGTGCAGTC TGGGGCTGAG GTGGTGAAGC CCGGGGCCTC

 V K M S C K A S G Y T F T S Y N
 51 AGTGAAGATG TCCTGCAAGG CTTCTGGCTA CACATTTACC AGTTACAATA

 M H W V K Q T P G Q G L E W I G Y
 101 TGCACTGGGT AAAGCAGACA CCTGGACAGG GCCTGGAATG GATTGGATAT

 I Y P G N G A T N Y N Q K F Q G K
 151 ATTTATCCTG GAAATGGTGC TACTAACTAC AATCAGAAGT TCCAGGGCAA

 A T L T A D P S S S T A Y M Q I
 201 GGCCACATTG ACTGCAGACC CATCCTCCAG CACAGCCTAC ATGCAGATCA

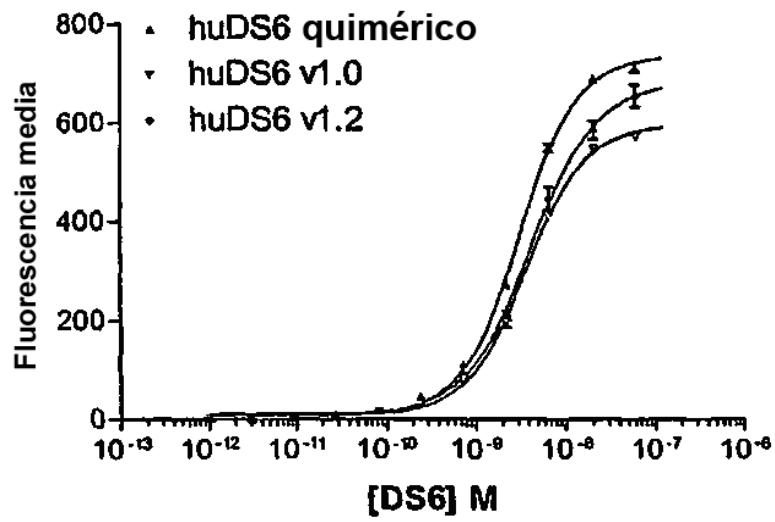
 S S L T S E D S A V Y F C A R G D
 251 GCAGCCTGAC ATCTGAAGAC TCTGCGGTCT ATTTCTGTGC AAGAGGAGAT

 S V P F A Y W G Q G T L V T V S A
 301 TCGGTCCCGT TTGCTTACTG GGGCCAAGGG ACTCTTGTC A CTGTCTCTGC

 351 C

Figura 18

A.



B.

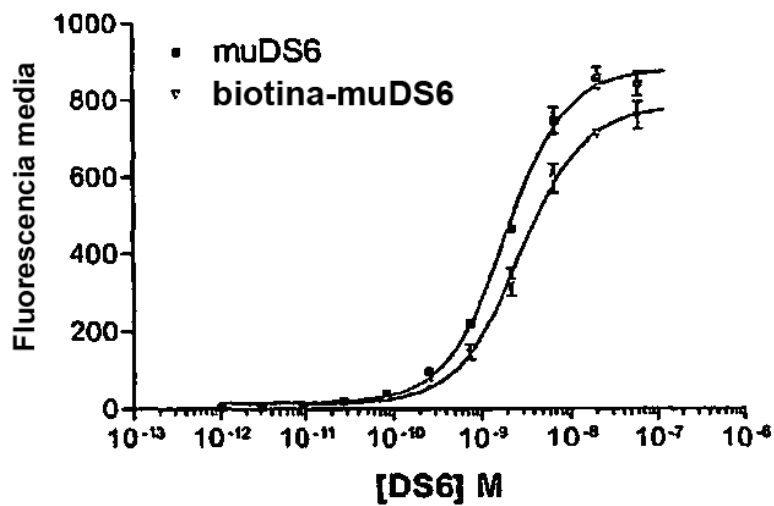
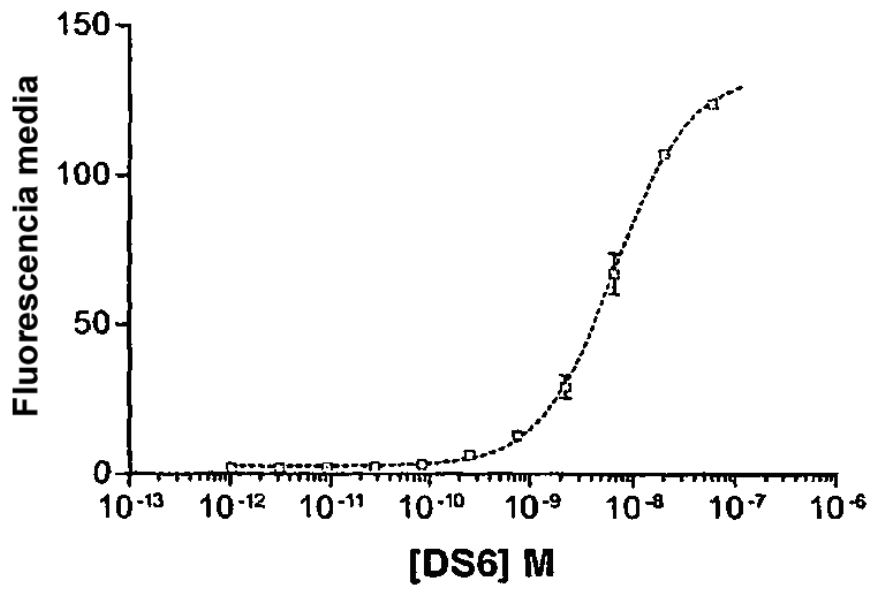


Figura 19

A.



B.

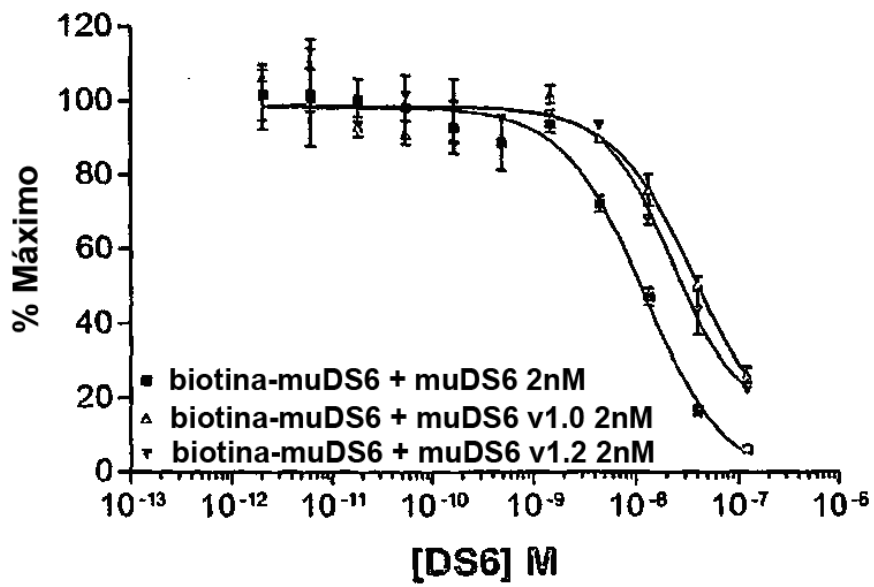


Figura 20

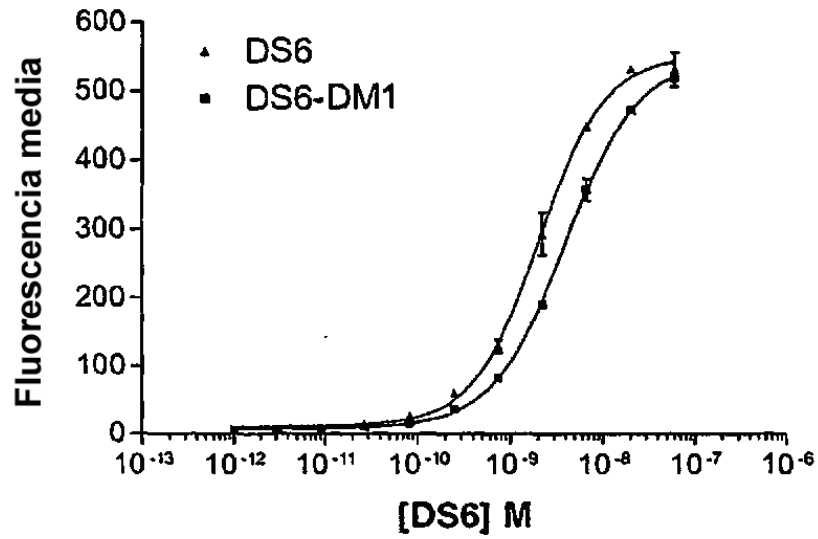


Figura 21

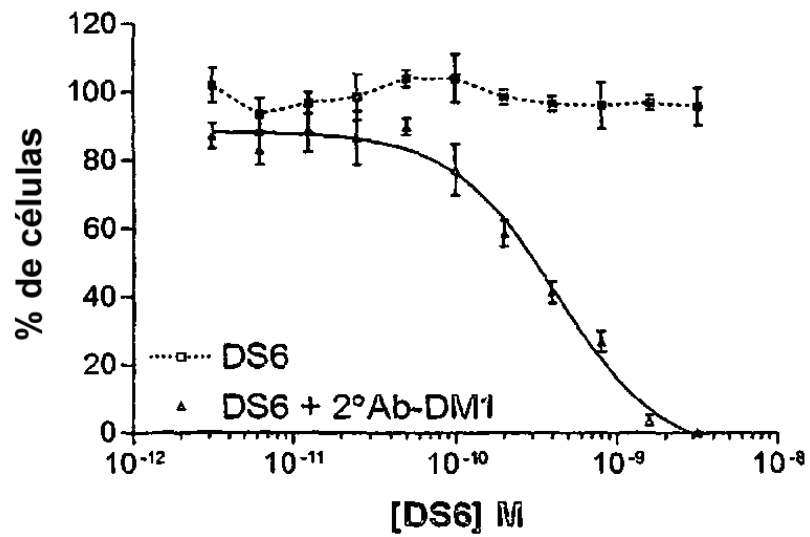
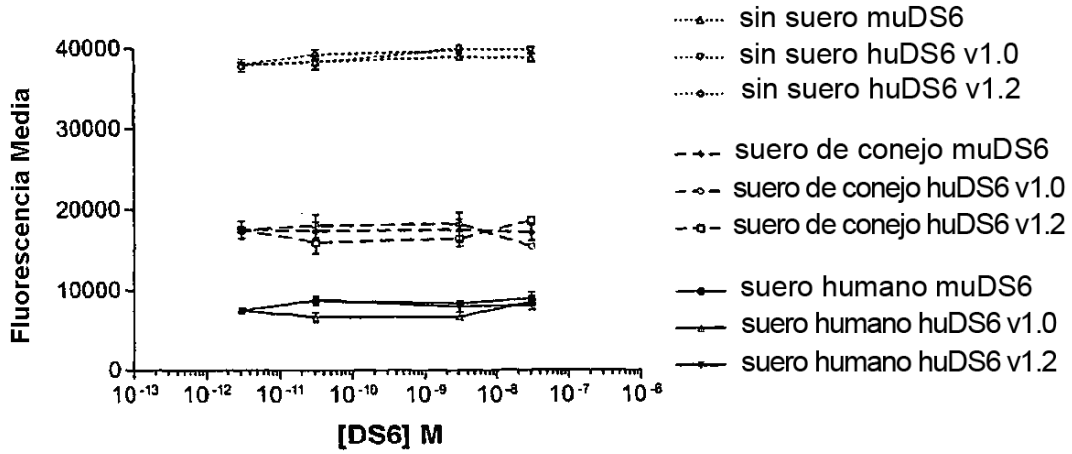


Figura 22

A. HPAC



B. ZR-75-1

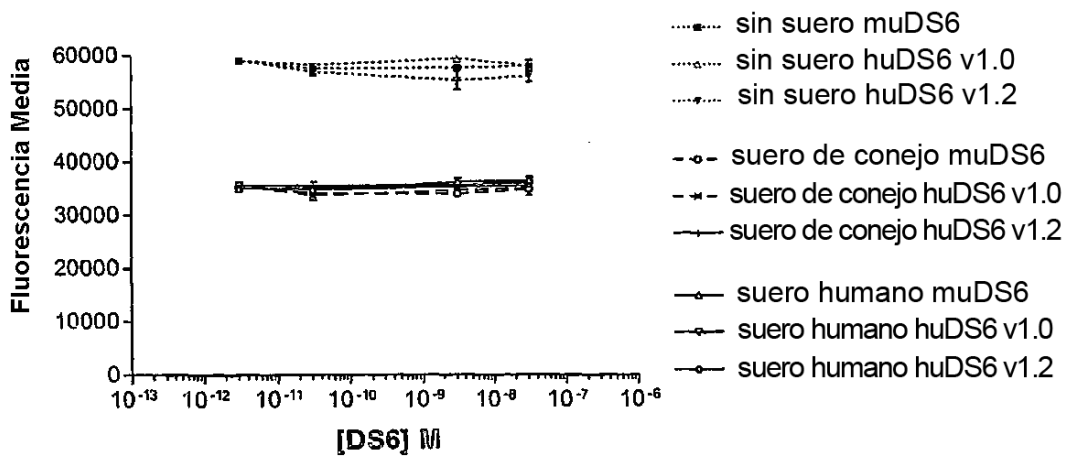


Figura 23

A. Líneas celulares de cáncer de ovario

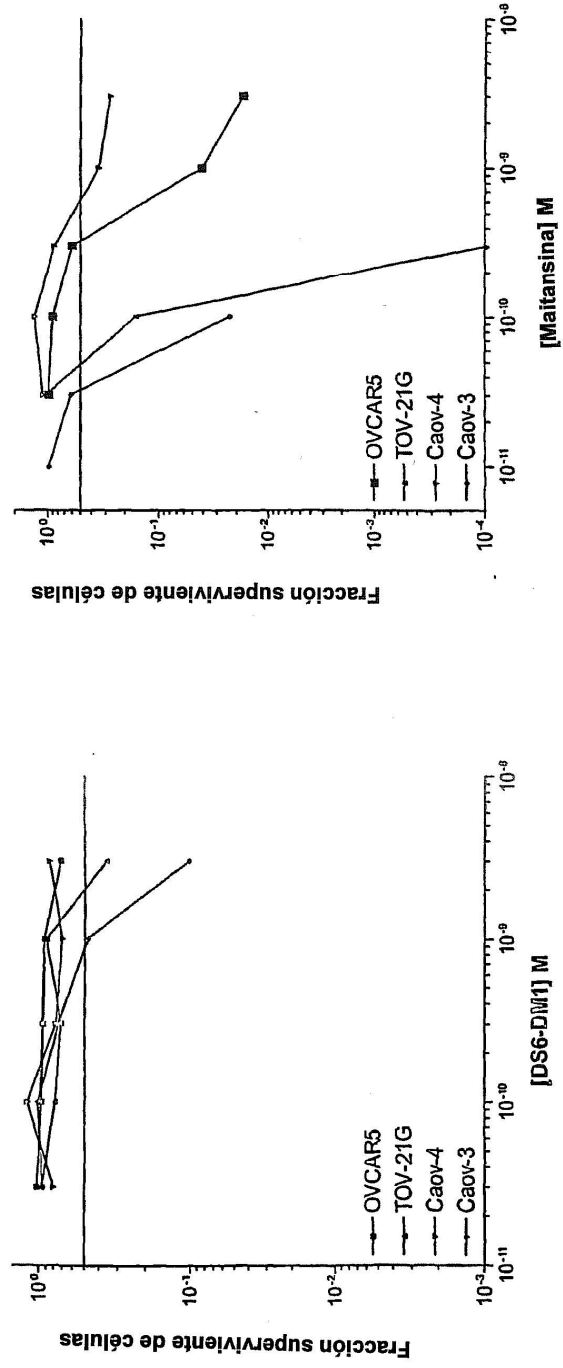


Figura 23 cont.

B. Líneas celulares de cáncer de mama humano

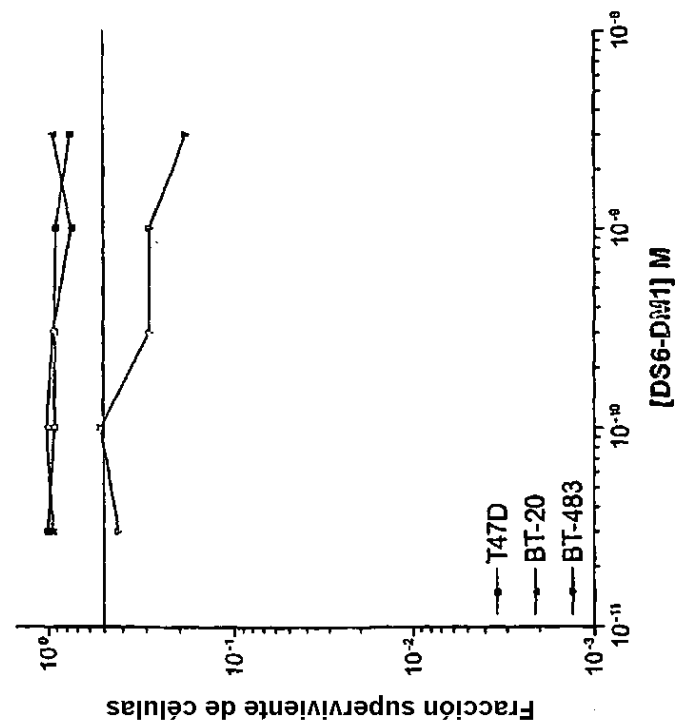
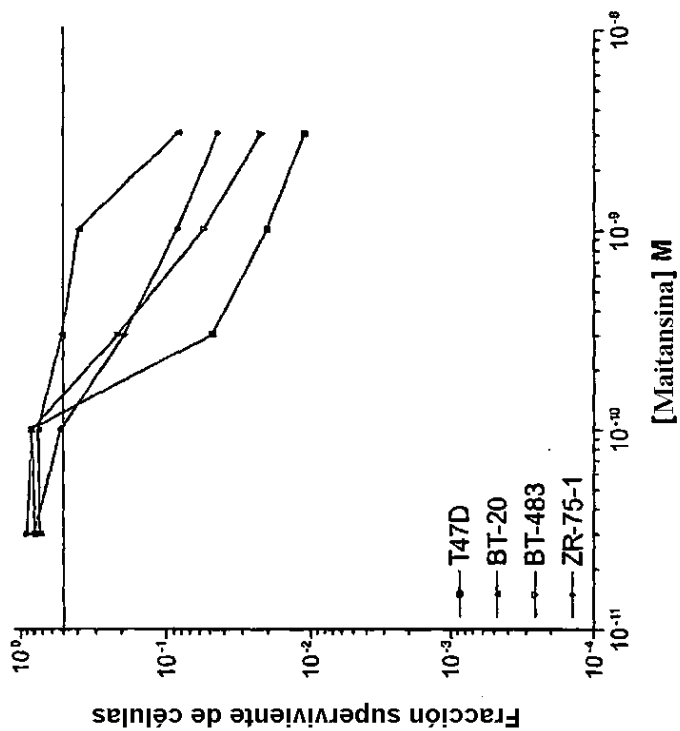


Figura 23 cont.

C. Líneas celulares de cáncer cervical humano

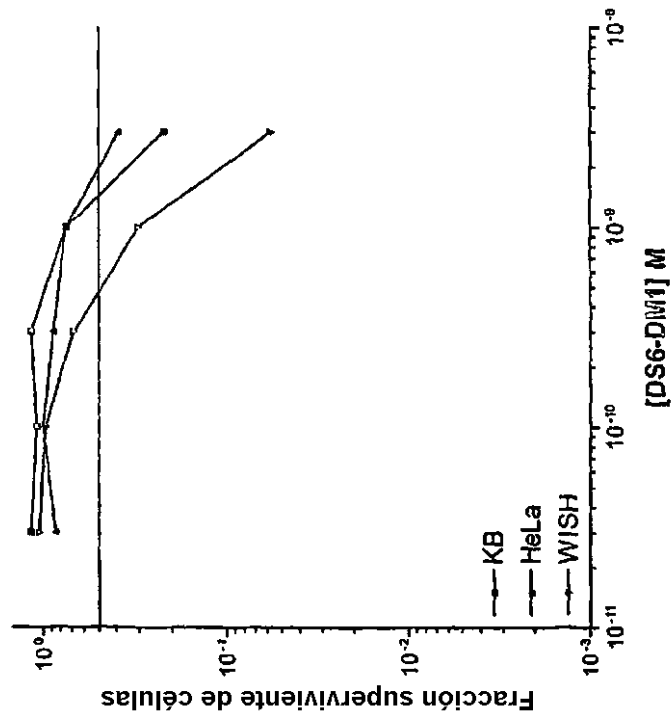
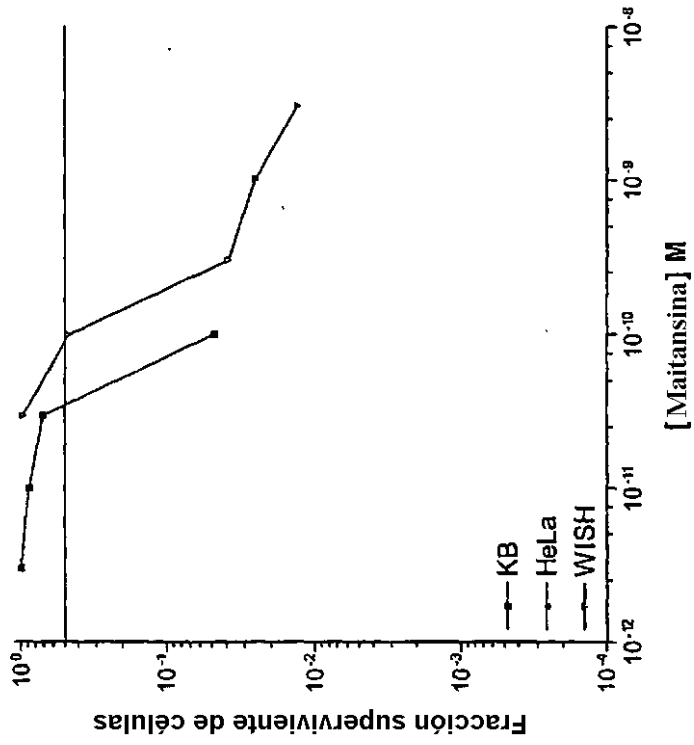


Figura 23 cont.

D. Líneas celulares de cáncer pancreático humano

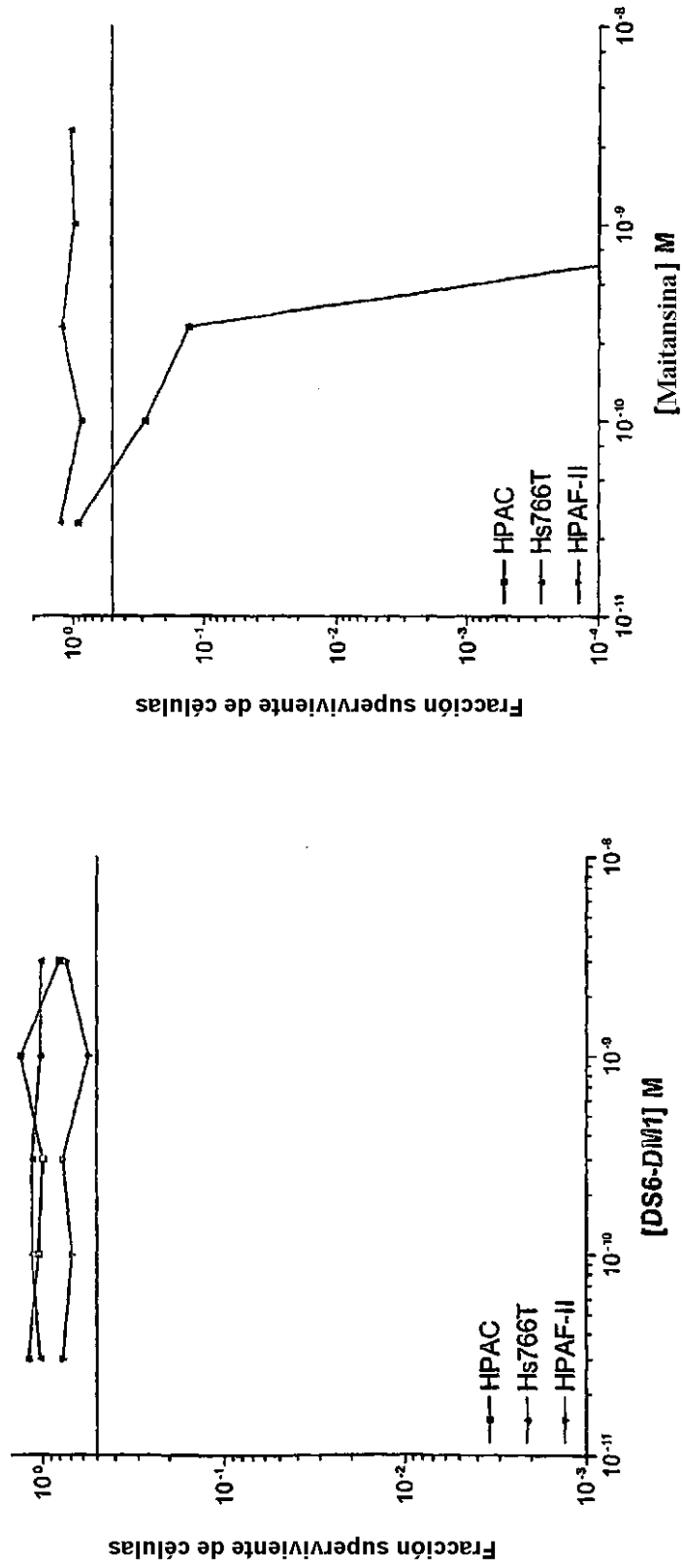


Figura 24

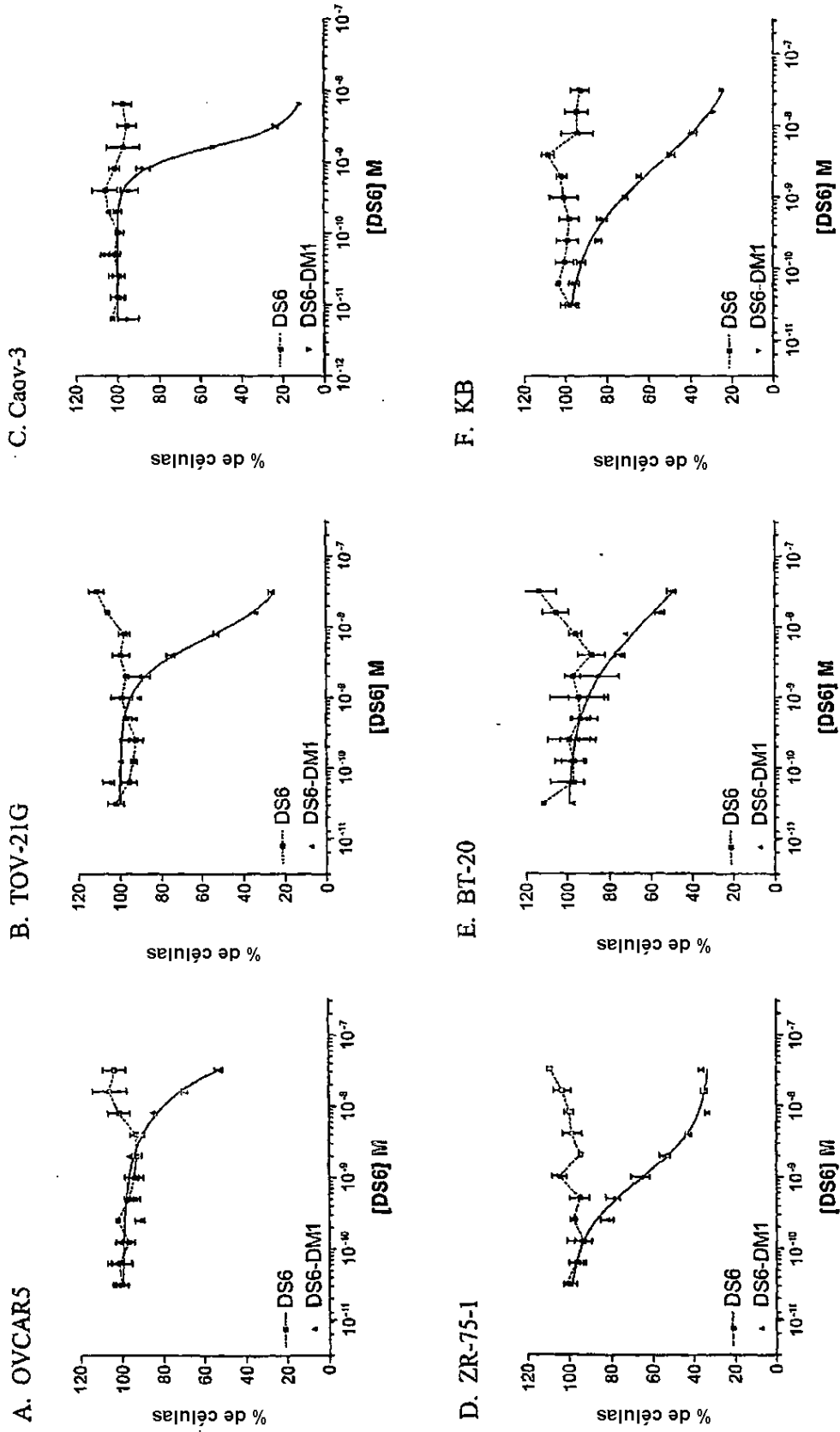


Figura 24 cont.

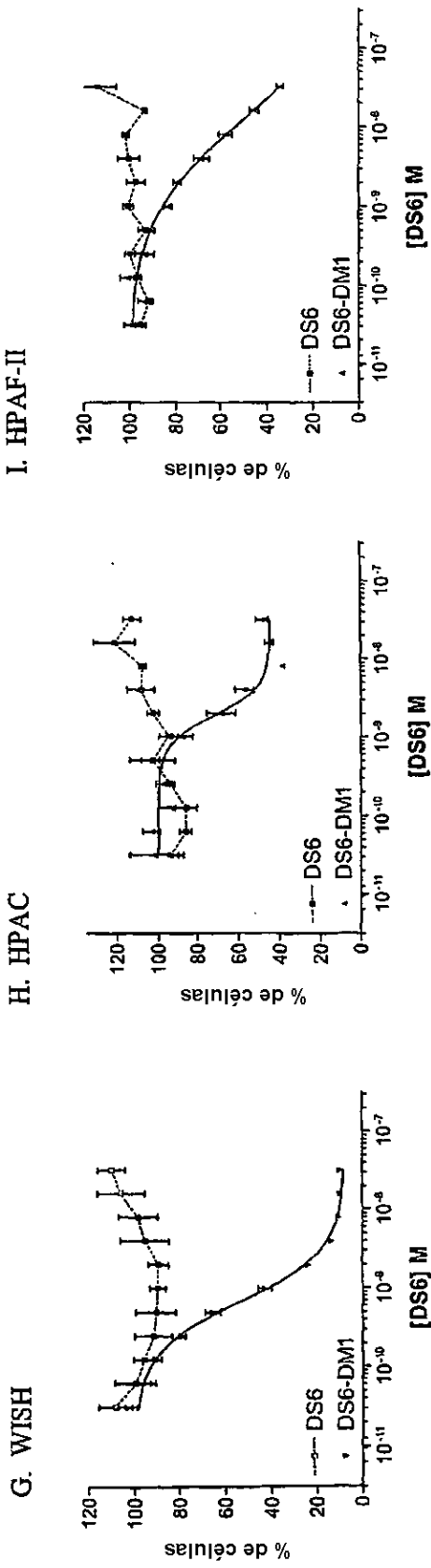
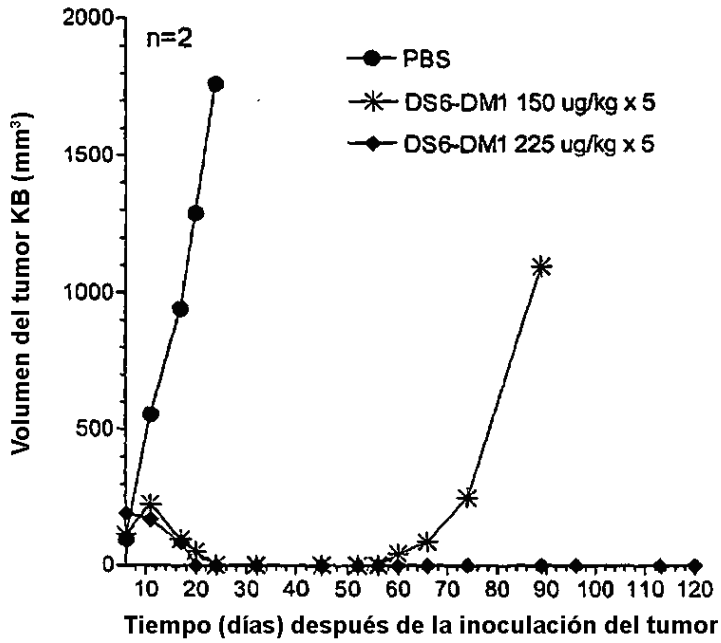


Figura 25

A.



B.

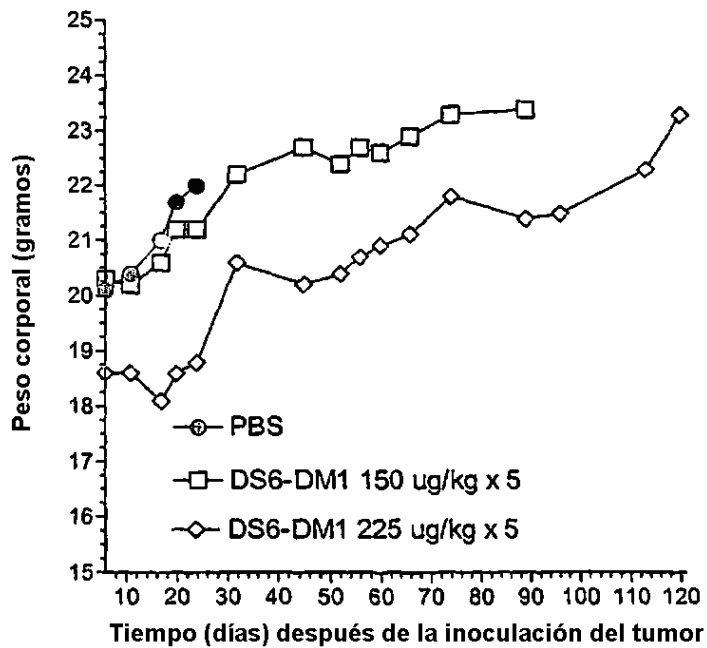
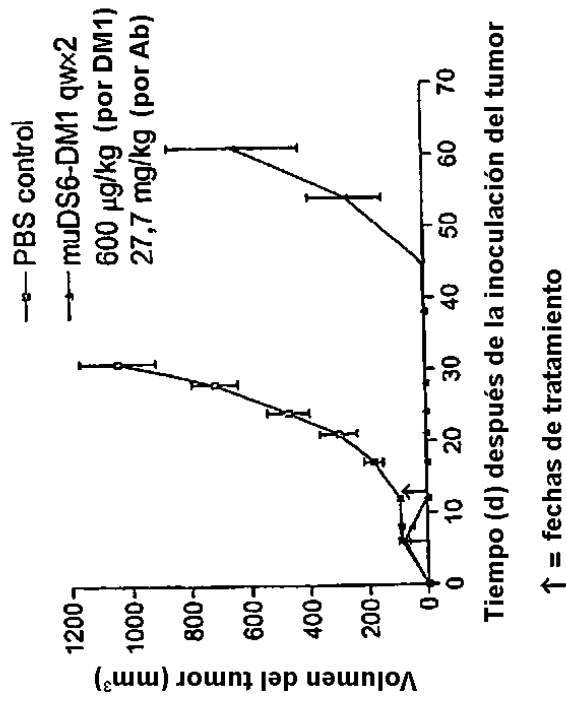


Figura 26

OVCAR5

A.



B.

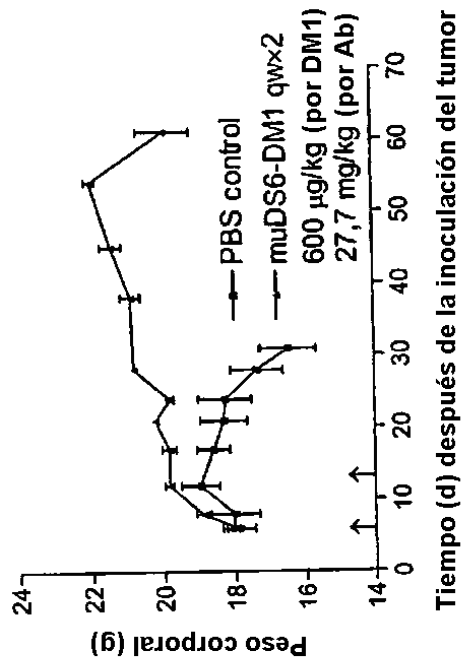
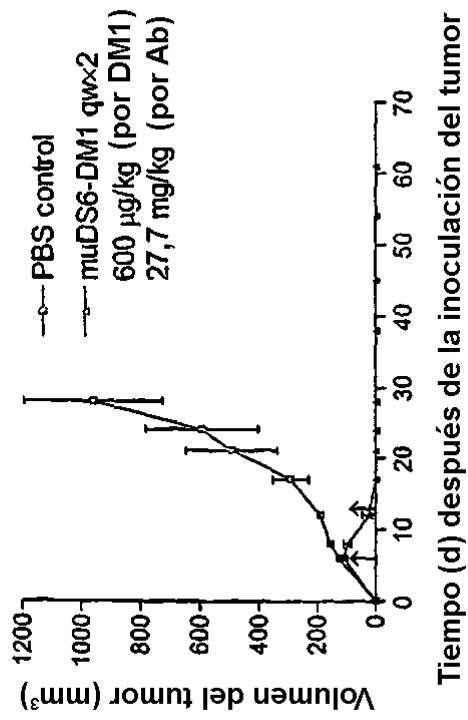


Figura 26 cont.

TOV-21G

C.



D.

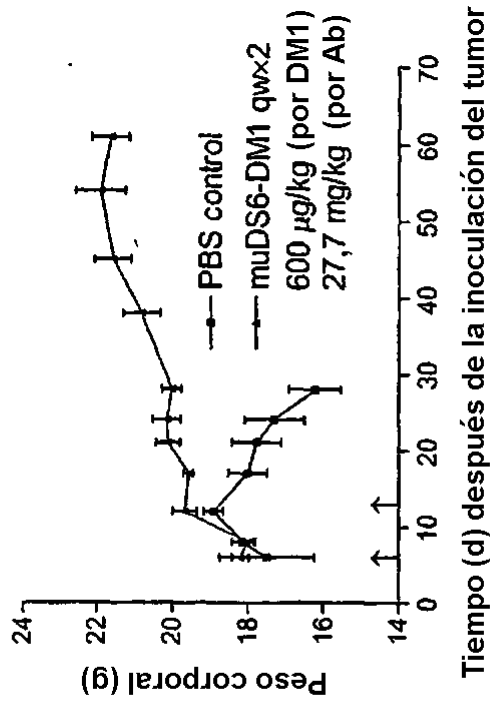
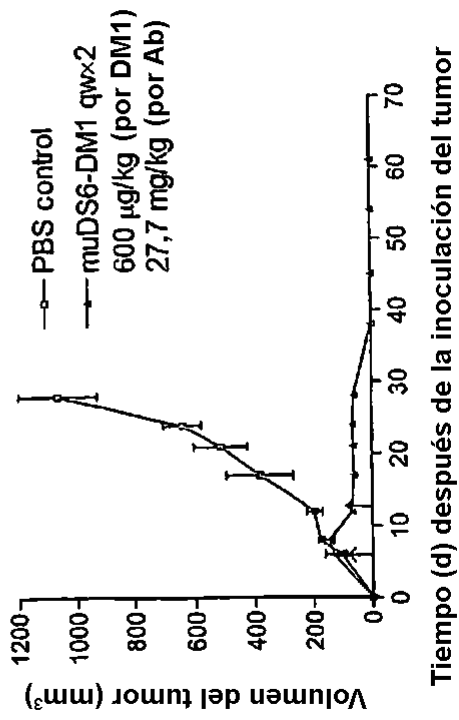


Figura 26 cont.

HPAC

E.



F.

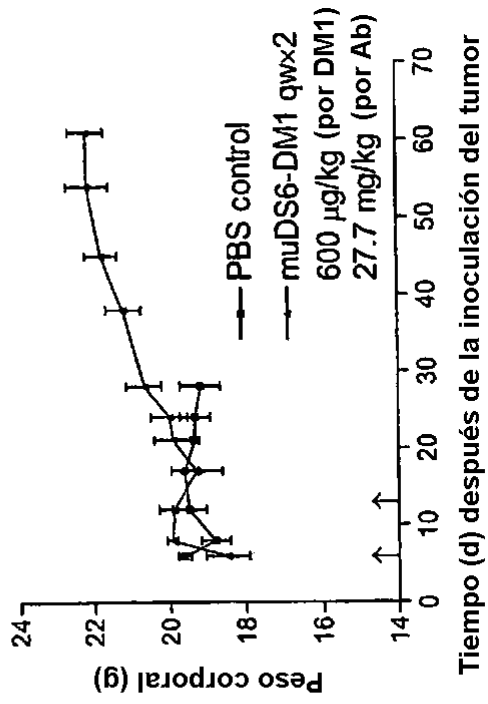
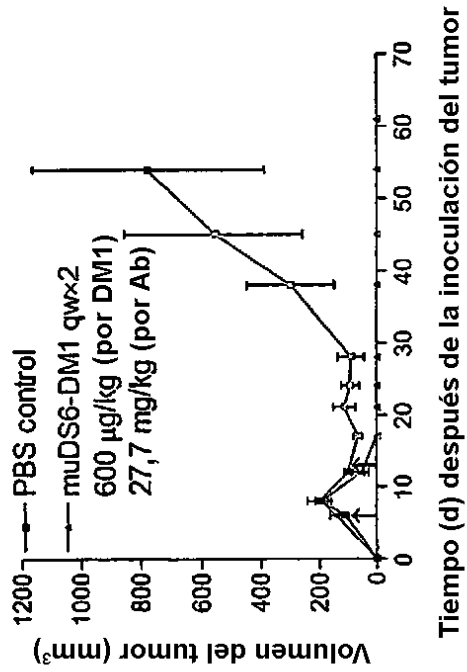


Figura 26 cont.

HeLa

G.



H.

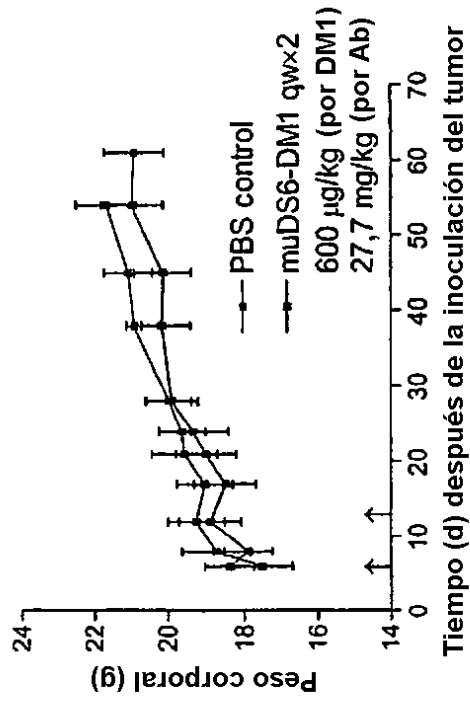


Figura 27

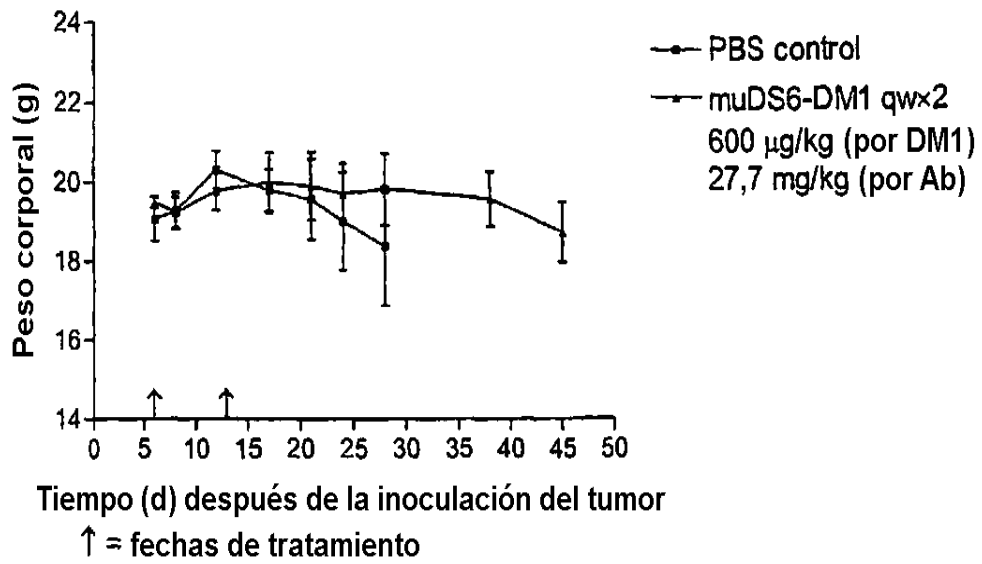
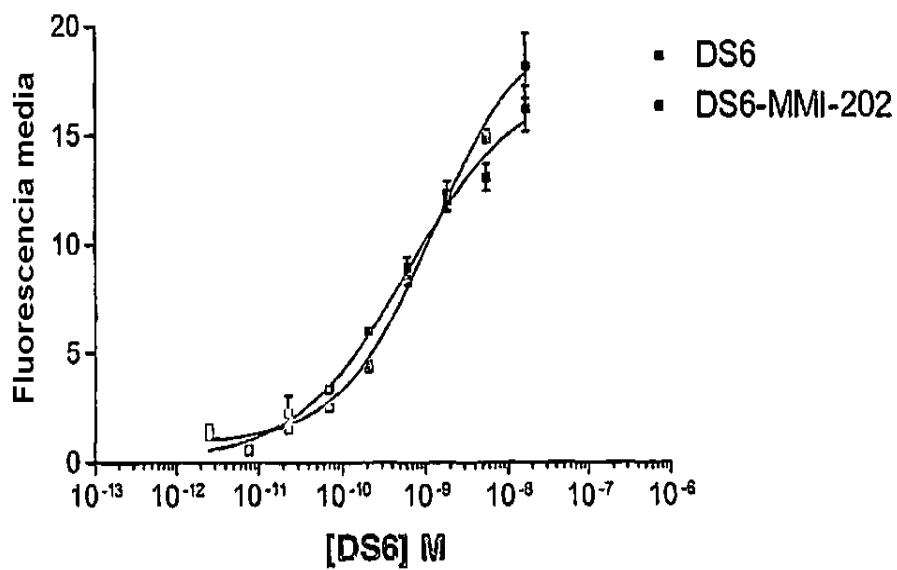


Figura 28



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tomado especial cuidado en la compilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 105
- 110
- 115
- 120
- 125
- 130
- 135
- 140
- 145
- 150
- 155
- 160
- 165
- 170
- 175
- 180
- 185
- 190
- 195
- 200
- Documentos de patentes citados en la descripción**
- WO 0216401 A [0063]
 - US 5885793 A, Griffiths [0071]
 - US 5969108 A [0071] [0101]
 - WO 9201047 A, McCafferty [0071] [0101]
 - WO 9906587 A, Liming [0071]
 - US 6596503 B [0074]
 - US 5639641 A, Pedersen [0078]
 - EP 0239400 A [0079]
 - WO 9109967 A [0079]
 - US 5530101 A [0079]
 - US 5585089 A [0079]
 - EP 0592106 A [0079]
 - EP 0519596 A [0079]
 - US 5565332 A [0079]
 - US 4444887 A [0079]
 - US 4716111 A [0079]
 - US 5545806 A [0079]
 - US 5814318 A [0079]
 - WO 9846645 A [0079]
 - WO 9850433 A [0079]
 - WO 9824893 A [0079]
 - WO 9816654 A [0079]
 - WO 9634096 A [0079]
 - WO 9633735 A [0079]
 - WO 9110741 A [0079]
 - WO 92014047 A [0101]
 - WO 9002809 A [0101]
 - WO 9110737 A [0101]
 - WO 9218619 A [0101]
 - WO 9311236 A [0101]
 - WO 9515982 A [0101]
 - WO 9520401 A [0101]
 - US 5698426 A [0101]
 - US 5223409 A [0101]
 - US 5403484 A [0101]
 - US 5580717 A [0101]
 - US 5427908 A [0101]
 - US 5750753 A [0101]
 - US 5821047 A [0101]
 - US 5571698 A [0101]
 - US 5516637 A [0101]
 - US 5780225 A [0101]
 - US 5658727 A [0101]
 - US 5733743 A [0101]
 - WO 9222324 A [0102]
 - US 4946778 A [0102]
 - US 5258498 A [0102]
 - WO 9321319 A [0103]
 - EP 239400 A [0103]
 - WO 8909622 A [0103]
 - EP 338745 A [0103]
 - EP 332424 A [0103]
 - US 5807715 A [0105]
 - US 4816567 A [0105]
 - US 4816397 A [0105]
 - WO 9222653 A [0106]
 - US 4424219 A [0120] [0126]
 - US 4256746 A [0120] [0122]
 - US 4294757 A [0120] [0124]
 - US 4307016 A [0120] [0123]
 - US 4313946 A [0120] [0130]
 - US 4315929 A [0120] [0130]
 - US 4331598 A [0120] [0127]
 - US 4361650 A [0120] [0123]
 - US 4362663 A [0120] [0131]
 - US 4364866 A [0120] [0129]
 - US 4450254 A [0120] [0128]
 - US 4322348 A [0120] [0131]
 - US 4371533 A [0120] [0132]
 - US 6333410 B [0120] [0163] [0165]
 - US 5475092 A [0120] [0175] [0181] [0182]
 - US 5585499 A [0120] [0177] [0181] [0182]
 - US 5846545 A [0120] [0177] [0181] [0182]
 - US 2004235840 A [0156]
 - US 5208020 A [0162]
 - US 6441163 B [0163] [0166]
 - US 2003055226 A [0163] [0166]
 - US 2004001838 A [0166] [0170] [0175]
 - US 20041838 B [0171]
 - US 10024290 B [0171]
 - US 5416064 A [0175]
 - US 6340701 B [0175] [0177]
 - US 6372738 B [0175] [0177]
 - US 6436931 B [0175]
 - US 6596757 B [0175]
 - US 1715795 A [0175]
 - WO 2004013093 A [0175]
 - US 2004024049 A [0175]
 - US 6534660 B [0182]
 - US 6586618 B [0182]
 - US 2003199519 A [0182]
 - US 2003195365 A [0182]
 - US 20010036923 A [0183]
- Documentos de patentes no citados en la descripción**
- Sela et al. *Immunoconjugates*. 1987, 189-216 [0004]
 - Ghose et al. *Targeted Drugs*. 1983, 1-22 [0004]
 - Diener et al. *Antibody mediated delivery systems*. 1988, 1-23 [0004]
 - Pietersz et al. *Antibody mediated delivery systems*. 1988, 25-53 [0004]
 - Bumol et al. *Antibody mediated delivery systems*. 1988, 55-79 [0004]
 - Garnett et al. *Cancer Res.*, 1986, vol. 46, 2407-2412 [0005]
 - Ohkawa et al. *Cancer Immunol. Immunother*, 1986, vol. 23, 81-86 [0005]
 - Endo et al. *Cancer Res.*, 1980, vol. 47, 1076-1080 [0005]
 - Hurwitz et al. *Appl. Biochem.*, 1980, vol. 2, 25-35 [0005]
 - Manabi et al. *Biochem. Pharmacol.*, 1985, vol. 34, 289-291 [0005]
 - Dillman et al. *Cancer Res.*, 1986, vol. 46, 4886-4891 [0005]
 - Shoval et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1988, vol. 85, 8276-8280 [0005]
 - Tsukada et al. *J. Natl. Canc. Inst.*, 1984, vol. 73, 721-729 [0005]
 - Kato et al. *J. Med. Chem.*, 1984, vol. 27, 1602-1607 [0005]
 - Tsukada et al. *Br. J. Cancer*, 1985, vol. 52, 111-116 [0005]
 - Liu et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, vol. 93, 8618-8623 [0006]
 - Kearsse et al. *Int. J. Cancer*, 2000, vol. 88 (6), 866-872 [0061] [0063] [0201]
 - Taylor-Papadimitriou. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, vol. 1455 (2-3), 301-13 [0061]
 - Wennerberg et al. *Am. J. Pathol.*, 1993, vol. 143 (4), 1050-1054 [0063]
 - Smith et al. *Human Antibodies*, 1999, vol. 9, 61-65 [0063]

- **Smith et al.** *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 2001, vol. 20 (3), 260-6 [0063]
- **Smith et al.** *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 2002, vol. 10 (2), 152-8 [0063]
- 5 • **Parham.** *J. Immunol.*, 1983, vol. 131, 2895-2902 [0070]
- **Spring et al.** *J. Immunol.*, 1974, vol. 113, 470-478 [0070]
- 10 • **Nisonoffet.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, vol. 89, 230-244 [0070]
- **Burgess.** *Immunology Today*, 1984, vol. 5, 155-158 [0070]
- **O'Keefe et al.** *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, 932-937 [0070]
- 15 • **Kabat et al.** Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH, 1991 [0072]
- **Padlan E. A.** *Molecular Immunology*, 1991, vol. 28 (4/5), 489-498 [0079]
- **Studnicka G. M. et al.** *Protein Engineering*, 1994, vol. 7 (6), 805-814 [0079]
- 20 • **Roguska M.A. et al.** *PNAS*, 1994, vol. 91, 969-973 [0079]
- **Brinkman et al.** *J. Immunol. Methods*, 1995, vol. 182, 41-50 [0101]
- 25 • **Ames et al.** *J. Immunol. Methods*, 1995, vol. 184, 177-186 [0101]
- 392-403 [0113]
- **Rader, C. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 8910-8915 [0113]
- 55 • **Vaughan, T. J. et al.** *Nature Biotechnology*, 1998, vol. 16, 535-539 [0113] [0114]
- **Adey, N. B. et al.** Phage Display of Peptides and Proteins. Academic Press, 1996, 277-291 [0114]
- 60 • **Gram, H. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 3576-3580 [0114]
- **Boder, E. T. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, 10701-10705 [0114]
- **Davies, J. ; Riechmann, L.** *Immunotechnology*, 1996, vol. 2, 169-179 [0114]
- 65 • **Thompson, J. et al.** *J. Mol. Biol.*, 1996, vol. 256, 77-88 [0114]
- **Short, M. K. et al.** *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, 16365-16370 [0114]
- 70 • **Furukawa, K. et al.** *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 27622-27628 [0114]
- **B.K. Bhuyan et al.** *Cancer Res.*, 1982, vol. 42, 3532-3537 [0177]
- 75 • **V. L. Reynolds et al.** *J. Antibiotics*, 1986, vol. XXIX, 319-334 [0179]
- **M.A. Warpehoski et al.** *J. Med. Chem.*, 1988, vol. 31, 590-603 [0179]
- **D.L. Boger et al.** *J. Org. Chem.*, 1990, vol. 55, 5823-5833 [0180]
- 80 • **D.L. Boger et al.** *BioOrg. Med. Chem. Lett.*, 1991, vol. 1, 115-120 [0180]
- **B.F. Foster et al.** *Investigational New Drugs*, 1996, vol. 13, 321-326 [0180]
- 85 • **I. Wolff et al.** *Clin. Cancer Res.*, 1996, vol. 2, 1717-1723 [0180]
- **R.V. J. Chari et al.** *Cancer Res.*, 1995, vol. 55, 4079-4084 [0181]
- **R.V.J. Chari et al.** *Cancer Res.*, 1995, vol. 55, 4079-4084 [0187]
- 90 • **Liu et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, vol. 93, 8618-8623 [0187]
- **Pegram et al.** *J. Clin. Oncol.*, 1998, vol. 16 (S), 2659-71 [0219]
- 95 • **Tolcher et al.** *J. Clin. Oncol.*, 2003, vol. 21 (2), 211-22 [0220]
- **WangZ et al.** *J Immunol Methods.*, 13 January 2000, vol. 233 (1-2), 167-77 [0230] [0231]
- **JohnsonG ;WuTT.** *Nucleic Acids Res.*, 01 January 2001, vol. 29 (1), 205-6 [0236]
- **Kettleborough et al.** *Eur. J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 952-958 [0101]
- 30 • **Persic et al.** *Gene*, 1997, vol. 187, 9-18 [0101]
- **Burton et al.** *Advances in Immunology*, 1994, vol. 57, 191-280 [0101]
- **Mullinax et al.** *BioTechniques*, 1992, vol. 12 (6), 864-869 [0102]
- 35 • **Sawai et al.** *AJRI*, 1995, vol. 34, 26-34 [0102]
- **Better et al.** *Science*, 1988, vol. 240, 1041-1043 [0102]
- **Huston et al.** *Methods in Enzymology*, 1991, vol. 203, 46-88 [0102]
- 40 • **Shu et al.** *PNAS*, 1993, vol. 90, 7995-7999 [0102]
- **Skerra et al.** *Science*, 1988, vol. 240, 1038-1040 [0102]
- 45 • **Pearson ; Lipman.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 2444-2448 [0104]
- **Morrison.** *Science*, 1985, vol. 229, 1202 [0105]
- **Oi et al.** *BioTechniques*, 1986, vol. 4, 214 [0105]
- **Gillies et al.** *J. Immunol. Methods*, 1989, vol. 125, 191-202 [0105]
- **Winter, G. ; Milstein, C.** *Nature*, 1991, vol. 349, 293-299 [0107]
- 50 • **Hudson, P.J.** *Current Opinion in Immunology*, 1999, vol. 11, 548-557 [0107]
- **Yang, W. P. et al.** *J. Mol. Biol.*, 1995, vol. 254,