

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 924**

51 Int. Cl.:
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07863572 .9**
96 Fecha de presentación: **26.10.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2061814**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.05.2009**

54 Título: **Anticuerpos e inmunoconjugados y usos para los mismos**

30 Prioridad:
27.10.2006 US 863295 P
05.12.2006 US 868707 P
30.03.2007 US 921300 P
29.06.2007 US 937857 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.10.2012

73 Titular/es:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:
DENNIS, Mark, S.;
RUBINFELD, Bonnee;
POLAKIS, Paul y
JAKOBOVITS, Aya

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 387 924 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).

DESCRIPCIÓN

ANTICUERPOS E INMUNOCONJUGADOS Y USOS PARA LOS MISMOS

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a anticuerpos anti-STEAP-1 e inmunocombinados de los mismos. La invención se refiere además a procedimientos de uso de anticuerpos anti-STEAP-1 e inmunocombinados de los mismos.

10

ANTECEDENTES

[0002] En seres humanos, el cáncer de próstata es uno de los tumores malignos más comúnmente diagnosticados en hombres y es la segunda causa principal de muerte relacionada con cáncer en el hombre. La Sociedad americana del cáncer estima que para el año 2000 se diagnosticarán 180.400 casos nuevos de cáncer de próstata con 31.900 muertes de la enfermedad. En estados avanzados, el cáncer de próstata metastatiza al hueso. Aunque se han conseguido avances en el diagnóstico temprano y el tratamiento de tumores localmente confinados, el cáncer de próstata es incurable una vez ha metastatizado. Los pacientes con cáncer de próstata metastático en terapia hormonal desarrollarán eventualmente un estado resistente a andrógenos (independiente de andrógenos) que conducirá a una progresión de la enfermedad y a la muerte. Actualmente, el antígeno prostático específico (PSA) es el marcador tumoral más ampliamente usado para el cribado, diagnóstico y monitorización de cáncer de próstata. Sin embargo, el uso generalizado de PSA como herramienta de cribado es controvertido ya que el PSA fracasa en discriminar con exactitud entre enfermedad de próstata benigna y maligna.

[0003] Dependiendo del estado del cáncer, el tratamiento del cáncer de próstata y de vejiga implica una o una combinación de las siguientes terapias: cirugía para extirpar el tejido cancerígeno, radioterapia, quimioterapia, privación de andrógenos (por ejemplo, terapia hormonal) en el caso de cáncer de próstata. Mientras que la terapia quirúrgica o radioterapia mejora significativamente la supervivencia en pacientes con fases tempranas de la enfermedad, las opciones terapéuticas están muy limitadas para casos avanzados, particularmente para reapariciones de tumor tras la ablación hormonal. La mayoría de los pacientes que se someten a terapia hormonal progresan para desarrollar enfermedad independiente de andrógenos. Actualmente, no hay tratamiento eficaz para el 20-40 % de los pacientes con cáncer de próstata que desarrollan enfermedad recurrente después de cirugía o radioterapia, o para aquellos en los que el cáncer ha metastatizado en el momento del diagnóstico. La quimioterapia tiene sus efectos secundarios tóxicos, especialmente en pacientes ancianos. El desarrollo de nuevas formas de terapia, especialmente para enfermedad resistente a la privación de andrógenos, es una necesidad urgente en el control del carcinoma prostático.

[0004] Se ha descrito la identificación de un antígeno de superficie celular novedoso, STEAP-1 (véase la patente de EE.UU. N° 6.329.503). STEAP-1 es un miembro de los antígenos transmembrana de serpiente de superficie celular. Se expresa predominantemente en el cáncer de próstata y, por tanto, los miembros de esta familia se han llamado "STEAP" (seis antígenos epiteliales de transmembrana de la próstata, de Six Transmembrane Epithelial Antigens of the Prostate). Las proteínas STEAP humanas presentan un alto grado de conservación estructural dentro de la familia, pero no muestran homología estructural significativa con ninguna proteína humana conocida. Parece que STEAP-1 es una proteína membrana tipo IIIa expresada predominantemente en células de la próstata en tejidos humanos normales. Estructuralmente, STEAP-1 es una proteína de 339 aminoácidos caracterizada por una topología molecular de seis dominios transmembrana y extremos N y C intracelulares, sugiriendo que se pliega en una forma de "serpiente" en tres bucles extracelulares y dos intracelulares. La expresión de proteínas STEAP-1 se mantiene a altos niveles a través de diversos estados de cáncer de próstata. STEAP-1 se expresa altamente en exceso en otros cánceres humanos tales como de pulmón y colon. Se han producido anticuerpos murinos para fragmentos de STEAP-1 humana y se mostró que los anticuerpos se unían a STEAP-1 sobre la superficie celular (véase la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 20040253232A1). El documento WO 2005/113601 A desvela anticuerpos anti-STEAP-1 monoclonales. El documento WO 2006/034488A desvela anticuerpos manipulados con cisteína.

[0005] La terapia basada en anticuerpos ha demostrado ser muy eficaz en el tratamiento de diversos cánceres. Por ejemplo, HERCEPTIN® y RITUXAN® (ambos de Genentech, S. San Francisco) se han usado satisfactoriamente para tratar cáncer de mama y linfoma no Hodgkin, respectivamente. HERCEPTIN® es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente al dominio extracelular del proto-oncogén del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). La expresión en

exceso de proteínas HER2 se observa en el 25-30 % de los cánceres de mama primarios. RITUXAN® es un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico genéticamente manipulado dirigido contra el antígeno CD20 encontrado sobre la superficie de linfocitos B normales y malignos. Ambos de estos anticuerpos se producen en células CHO.

5

[0006] El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco para la administración local de agente citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19: 605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26: 151-172; patente de EE.UU. 4975278) permite la administración elegida como diana del resto de fármaco a tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, en los que la administración sistémica de estos agentes de fármaco sin conjugar puede producir niveles inaceptables de toxicidad para células normales, además de las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin y col., (1986) *Lancet* pp. (15 de marzo de 1986): 603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review" en *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, A. Pinchera y col. (ed.s), pág. 475-506). Así se busca la máxima eficacia con la mínima toxicidad. Se ha informado de tanto anticuerpos policlonales como de anticuerpos monoclonales útiles en estas estrategias (Rowland y col., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183-87). Los fármacos usados en estos procedimientos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland y col., *Cancer Immunol. Immunother.* 21: 183-87 (1986)). Las toxinas usadas en conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas de plantas tales como ricina, toxinas de moléculas pequeñas tales como geldanamicina (Kerr y col. (1997) *Bioconjugate Chem.* 8(6): 781-784; Mandler y col. (2000) *Journal of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581; Mandler y col. (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028; Mandler y col. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13: 786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu y col., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623) y caliqueamicina (Lode y col. (1998) *Cancer Res.* 58: 2928; Hinman y col. (1993) *Cancer Res.* 53: 3336-3342). Las toxinas pueden efectuar sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa (Meyer, D.L. y Senter, P.D. "Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy" en *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, vol. 38 (2003) Capítulo 23, 229-237). Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos o ligandos de receptores de proteínas grandes.

[0007] ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido contra el antígeno CD20 encontrado sobre la superficie de linfocitos B normales y malignos y radioisótopo ¹¹¹In o ⁹⁰Y unido por un quelante de ligador de tiourea (Wiseman y col. (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7): 766-77; Wiseman y col. (2002) *Blood* 99(12): 4336-42; Witzig y col. (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10): 2453-63; Witzig y col. (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15): 3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra linfoma no Hodgkin (LNH) de linfocitos B, la administración produce citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo huCD33 ligado a caliqueamicina, fue aprobado en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda mediante inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25(7): 686; patentes de EE.UU. N° 4.970.198; 5.079.233; 5.585.089; 5.606.040; 5.693.762; 5.739.116; 5.767.285; 5.773.001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 ligado por el ligador de disulfuro SPP al resto de fármacos maitansinoides, DM1, está siendo desarrollado para el tratamiento de cánceres que expresan el antígeno CanAg, tal como colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal anti-antígeno prostático específico de membrana (PSMA) ligado al resto de fármacos maitansinoides, DM1, está en desarrollo para el posible tratamiento de tumores de próstata. El mismo resto de fármacos maitansinoides, DM1, se ligó mediante un ligador de no disulfuro, SMCC, a un anticuerpo monoclonal murino de ratón, TA.1 (Chari y col. (1992) *Cancer Research* 52: 127-131). Se informó que este conjugado era 200 veces menos potente que el conjugado de ligador de disulfuro correspondiente. Se consideró que el ligador de SMCC era "no escindible" allí.

50

[0008] Se han aislado varios compuestos peptídicos cortos del molusco marino *Dolabella auricularia* y se encontró que tenían actividad biológica (Pettit y col. (1993) *Tetrahedron* 49: 9151; Nakamura y col. (1995) *Tetrahedron Letters* 36: 5059-5062; Sone y col. (1995) *Journal Org Chem.* 60: 4474). También se han preparado análogos de estos compuestos, y se encontró que algunos tenían actividad biológica (para una revisión véase Pettit y col. (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13: 243-277). Por ejemplo, la auristatina E (documento US 5635483) es un análogo sintético del producto natural marino dolastatina 10, un agente que inhibe la polimerización de tubulina por unión al mismo sitio sobre la tubulina como el fármaco anticancerígeno vincristina (G. R. Pettit, (1997) *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 70: 1-79). La dolastatina 10, auristatina PE y auristatina E son péptidos lineales que tienen cuatro aminoácidos, tres de los cuales son únicos para la clase de compuestos de dolastatina, y un amida del extremo C.

- [0009]** Los péptidos auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, se conjugaron con: (i) anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas); (ii) cAC10 que es específico para CD30 en tumores malignos hematológicos (Klussman, y col. (2004), 5 Bioconjugate Chemistry 15(4): 765-773; Doronina y col. (2003) Nature Biotechnology 21(7): 778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"; Francisco y col. (2003) Blood 102(4): 1458-1465; documento US 2004/0018194; (iii) anticuerpos anti-CD20 tales como Rituxan® (rituximab) (documento WO 04/032828) para el tratamiento de cánceres que expresan CD20 y trastornos inmunitarios; (iv) anticuerpos anti-EphB2 2H9 y anti-IL-8 para el tratamiento de cáncer colorrectal (Mao, y col. (2004) Cancer Research 64(3): 781-10 788); (v) anticuerpo para E-selectina (Bhaskar y col. (2003) Cancer Res. 63: 6387-6394); y (vi) otros anticuerpos anti-CD30 (documento WO 03/043583). La monometilauristatina (MMAE) también se ha conjugado con 2H9, un anticuerpo contra EphB2R que es un receptor de TM tirosina cinasa de tipo I con estrecha homología entre ratón y ser humano, y se expresa en exceso en células de cáncer colorrectal (Mao y col. (2004) Cancer Res. 64: 781-788).
- 15 **[0010]** Se ha informado que la monometilauristatina MMAF, una variante de la auristatina E (MMAE) con una fenilalanina en el extremo C (documentos US 5767237; US 6124431), es menos potente que MMAE, pero más potente cuando se conjuga con anticuerpos monoclonales (Senter y col., Proceedings of the American Association for Cancer Research, volumen 45, resumen número 623, presentado el 28 de marzo de 2004). La auristatina F fenilendiamina (AFP), una variante de fenilalanina de MMAE, se ligó a un mAb anti-CD70, 1F6, mediante el extremo 20 C de 1 F6 por un espaciador de fenilendiamina (Law y col., Proceedings of the American Association for Cancer Research, volumen 45, resumen número 625, presentado el 28 de marzo de 2004).

[0011] Existe una necesidad en la materia de fármacos adicionales para tratar diversos cánceres tales como cánceres y metástasis de cánceres en la próstata, pulmón y colon. Fármacos particularmente útiles para este fin 25 incluyen conjugados de anticuerpo anti-STEAP-1-fármaco que eligen como diana células de la próstata, pulmón o colon que tienen una toxicidad significativamente menor pero una eficiencia terapéutica todavía útil. Estas y otras limitaciones y problemas del pasado son tratadas por la presente invención.

[0012] La recitación de cualquier referencia en la presente solicitud no es una admisión de que la referencia 30 sea técnica anterior a la presente solicitud.

RESUMEN

[0013] La invención proporciona anticuerpos anti-STEAP-1 como se define en la reivindicación 1 y 35 procedimientos de uso de los mismos.

[0014] En la presente divulgación se proporciona un anticuerpo que se une a STEAP-1, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2A (SEQ ID NO: 6) o un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2B (SEQ ID NO: 9). Se proporciona un anticuerpo que se une a STEAP-1, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2A (SEQ ID NO: 6) y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2B (SEQ ID NO: 9).

45 **[0015]** Se proporciona un anticuerpo que se une a STEAP-1, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencias con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o 10. El anticuerpo puede comprender un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 10. El anticuerpo comprende una región estructural 1 del 50 dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 25.

[0016] El anticuerpo puede comprender un dominio variable de la cadena ligera que tiene al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencias con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En una realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 6.

[0017] Se proporciona un anticuerpo que se une a STEAP-1, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al

menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencias con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o 10. El anticuerpo puede comprender un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 10. El anticuerpo comprende una región estructural 1 del dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 25. En una realización, el anticuerpo comprende además un dominio variable de la cadena ligera que tiene al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencias con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En una realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 6.

10 **[0018]** Se proporciona un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos anteriores. Se proporciona un vector que comprende el polinucleótido. Se proporciona una célula huésped que comprende el vector. La célula huésped puede ser eucariota. La célula huésped puede ser una célula de ovario de hámster chino (CHO). También se proporciona un procedimiento de producción de un anticuerpo anti-STEAP-1, en el que el procedimiento comprende cultivar la célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polinucleótido que codifica el anticuerpo, y aislar el anticuerpo.

[0019] En un aspecto se proporciona un anticuerpo que se une a STEAP-1 expresada sobre la superficie de una célula. En una realización, el anticuerpo se une a un epítipo dentro de una región de STEAP-1 humana o de ratón. En una realización, la célula es célula de mamífero. En una realización, la célula es una célula humana. En una realización, la célula es una célula cancerosa. En una realización la célula es una célula de próstata, pulmón o colon. En una realización, la célula cancerosa es una célula de cáncer de próstata. En otra realización, la célula es de una metástasis de un cáncer de próstata, pulmón o colon primario.

[0020] El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv o (Fab)₂. El anticuerpo está humanizado.

[0021] En un aspecto se proporciona un procedimiento de detección de la presencia de STEAP-1 en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la muestra biológica con cualquiera de los anticuerpos anteriores en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo a STEAP-1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y STEAP-1, en el que la muestra biológica es una muestra de tejido. En una realización, la muestra biológica comprende células de la próstata. En una realización, la muestra biológica es de un mamífero que experimenta o del que se sospecha que experimenta un trastorno de células de la próstata y/o un trastorno proliferativo de células de células o tejidos que incluye, pero no se limita a, cáncer de próstata, pulmón, colon, vejiga y ovario y sarcoma de Ewing, además de metástasis de cánceres de próstata, pulmón, colon, vejiga y ovario primarios y sarcoma de Ewing. Véanse, por ejemplo, (véanse la patente de EE.UU. N° 6.329.503; y Rodeberg, D.A. y col., Clin. Cancer Res. 11(12): 4545-4552 (2005)).

[0022] La divulgación también proporciona un procedimiento de diagnóstico de un trastorno proliferativo de células asociado a aumento de la expresión de STEAP-1, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una célula de prueba con cualquiera de los anticuerpos anteriores; determinar el nivel de expresión de STEAP-1 detectando la unión del anticuerpo a STEAP-1; y comparar el nivel de expresión de STEAP-1 por la célula de prueba con el nivel de expresión de STEAP-1 por una célula de control, en el que un mayor nivel de expresión de STEAP-1 por la célula de prueba con respecto a la célula de control indica la presencia de un trastorno proliferativo de células asociado al aumento de la expresión de STEAP-1. La célula de prueba puede ser una célula de un paciente del que se sospecha que tiene un trastorno proliferativo de células, tal como un trastorno proliferativo de la próstata. El trastorno proliferativo de células puede seleccionarse de trastornos de células de la próstata que incluyen, pero no se limitan a, cáncer de próstata. El procedimiento puede comprender determinar el nivel de expresión de STEAP-1 sobre la superficie de la célula de prueba (tal como, por ejemplo, una célula de cáncer de próstata) y comparar el nivel de expresión de STEAP-1 sobre la superficie de la célula de prueba con el nivel de expresión de STEAP-1 sobre la superficie de la célula de control (tal como, por ejemplo, una célula de próstata normal distinta de una célula de próstata anormalmente proliferante).

[0023] Se proporciona un procedimiento de diagnóstico de un trastorno proliferativo de células asociado a un aumento en células, tal como células de la próstata, que expresan STEAP-1, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una célula de prueba en una muestra biológica con cualquiera de los anticuerpos anteriores; determinar el nivel de anticuerpo unido a las células de prueba en la muestra detectando la unión del anticuerpo a STEAP-1; y comparar el nivel de anticuerpo unido a las células en una muestra de control, en el que el nivel de anticuerpo unido se normaliza al número de células que expresan STEAP-1 en las muestras de prueba y de control, y en el que un mayor nivel de anticuerpo unido en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control indica la presencia de

un trastorno proliferativo de células asociado a células que expresan STEAP-1.

[0024] También se proporciona un procedimiento de detección de STEAP-1 soluble en sangre o suero, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una muestra de prueba de sangre o suero de un mamífero del que se sospecha que experimenta un trastorno proliferativo de células de la próstata con un anticuerpo anti-STEAP-1 de la invención y detectar un aumento en STEAP-1 soluble en la muestra de prueba con respecto a una muestra de control de sangre o suero de un mamífero normal. El procedimiento de detección puede ser útil como procedimiento de diagnóstico de un trastorno proliferativo de células de la próstata asociado a un aumento en STEAP-1 soluble en sangre o suero de un mamífero.

[0025] En un aspecto, los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos manipulados con cisteína en los que uno o más aminoácidos de un anticuerpo parental están sustituidos con un aminoácido de cisteína libre como se desvela en el documento WO2006/034488. Un anticuerpo manipulado con cisteína comprende uno o más aminoácidos de cisteína libres que tienen un valor de reactividad del tiol en el intervalo de 0,6 a 1,0. Un aminoácido de cisteína libre es un residuo de cisteína que se ha manipulado en el anticuerpo parental y no es parte de un puente disulfuro. Los anticuerpos manipulados con cisteína son útiles para la unión de compuestos citotóxicos y/o obtención de imágenes en el sitio de la cisteína manipulada mediante, por ejemplo, una maleimida o haloacetilo. La reactividad nucleófila de la funcionalidad tiol de un residuo de Cys debido a un grupo maleimida es aproximadamente 1000 veces superior en comparación con cualquier otra funcionalidad de aminoácido en una proteína, tal como grupo amino de residuos de lisina o el grupo amino del extremo N. La funcionalidad específica para tiol en reactivos de yodoacetilo y maleimida puede reaccionar con grupos amina, pero se requieren pH mayores (>9,0) y tiempos de reacción prolongados (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, Londres).

[0026] Los anticuerpos manipulados con cisteína pueden ser útiles en el tratamiento de cáncer e incluyen anticuerpos específicos para superficie celular y receptores transmembrana, y antígenos asociados a tumores (TAA). Tales anticuerpos pueden usarse como anticuerpos desnudos (sin conjugar con un resto de fármaco o de marca) o como conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC). Los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención pueden acoplarse específicamente y eficientemente a sitio con un reactivo reactivo con tiol. El reactivo reactivo con tiol puede ser un reactivo de ligador multifuncional, un reactivo de marca de captura, un reactivo fluoróforo o un producto intermedio de fármaco-ligador. El anticuerpo manipulado con cisteína puede marcarse con una marca detectable, inmovilizarse sobre un soporte de fase sólida y/o conjugarse con un resto de fármaco. La reactividad del tiol puede generalizarse a cualquier anticuerpo en el que la sustitución de aminoácidos con aminoácidos de cisteína reactivos pueda hacerse dentro de los intervalos en la cadena ligera seleccionados de los intervalos de aminoácidos: L-10 a L-20; L-38 a L-48; L-105 a L-115; L-139 a L-149; L-163 a L-173; y dentro de los intervalos en la cadena pesada seleccionados de los intervalos de aminoácidos: H-35 a H-45; H-83 a H-93; H-114 a H-127; y H-170 a H-184, y en la región Fc dentro de los intervalos seleccionados de H-268 a H-291; H-319 a H-344; H-370 a H-380; y H-395 a H-405, en los que la numeración de posiciones de aminoácidos empieza en la posición 1 del sistema de numeración de Kabat (Kabat y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) y continúa secuencialmente después como se desvela en el documento WO 2006/034488. La reactividad del tiol también puede generalizarse a ciertos dominios de un anticuerpo, tal como el dominio constante de la cadena ligera (CL) y los dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Las sustituciones de cisteína que producen valores de reactividad del tiol de 0,6 y superiores pueden hacerse en los dominios constantes de la cadena pesada α , δ , ϵ , γ y μ de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, respectivamente, que incluyen las subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA y IgA2. Tales anticuerpos y sus usos se desvelan en el documento WO 2006/034488.

[0027] Los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención retienen preferentemente la capacidad de unión a antígeno de sus homólogos de anticuerpos parentales naturales. Por tanto, los anticuerpos manipulados con cisteína pueden unirse, preferentemente específicamente, a antígenos. Tales antígenos incluyen, por ejemplo, antígenos asociados a tumores (TAA), proteínas de receptores de la superficie celular y otras moléculas de la superficie celular, proteínas transmembrana, proteínas de señalización, factores reguladores de la superficie celular, factores reguladores de la proliferación celular, moléculas asociadas a (para, por ejemplo, conocidas o que se sospecha que contribuyen funcionalmente a) desarrollo o diferenciación de tejido, linfocinas, citocinas, moléculas que participan en la regulación del ciclo celular, moléculas que participan en vasculogénesis y moléculas asociadas a (para, por ejemplo, conocidas o que se sospecha que contribuyen funcionalmente a) angiogénesis.

[0028] Un anticuerpo de la invención puede conjugarse con otros agentes reactivos con tiol en los que el grupo reactivo es, por ejemplo, una maleimida, una yodoacetamida, un disulfuro de piridilo u otro componente de

conjugación reactivo con tiol (Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3: 2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, Londres; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1: 2; Hermanson, G. en Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pág. 40-55, 643-671). El componente puede ser un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina tal como doxorubicina o toxina de *Pertussis*), un fluoróforo tal como un colorante fluorescente como fluoresceína o rodamina, un agente quelante para una obtención de imágenes o metal radioterapéutico, una marca de peptidilo o no peptidilo o marca de detección, o un agente modificador de la eliminación tal como diversos isómeros de polietilenglicol, un péptido que se une a un tercer componente, u otro hidrato de carbono o agente lipófilo.

10

[0029] En un aspecto, los anticuerpos de la invención pueden conjugarse con cualquier resto de marca que pueda unirse covalentemente al anticuerpo mediante un resto reactivo, un resto activado o un grupo tiol de la cisteína reactiva (Singh y col. (2002) Anal. Biochem. 304: 147-15; Harlow E. y Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 2ª ed. CRC Press, Boca Raton, FL). La marca unida puede servir para: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con una segunda marca para modificar la señal detectable proporcionada por la primera o segunda marca, por ejemplo, para dar FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia); (iii) estabilizar interacciones o aumentar la afinidad de unión, con antígeno o ligando; (iv) afectar la movilidad, por ejemplo, movilidad electroforética o permeabilidad a células, por carga, hidrofobia, forma u otros parámetros físicos, o (v) proporcionar un resto de captura, para modular la afinidad de ligandos, unión a anticuerpo/antígeno o complejación iónica.

[0030] Los anticuerpos manipulados con cisteína marcados pueden ser útiles en ensayos de diagnóstico, por ejemplo, para detectar la expresión de un antígeno de interés en células específicas, tejidos o suero. Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo normalmente se marcará con un resto detectable. Están disponibles numerosas marcas que pueden agruparse generalmente en las siguiente categorías:

[0031] Radioisótopos (radionúclidos), tales como ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At o ^{213}Bi . Los anticuerpos marcados con radioisótopos son útiles en experimentos de obtención de imágenes que eligen receptores como diana. El anticuerpo puede marcarse con reactivos de ligando que se unen, quelan o complejan de otro modo un metal de radioisótopo en el que el reactivo es reactivo con el tiol de la cisteína manipulada del anticuerpo, usando las técnicas descritas en Current Protocols in Immunology, volúmenes 1 y 2, Coligen y col., Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991). Los ligandos quelantes que pueden complejar un ión metálico incluyen DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA (Macrocyclics, Dallas, TX). Los radionúclidos pueden ser elegidos como diana por complejación con los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención (Wu y col. (2005) Nature Biotechnology 23(9): 1137-1146).

[0032] Los reactivos de ligadores tales como DOTA-maleimida (4-maleimidobutiramidobencil-DOTA) pueden prepararse mediante la reacción de aminobencil-DOTA con ácido 4-maleimidobutírico (Fluka) activado con cloroformiato de isopropilo (Aldrich), siguiendo el procedimiento de Axworthy y col. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4): 1802-1807). Los reactivos de DOTA-maleimida reaccionan con los aminoácidos de cisteína libres de los anticuerpos manipulados con cisteína y proporcionan un ligando de complejación con metal sobre el anticuerpo (Lewis y col. (1998) Bioconj. Chem. 9: 72-86). Los reactivos de marcado de ligadores quelantes tales como DOTA-NHS (éster de mono-N-hidroxisuccinimida de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético) están comercialmente disponibles (Macrocyclics, Dallas, TX). La obtención de imágenes diana de receptor con anticuerpos marcados con radionúclido pueden proporcionar un marcador de la activación de la ruta por detección y cuantificación de acumulación progresiva de anticuerpos en tejido tumoral (Albert y col. (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8: 1207-1210). Los radiometales conjugados pueden continuar con degradación intracelular tras la lisosómica.

[0033] Se desvelan complejos de metal-quelato adecuados como marcas de anticuerpo para experimentos de obtención de imágenes: documentos US 5.342.606; US 5.428.155; US 5.316.757; US 5.480.990; US 5.462.725; US 5.428.139; US 5.385.893; US 5.739.294; US 5.750.660; US 5.834.456; Hnatowich y col. (1983) J. Immunol. Methods 65: 147-157; Meares y col. (1984) Anal. Biochem. 142: 68-78; Mirzadeh y col. (1990) Bioconjugate Chem. 1: 59-65; Meares y col. (1990) J. Cancer 1990, Suppl. 10: 21-26; Izard y col. (1992) Bioconjugate Chem. 3: 346-350; Nikula y col. (1995) Nucl. Med. Biol. 22: 387-90; Camera y col. (1993) Nucl. Med. Biol. 20: 955-62; Kukis y col. (1998) J. Nucl. Med. 39: 2105-2110; Verel y col. (2003) J. Nucl. Med. 44: 1663-1670; Camera y col. (1994) J. Nucl. Med. 21: 640-646; Ruegg y col. (1990) Cancer Res. 50: 4221-4226; Verel y col. (2003) J. Nucl. Med. 44: 1663-1670; Lee y col. (2001) Cancer Res. 61: 4474-4482; Mitchell, y col. (2003) J. Nucl. Med. 44: 1105-1112; Kobayashi y col. (1999) Bioconjugate Chem. 10: 103-111; Miederer y col. (2004) J. Nucl. Med. 45: 129-137; DeNardo y col. (1998) Clinical

Cancer Research 4: 2483-90; Blend y col. (2003) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18: 355-363; Nikula y col. (1999) J. Nucl. Med. 40: 166-76; Kobayashi y col. (1998) J. Nucl. Med. 39: 829-36; Mardirossian y col. (1993) Nucl. Med. Biol. 20: 65-74; Roselli y col. (1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14: 209-20.

5 (b) Marcas fluorescentes tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio), tipos de fluoresceína que incluyen FITC, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína; tipos de rodamina que incluyen TAMRA; dansilo; Lissamina; cianinas; ficoeritrinas; Texas Red; y análogos de los mismos. Las marcas fluorescentes pueden conjugarse con anticuerpos usando, por ejemplo, las técnicas develadas en Current Protocols in Immunology, arriba. Colorantes fluorescentes y reactivos de marca fluorescente incluyen aquellos que están comercialmente disponibles
10 de Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR) y Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

(c) Diversas marcas de enzima-sustrato están disponibles o se desvelan (documento US 4275149). La enzima generalmente cataliza una alteración química de un sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse
15 espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Están descritas anteriormente técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente por una reacción química y entonces puede emitir luz que puede medirse (usando, por ejemplo, un quimioluminómetro) o dona energía a un aceptor fluorescente. Algunos ejemplos de marcas enzimáticas incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; documento
20 US 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa. Técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos se describen en O'Sullivan y col. (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates
25 for use in Enzyme Immunoassay", en Methods in Enzym. (ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, Nueva York, 73: 147-166.

[0034] Algunos ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

30 (i) Peroxidasa de rábano picante (HRP) con hidrogenoperoxidasa como sustrato, en el que la hidrogenoperoxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromogénico; y

35 (iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa.

[0035] Están disponibles numerosas otras combinaciones de enzima-sustrato para aquellos expertos en la materia. Para una revisión general véanse los documentos US 4275149 y US 4318980.

[0036] Una marca puede conjugarse indirectamente con una cadena lateral de aminoácido, una cadena lateral de aminoácido activada o un anticuerpo manipulado con cisteína. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de marcas mencionadas anteriormente puede conjugarse con
45 avidina o estreptavidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a estreptavidina y, por tanto, la marca puede conjugarse con el anticuerpo de este modo indirecto. Alternativamente, para lograr la conjugación indirecta de la marca con la variante de polipéptido, la variante de polipéptido se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcas mencionadas anteriormente se conjuga con una variante de polipéptido anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). Por tanto, puede lograrse la conjugación indirecta
50 de la marca con la variante de polipéptido (Hermanson, G. (1996) en Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego).

[0037] El anticuerpo de la presente invención puede emplearse en cualquier procedimiento de ensayo conocido, tal como ELISA, ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos y ensayos
55 de inmunoprecipitación (Zola, (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pág. 147-158, CRC Press, Inc.).

[0038] Una marca de detección puede ser útil para localizar, visualizar y cuantificar un evento de unión o reconocimiento. Los anticuerpos marcados de la invención pueden detectar receptores de la superficie celular. Otro

uso para los anticuerpos detectablemente marcados es un procedimiento de inmunocaptura basada en perlas que comprende conjugar una perla con un anticuerpo marcado fluorescente y detectar una señal de fluorescencia tras la unión de un ligando. Las metodologías de detección de la unión similares utilizan el efecto de la resonancia de plasmones superficiales (SPR) para medir y detectar interacciones anticuerpo-antígeno.

5

[0039] Las marcas de detección tales como colorantes fluorescentes y colorantes quimioluminiscentes (Briggs y col. (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids" J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1: 1051-1058) proporcionan una señal detectable y generalmente son aplicables al marcado de anticuerpos, preferentemente con las siguientes propiedades: (i) el anticuerpo marcado debería producir una señal muy alta con bajo ruido de manera que pequeñas cantidades de anticuerpos pudieran detectarse con sensibilidad tanto en ensayos sin células como basados en células; y (ii) el anticuerpo marcado debería ser fotoblanqueamiento significativo. Para aplicaciones que implican la unión a la superficie celular del anticuerpo marcado a membranas o superficies celulares, especialmente células vivas, las marcas preferentemente (iii) tienen buena solubilidad en agua para lograr concentración de conjugado y sensibilidad de detección eficaces y (iv) son no tóxicas para células vivas de manera que no alteran los procesos metabólicos normales de las células ni producen muerte celular prematura.

[0040] La cuantificación directa de la intensidad de fluorescencia celular y la enumeración de eventos fluorescentemente marcados, por ejemplo, unión a la superficie celular de conjugados de péptido-colorante pueden realizarse en un sistema (sistema FMAT® 8100 HTS, Applied Biosystems, Foster City, Calif.) que automatiza ensayos no radiactivos de mezcla y lectura, con células vivas o perlas (Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4: 193-204). Los usos de anticuerpos marcados también incluyen ensayos de unión a receptor de la superficie celular, ensayos de inmunocaptura, ensayos inmunoabsorbentes ligados a fluorescencia (FLISA), escisión de caspasas (Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo" (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 618-23; documento US 6.372.907), apoptosis (Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods 184: 39-51) y ensayos de citotoxicidad. La tecnología de ensayo de microvolúmenes fluorométricos puede usarse para identificar la regulación por incremento o por disminución por una molécula que es elegida como diana para la superficie celular (Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271: 143-51).

[0041] Los anticuerpos marcados de la invención son útiles como biomarcadores y sondas de obtención de imágenes por los diversos procedimientos y técnicas de obtención de imágenes biomédicas y moleculares tales como:

(i) RMN (resonancia magnética nuclear); (ii) MicroCT (tomografía computerizada); (iii) SPECT (tomografía computerizada por emisión de fotón único); (iv) PET (tomografía de emisión de positrones) Chen y col. (2004) Bioconjugate Chem. 15: 41-49; (v) bioluminiscencia; (vi) fluorescencia; y (vii) ultrasonidos. La inmunoescintigrafía es un procedimiento de obtención de imágenes en el que anticuerpos marcados con sustancias radiactivas se administran a un animal o paciente humano y se toma una imagen de sitios en el cuerpo en los que se localiza el anticuerpo (documento US 6528624). Los biomarcadores de obtención de imágenes pueden medirse objetivamente y evaluarse como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Los biomarcadores pueden ser de varios tipos: tipo 0 son marcadores de historia de una enfermedad y establecen una correlación longitudinal con índices clínicos conocidos, por ejemplo, evaluación de RMN de inflamación sinovial en artritis reumatoide; los marcadores de tipo I capturan el efecto de una intervención según un mecanismo de acción, aún cuando el mecanismo pueda no asociarse a desenlace clínico; los marcadores de tipo II sirven de criterios de valoración sustitutos en los que el cambio en, o señal de, el biomarcador predice un beneficio clínico para "validar" la respuesta elegida como diana, tal como la erosión ósea medida en artritis reumatoide por CT. Por tanto, los biomarcadores de obtención de imágenes pueden proporcionar información terapéutica farmacodinámica (PD) sobre: (i) expresión de una proteína diana, (ii) unión de un agente terapéutico a la proteína diana, es decir, selectividad, y (iii) datos farmacocinéticos de eliminación y semivida. Las ventajas de biomarcadores de obtención de imágenes *in vivo* con respecto a biomarcadores basados en laboratorio incluyen: tratamiento no invasivo, cuantificable, evaluación del cuerpo entero, dosificación y evaluación repetitiva, es decir, múltiples momentos de tiempo, y efectos posiblemente transferibles de resultados preclínicos (animal pequeño) a clínicos (ser humano). Para algunas aplicaciones, la obtención de imágenes biológicas suplanta o minimiza el número de experimentos en animales en estudios preclínicos.

- [0042]** Los procedimientos de marcado de péptidos son muy conocidos. Véanse Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3: 2; Garman, (1997) *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, Londres; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1: 2; Glazer y col. (1975) *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (T. S. Work y E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., Nueva York; Lundblad, R. L. y Noyes, C. M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I y II, CRC Press, Nueva York; Pfeleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", *Modern Methods in Protein Chemistry*, H. Tschesche, Ed., Walter de Gruyter, Berlin y Nueva York; y Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez y col. (2004) *Chem. Eur. J.* 10: 1149-1155; Lewis y col. (2001) *Bioconjugate Chem.* 12: 320-324; Li y col. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13: 110-115; Mier y col. (2005) *Bioconjugate Chem.* 16: 240-237.
- 15 **[0043]** Los péptidos y proteínas marcados con dos restos, un indicador fluorescente e inhibidor de la fluorescencia, en suficiente proximidad se someten a transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Los grupos indicadores son normalmente colorantes fluorescentes que son excitados por luz a cierta longitud de onda y transfieren energía a un grupo aceptor, o inhibidor de la fluorescencia, con el desplazamiento de Stokes apropiado para la emisión a brillo máximo. Los colorantes fluorescentes incluyen moléculas con aromaticidad prolongada, tales como fluoresceína y rodamina, y sus derivados. El indicador fluorescente puede inhibirse parcialmente o significativamente por el resto inhibidor de la fluorescencia en un péptido intacto. Tras la escisión del péptido por una peptidasa o proteasa puede medirse un aumento detectable en la fluorescencia (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assay of Proteolytic Enzymes, *Methods in Enzymology*, Academic Press, 248: 18-34).
- 25 **[0044]** Los anticuerpos marcados de la invención también pueden usarse como agente de purificación por afinidad. En este procedimiento, el anticuerpo marcado se inmoviliza sobre una fase sólida tal una resina Sephadex o papel de filtro usando procedimientos muy conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el antígeno que va a purificarse, y después el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra, excepto el antígeno que va a purificarse, que está unido a la variante de polipéptido inmovilizada. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón glicina, pH 5,0, que liberará el antígeno de la variante de polipéptido.
- 35 **[0045]** Los reactivos de marcado normalmente llevan funcionalidad reactiva que puede reaccionar (i) directamente con un tiol de la cisteína de un anticuerpo manipulado con cisteína para formar el anticuerpo marcado, (ii) con un reactivo de ligador para formar un producto intermedio de ligador-marca, o (iii) con un anticuerpo de ligador para formar el anticuerpo marcado. La funcionalidad reactiva de reactivos de marcado incluye: maleimida, haloacetilo, yodoacetamida, éster de succinimidilo (por ejemplo, NHS, N-hidroxisuccinimida), isotiocianato, cloruro de sulfonilo, 2,6-diclorotriazinilo, éster de pentafluorofenilo y fosforamidito, aunque también pueden usarse otros grupos funcionales.
- 40 **[0046]** Un grupo funcional reactivo a modo de ejemplo es éster de N-hidroxisuccinimidilo (NHS) de un sustituyente de grupo carboxilo de una marca detectable, por ejemplo, biotina o un colorante fluorescente. El éster de NHS de la marca puede formarse previamente, aislarse, purificarse y/o caracterizarse, o puede formarse *in situ* y hacerse reaccionar con un grupo nucleófilo de un anticuerpo. Normalmente, la forma carboxilo de la marca se activa haciendo reaccionar con alguna combinación de un reactivo de carbodiimida, por ejemplo, dicitlohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida, o un reactivo de uronio, por ejemplo, TSTU (tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio), HBTU (hexafluorofosfato de (O-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio) o HATU (hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio), un activador, tal como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), y N-hidroxisuccinimida para dar el éster de NHS de la marca. En algunos casos, la marca y el anticuerpo pueden acoplarse por activación *in situ* de la marca y reacción con el anticuerpo para formar el conjugado de marca-anticuerpo en una etapa. Otros reactivos activantes y de acoplamiento incluyen TBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazo-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio), TFFH (2-fluoro-hexafluorofosfato de N,N',N'',N'''-tetrametiluronio), PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio), EEDQ (2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidro-quinolina), DCC (dicitlohexilcarbodiimida); DIPCDI (diisopropilcarbodiimida), MSNT (1-(mesitilen-2-sulfonil)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol) y haluros arilsulfonilo, por ejemplo, cloruro de triisopropilbencenosulfonilo.

Compuestos de péptido de unión a albúmina-Fab de la invención:

[0047] En un aspecto, el anticuerpo de la invención está fusionado con una proteína de unión a albúmina. La unión de la proteína a plasma puede ser un medio eficaz para mejorar las propiedades farmacocinéticas de las moléculas de vida corta. La albúmina es la proteína más abundante en el plasma. Los péptidos de unión a albúmina del suero (ABP) pueden alterar la farmacodinámica de proteínas de dominios activos fusionadas que incluyen alteración de la captación, penetración y difusión en tejido. Estos parámetros farmacodinámicos pueden modularse por selección específica de la secuencia de péptidos de unión a la albúmina del suero apropiada (documento US 20040001827). Una serie de péptidos de unión a albúmina se identificaron por cribados de expresión in fago (Dennis y col. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277: 35035-35043; documento WO 01/45746). Los compuestos de la invención incluyen secuencias de ABP enseñadas por: (i) Dennis y col. (2002) J Biol Chem. 277: 35035-35043 en las tablas III y IV, página 35038; (ii) documento US 20040001827 en las SEQ ID NOS: 9-22; y (iii) el documento WO 01/45746 en las páginas 12-13. Los La unión a albúmina (ABP)-Fab son manipulados fusionando un péptido de unión a albúmina con, por ejemplo, el extremo C de la cadena pesada de Fab en la relación estequiométrica 1: 1 (1 ABP / 1 Fab). Se mostró que la asociación de estos ABP-Fab con albúmina aumentó la semivida de los anticuerpos más de 25 veces en conejos y ratones. Por tanto, los residuos de Cys reactivos anteriormente descritos pueden introducirse en estos ABP-Fab y usarse para la conjugación específica para sitio con fármacos citotóxicos, seguido de estudios en animales *in vivo*.

[0048] Secuencias de péptidos de unión a albúmina a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, las secuencias de aminoácidos enumeradas en SEQ ID NO: 80-84.

20	CDKTHGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO: 80
	QRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO: 81
	QRLIEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO: 82
	RLIEDICLPRWGCLWEDD	SEQ ID NO: 83
	DICLPRWGCLW	SEQ ID NO: 84

Conjugados de anticuerpo-fármaco

[0049] En otro aspecto, la invención proporciona inmunocombinados, o combinados de anticuerpo-fármaco (ADC), que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado). En otro aspecto, la invención proporciona además procedimientos de uso de los inmunocombinados. En un aspecto, un inmunocombinado comprende cualquiera de los anticuerpos anti-STEAP-1 anteriores covalentemente unidos a un agente citotóxico o un agente detectable.

[0050] El uso de combinados de anticuerpo-fármaco para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19: 605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26: 151-172; patente de EE.UU. 4.975.278) permite la administración elegida como diana del resto de fármaco a tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, en los que la administración sistémica de estos agentes de fármaco sin conjugar puede producir niveles inaceptables de toxicidad para células normales, además de las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin y col., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986): 603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review" en *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, A. Pinchera y col. (ed.s), pág. 475-506). Así se busca la máxima eficacia con la mínima toxicidad. Se ha informado de tanto anticuerpos policlonales como de anticuerpos monoclonales útiles en estas estrategias (Rowland y col., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183-87). Los fármacos usados en estos procedimientos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland y col., (1986), arriba). Las toxinas usadas en combinados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas de plantas tales como ricina, toxinas de moléculas pequeñas tales como geldanamicina (Mandler y col. (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581; Mandler y col. (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028; Mandler y col. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13: 786-791), maitansinoides (EP 1391213; Liu y col., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623) y caliqueamicina (Lode y col. (1998) *Cancer Res.* 58: 2928; Hinman y col. (1993) *Cancer Res.* 53: 3336-3342). Las toxinas pueden efectuar sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos de receptores de proteínas.

[0051] ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un combinado de anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido contra el antígeno CD20 encontrado sobre la superficie de

linfocitos B normales y malignos y radioisótopo ^{111}In o ^{90}Y unido por un quelante de ligador de tiourea (Wiseman y col. (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7): 766-77; Wiseman y col. (2002) Blood 99(12): 4336-42; Witzig y col. (2002) J. Clin. Oncol. 20(10): 2453-63; Witzig y col. (2002) J. Clin. Oncol. 20(15): 3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra linfoma no Hodgkin (LNH) de linfocitos B, la administración produce citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo huCD33 ligado a caliqueamicina, fue aprobado en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7): 686; patentes de EE.UU. Nº 4.970.198; 5.079.233; 5.585.089; 5.606.040; 5.693.762; 5.739.116; 5.767.285; 5.773.001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 ligado por el ligador de disulfuro SPP al resto de fármacos maitansinoides, DM1, está avanzando a ensayos de fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal anti-antígeno prostático específico de membrana (PSMA) ligado al resto de fármacos maitansinoides, DM1, está en desarrollo para el posible tratamiento de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, se conjugaron con anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específicos para CD30 en tumores malignos hematológicos) (Doronina y col. (2003) Nature Biotechnology 21(7): 778-784) y están en desarrollo terapéutico.

20 **[0052]** Se describen en este documento agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados. Toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcinas, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Está disponible una variedad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re . Se preparan conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehidos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col. (1987) Science, 238: 1098. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo (documento WO94/11026).

40 **[0053]** Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, auristatinas, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan en este documento.

Maitansina y maitansinoides

45 **[0054]** En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo (longitud completa o fragmentos) de la invención conjugado con una o más moléculas de maitansinoide.

50 **[0055]** Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. Nº 3.896.111). Posteriormente se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de EE.UU. Nº 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nº 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

55 **[0056]** Los restos de fármacos maitansinoides son restos de fármaco en conjugados de anticuerpo-fármaco debido a que son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) favorecen la derivatización con grupos funcionales adecuados para la conjugación mediante ligadores de no disulfuro con anticuerpos, (iii) estables en plasma, y (iv) eficaces contra una variedad de

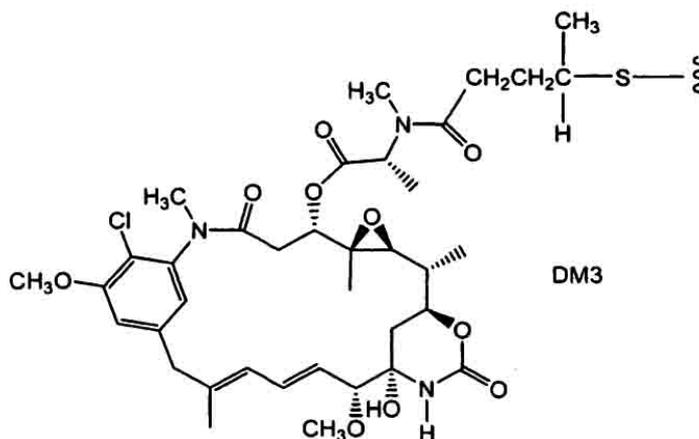
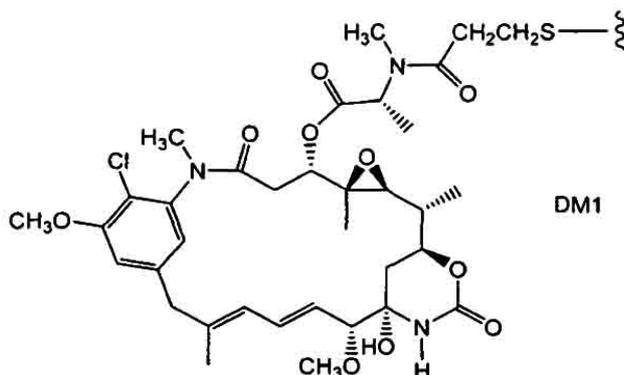
líneas celulares tumorales.

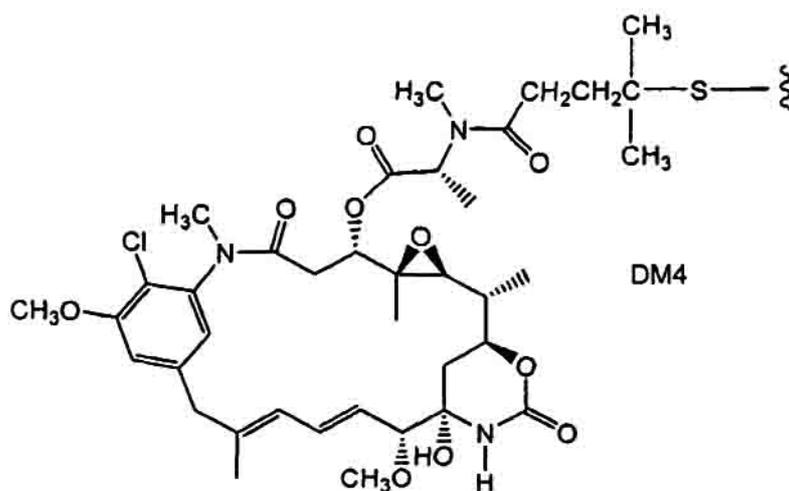
[0057] Los compuestos de maitansina adecuados para su uso como restos de fármacos maitansinoides son muy conocidos en la técnica y pueden aislarse de fuentes naturales según procedimientos conocidos, pueden producirse usando técnicas de manipulación genética (véase Yu y col. (2002) PNAS 99: 7968-7973), o el maitansinol y análogos del maitansinol pueden prepararse sintéticamente según procedimientos conocidos.

[0058] Los restos de fármacos maitansinoides a modo de ejemplo incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado, tal como: C-19-descloro (documento US 4256746) (preparado por reducción con hidruro de litio y aluminio de ansamitocina P2); C-20-hidroxi (o C-20-desmetilo) +/-C-19-descloro (patentes de EE.UU. N° 4361650 y 4307016) (preparado por desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* o decloración usando LAH); y C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (patente de EE.UU. N° 4.294.757) (preparado por acilación usando cloruros de acilo) y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones

[0059] Los restos de fármacos maitansinoides a modo de ejemplo también incluyen aquellos que tienen modificaciones tales como: C-9-SH (documento US 4424219) (preparado por la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅); C-14-alcoximetilo (desmetoxi/CH₂ OR) (documento US 4331598); C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH₂OH o CH₂OAc) (documento US 4450254) (preparado a partir de *Nocardia*); C-15-hidroxi/aciloxi (documento US 4.364.866) (preparado por la conversión de maitansinol por *Streptomyces*); C-15-metoxi (patentes de EE.UU. N° 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de *Trewia nudiflora*); C-18-N-desmetilo (patentes de EE.UU. N° 4.362.663 y 4.322.348) (preparado por la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y 4,5-desoxi (documento US 4371533) (preparado por la reducción con tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

[0060] Las realizaciones a modo de ejemplo de restos de fármacos maitansinoides incluyen: DM 1; DM3; y DM4, que tienen las estructuras:

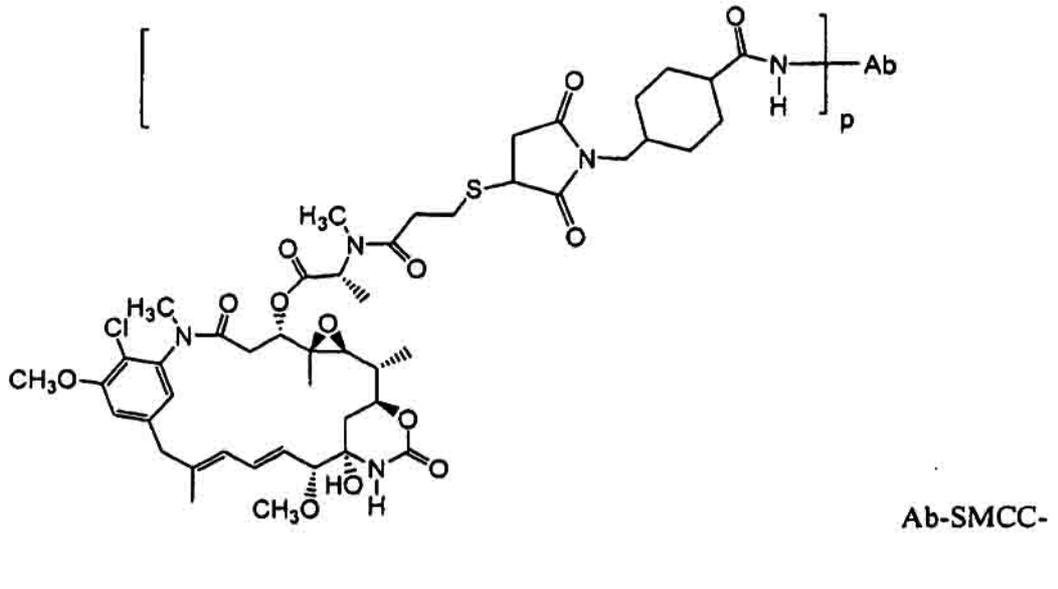
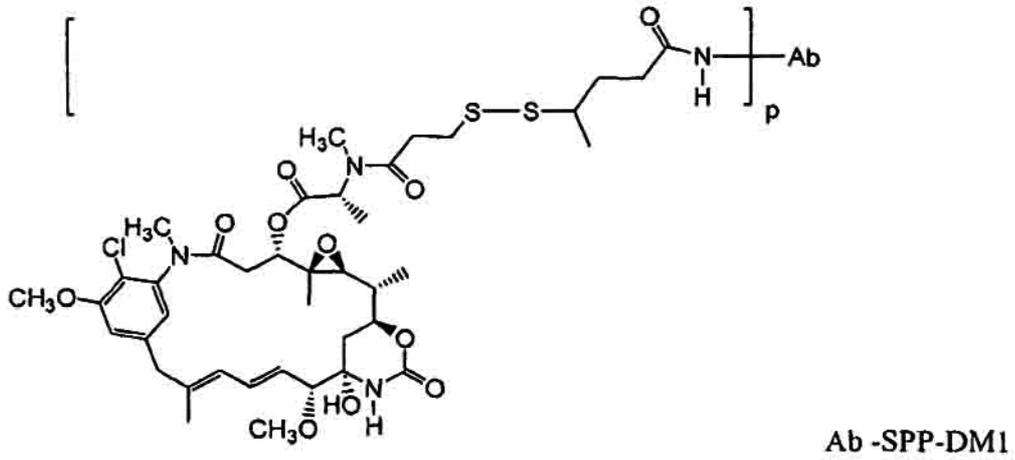




en las que la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre del fármaco con un ligador (L) de un conjugado de anticuerpo-fármaco. Se ha informado de HERCEPTIN® (trastuzumab) ligado por SMCC a DM1 5 (documento WO 2005/037992).

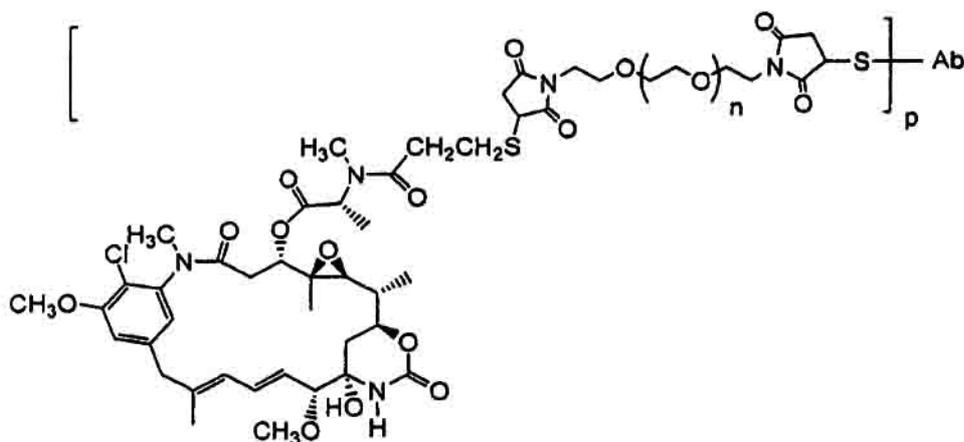
Un conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención puede prepararse según los procedimientos desvelados en el presente documento.

- 10 **[0061]** Otros conjugados de anticuerpo-fármaco maitansinoides a modo de ejemplo tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (en las que Ab es anticuerpo y p es 1 a aproximadamente 8):



[0062] Conjugados de anticuerpo-fármaco a modo de ejemplo en los que DM1 está ligado por un ligador de BMPEO con un grupo tiol del anticuerpo tienen la estructura y abreviatura:

5



en la que Ab es anticuerpo; n es 0, 1 o 2; y p es 1, 2, 3 o 4.

- 5 **[0063]** Los inmunocombinados que contienen maitansinoides, procedimientos de preparaci3n de los mismos y su uso terap3utico se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N3 5.208.020; 5.416.064; 6.441.163 y la patente europea EP 0 425 235 B1.

Liu y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) describieron inmunocombinados que comprenden un maitansinoide designado DM1 ligado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el c3ncer colorrectal humano. Se encontr3 que el combinado era altamente citot3xico hacia c3lulas de c3ncer de colon cultivadas y mostr3 actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari y col., Cancer Research 52: 127-131 (1992) describen inmunocombinados en los que un maitansinoide se combin3 mediante un ligador de disulfuro con el anticuerpo A7 murino que se une a un ant3geno en l3neas de c3lulas de c3ncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al onc3gen HER-2/neu. La citotoxicidad del combinado de TA.1-maitansinoide se prob3 *in vitro* en la l3nea celular de c3ncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 ant3genos de superficie HER-2 por c3lula. El combinado de f3rmaco alcanz3 un grado de citotoxicidad similar al f3rmaco maitansinoide libre, que podr3 aumentarse aumentando el n3mero de mol3culas de maitansinoide por mol3cula de anticuerpo. El combinado de A7-maitansinoide mostr3 baja citotoxicidad sist3mica en ratones.

20 **[0064]** Los combinados de anticuerpo anti-STEAP-1-maitansinoide se preparan ligando qu3micamente un anticuerpo con una mol3cula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biol3gica de tanto el anticuerpo como la mol3cula de maitansinoide. V3ase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N3 5.208.020. Un promedio de 3-4 mol3culas de maitansinoide combinadas por mol3cula de anticuerpo ha mostrado eficacia en potenciar la citotoxicidad de c3lulas diana sin afectar negativamente la funci3n o solubilidad del anticuerpo, aunque incluso se esperar3a que una mol3cula de toxina/anticuerpo potenciara la citotoxicidad con respecto al uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son muy conocidos en la t3cnica y pueden sintetizarse por t3cnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Maitansinoides adecuados se desvelan, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N3 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones de no patente citadas anteriormente en este documento. Maitansinoides preferidos son maitansinol y an3logos de maitansinol modificados en el anillo arom3tico o en otras posiciones de la mol3cula de maitansinol, tal como diversos 3steres de maitansinol.

35 **[0065]** Hay muchos grupos de enlace conocidos en la t3cnica para preparar combinados de anticuerpo-maitansinoide que incluyen, por ejemplo, los desvelados en las patentes de EE.UU. N3 5.208.020, 6.441.163, o la patente EP 0 425 235 B1, Chari y col., Cancer Research 52: 127-131 (1992), y el documento US 2005/0169933 A1. Los combinados de anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente de ligador SMCC pueden prepararse como se desvela en la solicitud de patente de EE.UU. N3 11/141344 presentada el 31 de mayo de 2005, "Antibody Drug Conjugate and Methods", publicaci3n N3 US 2005/0276812. Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tio3ter, grupos l3biles 3cidos, grupos fotol3biles, grupos l3biles de peptidasa o l3biles de esterasa, como se desvela en las patentes anteriormente identificadas. Grupos de enlace adicionales se describen y ejemplifican en este documento.

40 **[0066]** Los combinados del anticuerpo y el maitansinoide pueden prepararse usando una variedad de agentes de acoplamiento de prote3nas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-

maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzono). Agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) (Carlsson y col., Biochem. J. 173: 723-737 (1978)) y 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

[0067] El ligador puede unirse a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster mediante la reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede producirse en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en posición la C-3 del maitansinol o un análogo de maitansinol.

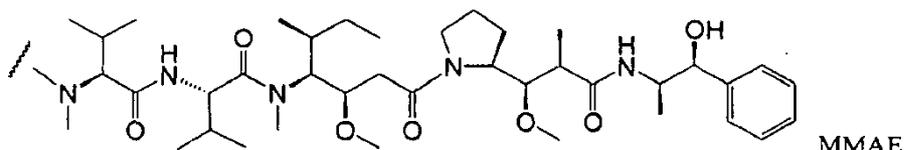
[0068] En una realización, cualquiera de los anticuerpos de la invención (longitud completa o fragmento) está conjugado con una o más moléculas de maitansinoide. En una realización del inmunoconjugado, el agente citotóxico D es un maitansinoide DM1. En una realización del inmunoconjugado, el ligador se selecciona del grupo que consiste en SPDP, SMCC, IT, SPDP y SPP.

Auristatinas y dolostatinas

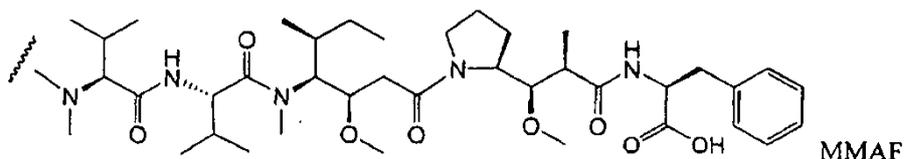
[0069] En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con dolastatinas o análogos y derivados peptídicos de dolostatina, las auristatinas (patentes de EE.UU. N° 5.635.483; 5.780.588). Se ha mostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, hidrólisis de GTP y división nuclear y celular (Woyke y col. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (documento US 5.663.149) y antifúngica (Pettit y col. (1998) Antimicrob. Agents and Chemother. 42: 2961-2965). El resto del fármaco dolostatina o auristatina puede unirse al anticuerpo mediante el extremo N (amino) o el extremo C (carboxilo) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172).

[0070] Realizaciones de auristatina a modo de ejemplo incluyen el extremo N ligado a restos del fármaco monometilauristatina DE y DF, desvelado en "Senter y col., Proceedings of the American Association for Cancer Research, volumen 45, resumen número 623, presentado el 28 de marzo de 2004.

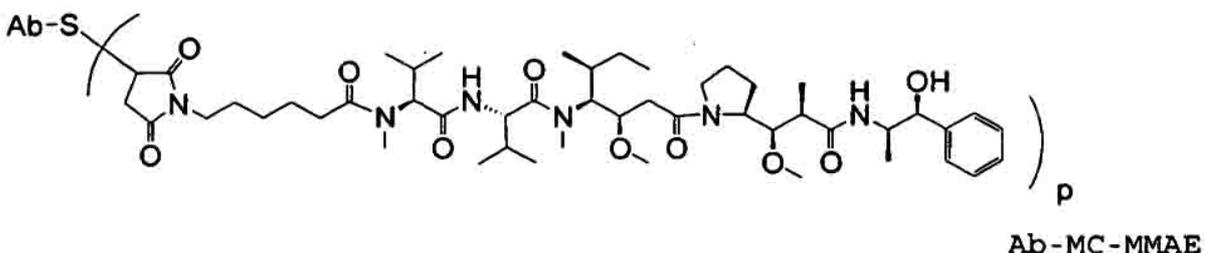
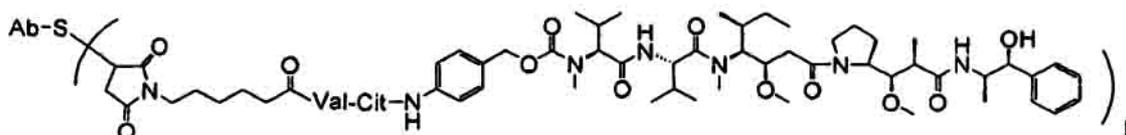
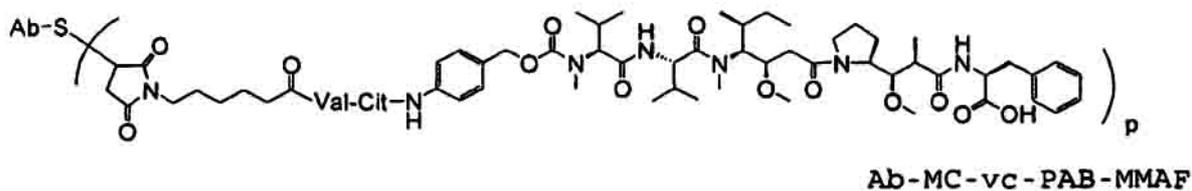
[0071] Una realización de auristatina a modo de ejemplo es MMAE (en la que la línea ondulada indica la unión covalente con un ligador (L) de un conjugado de anticuerpo-fármaco).



[0072] Otra realización de auristatina a modo de ejemplo es MMAF, en la que la línea ondulada indica la unión covalente con un ligador (L) de un conjugado de anticuerpo-fármaco (documento US 2005/0238649):



[0073] Las realizaciones adicionales a modo de ejemplo que comprenden MMAE o MMAF y diversos componentes de ligador (descritos adicionalmente en este documento) tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (en las que Ab significa anticuerpo y p es 1 a aproximadamente 8):



- 5 **[0074]** Normalmente, los restos de fármaco basados en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptido. Tales enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, según el procedimiento de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pág. 76-136, 1965, Academic Press) que es muy conocido en el campo de la química de los péptidos. Los restos del fármaco auristatina/dolastatina pueden prepararse según los procedimientos de: documentos US 5.635.483; US
- 10 5.780.588; Pettit y col. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465; Pettit y col. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13: 243-277; Pettit, G.R., y col. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit y col. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5: 859-863; y Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7): 778-784.

Caliqueamicina

15

- [0075]** En otras realizaciones, el inmunoc conjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina puede producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones inferiores a picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina véanse las patentes de 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710,
- 20 5.773.001, 5.877.296 (todas a American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de la caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ^1_1 (Hinman y col., Cancer Research 53: 3336-3342 (1993), Lode y col., Cancer Research 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de EE.UU. anteriormente mencionadas a American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que puede conjugarse el anticuerpo es QFA

que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios de acción intracelular y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por tanto, la captación celular de estos agentes por la internalización mediada por anticuerpos potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

5 Otros agentes citotóxicos

[0076] Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozoicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida conjuntamente el complejo LL-E33288 descrito en las patentes de EE.UU. 5.053.394, 5.770.710, además de esperamicinas (patente de EE.UU. 5.877.296).

[0077] Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

[0078] La presente invención contempla adicionalmente un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; ADNsa).

[0079] Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Están disponibles una variedad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Si el conjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo, Tc^{99m} o I^{123} , o una marca de espín para la obtención de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como obtención de imágenes de resonancia magnética, irm), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

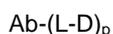
[0080] Las radiomarcas u otras marcas pueden incorporarse en el conjugado de formas conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcas tales como Tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} pueden unirse por un residuo de cisteína en el péptido. Itrio-90 puede unirse por un residuo de lisina. El procedimiento IODOGEN (Fraker y col. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros procedimientos en detalle.

[0081] Los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico pueden prepararse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El ligador puede ser un "ligador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un ligador lábil de ácido, ligador sensible a peptidasa, ligador fotolábil, ligador de dimetilo o ligador que contiene disulfuro (Chari y col., Cancer Research 52: 127-131 (1992); patente de EE.UU. Nº 5.208.020).

[0082] Los compuestos de la invención contemplan expresamente, pero no se limitan a, ADC preparado con reactivos de ligador cruzado: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están comercialmente disponibles (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU.). Véanse las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco

[0083] En los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención, un anticuerpo (Ab) está conjugado con uno o más restos de fármaco (D), por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de fármaco por anticuerpo, mediante un ligador (L). En una realización, el número de restos de fármaco (D) por anticuerpo es de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, alternativamente de aproximadamente 2 a aproximadamente 6, alternativamente de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, alternativamente de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 restos de fármaco por anticuerpo. Debido a que el número de restos de fármaco por anticuerpo es normalmente un número promedio con respecto a todos los conjugados en una población de un conjugado de anticuerpo-fármaco, el número de restos de fármaco por anticuerpo puede no ser un número entero. El ADC de fórmula I puede prepararse por varias rutas empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos para aquellos expertos en la materia que incluyen: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo de ligador bivalente para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo de ligador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Procedimientos adicionales para preparar ADC se describen en el presente documento.

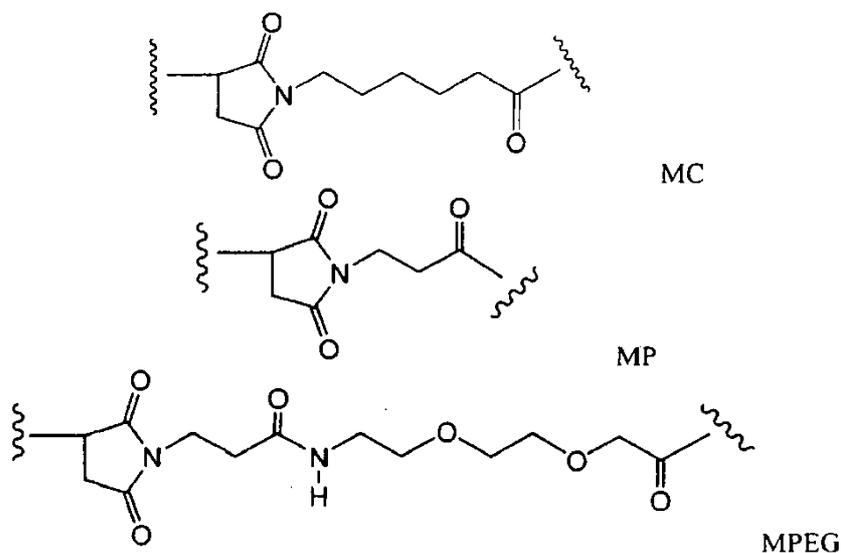


Fórmula I

[0084] El ligador puede estar compuesto por uno o más componentes de ligador. Componentes de ligador a modo de ejemplo incluyen 6-maleimidocaproílo ("MC"), maleimidopropanoílo ("MP"), valina-citulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxicarbonilo ("PAB"), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo ("SPP"), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo ("SMCC") y (4-yodo-acetil)aminobenzoato de N-succinimidilo ("SIAB"). En una realización, el ligador es valina-citulina-p-aminobenciloxicarbonilo ("vc-PAB"). Componentes de ligador adicionales se conocen en la técnica y algunos se describen en este documento.

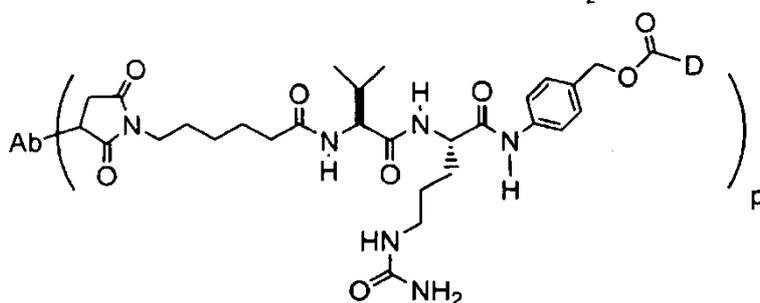
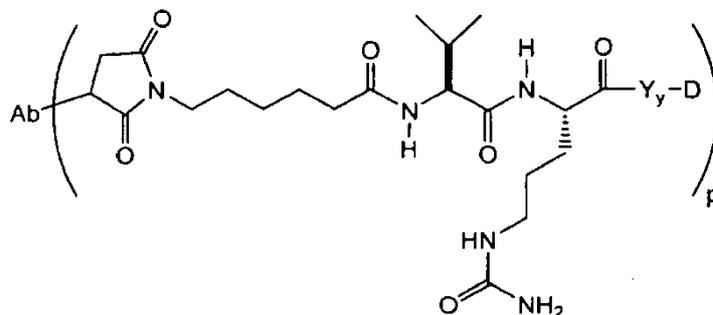
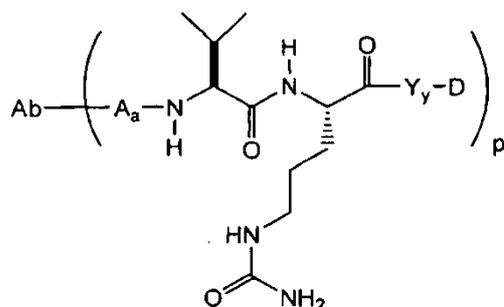
[0085] En algunas realizaciones, el ligador puede comprender residuos de aminoácidos. Componentes de ligador de aminoácidos a modo de ejemplo incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Dipéptidos a modo de ejemplo incluyen: valina-citulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Tripéptidos a modo de ejemplo incluyen: glicina-valina-citulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Residuos de aminoácidos que comprenden un componente de ligador de aminoácidos incluyen aquellos que se producen naturalmente, además de aminoácidos menores y análogos de aminoácidos que se producen no naturalmente, tales como citulina. Los componentes de ligador de aminoácidos pueden diseñarse y optimizarse en su selectividad para escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa de plasmina.

[0086] Se muestran a continuación estructuras de componentes de ligador a modo de ejemplo (en las que la línea ondulada indica sitios de unión covalente a otros componentes del ADC):



40

[0087] Componentes de ligador a modo de ejemplo adicionales y abreviaturas incluyen (en las que el anticuerpo (Ab) y el ligador se representan, y p es 1 a aproximadamente 8):



[0088] Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amina del extremo N, (ii) grupos amina de la cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcar en los que el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de ligador y reactivos de ligador que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros entre cadenas reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos de ligador mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotretol). Por tanto, cada puente de cisteína formará teóricamente dos nucleófilos de tiol reactivos. Grupos nucleófilos adicionales pueden introducirse en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) produciendo la conversión de una amina en un tiol. Pueden introducirse grupos tiol reactivos en el anticuerpo (o fragmento del mismo) introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más residuos de aminoácidos de cisteína no nativos).

[0089] Los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención también pueden producirse por modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo de ligador o fármaco. Los azúcares de anticuerpos glicosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos de ligador o restos de fármaco. Los grupos de base de Schiff de iminas resultantes pueden formar un enlace estable, o

pueden reducirse, por ejemplo, por reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la porción de hidrato de carbono de un anticuerpo glicosilado con tanto galactosa oxidasa como meta-peryodato de sodio pueden dar grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, las proteínas que contienen residuos de serina o treonina del extremo N pueden reaccionar con meta-peryodato de sodio, produciendo la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3: 138-146; documento US 5362852). Tal aldehído puede hacerse reaccionar con un resto de fármaco o nucleófilo ligador.

10 **[0090]** Asimismo, los grupos nucleófilos en un resto de fármaco incluyen, pero no se limitan a: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida que pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de ligador y reactivos de ligador que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida.

15

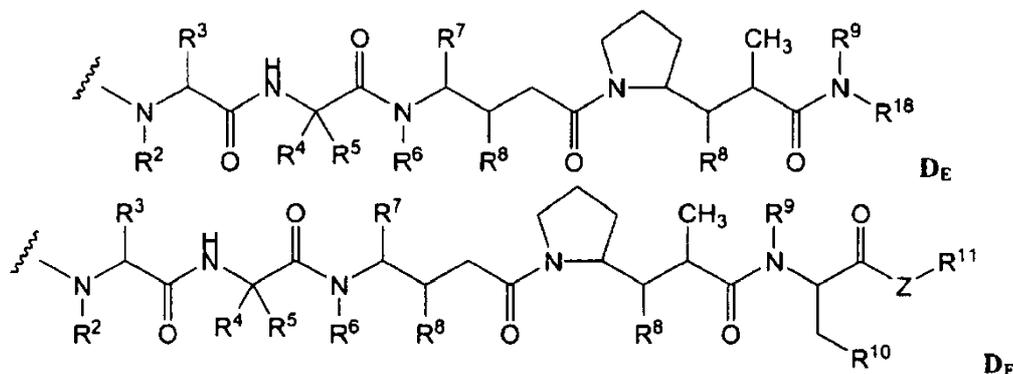
[0091] Los procedimientos para la conjugación de ligador-restos de fármaco con las proteína elegidas como diana para célula tales como anticuerpos, inmunoglobulinas o fragmentos de los mismos se encuentran, por ejemplo, en los documentos US5.208.020; US6.441.163; WO2005037992; WO2005081711; y WO2006/034488.

20 **[0092]** Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico puede prepararse, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado tanto adyacentes entre sí como separadas por una región que codifica un péptido ligador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

25 **[0093]** En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como estreptavidina) para la utilización en la elección previa como diana de tumores en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de limpieza y luego administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

30

[0094] En una realización del inmunoconjugado, el agente citotóxico, D, es una auristatina de fórmula D_E o D_F



35

y en las que R² y R⁶ son cada uno metilo, R³ y R⁴ son cada uno isopropilo, R⁷ es sec-butilo, cada R⁸ se selecciona independientemente de CH₃, O-CH₃, OH y H; R⁹ es H; R¹⁰ es arilo; Z es -O- o -NH-; R¹¹ es H, alquilo C₁-C₈ o (CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₃; y R¹⁸ es -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-arilo; y (d) p oscila de aproximadamente 1 a 8.

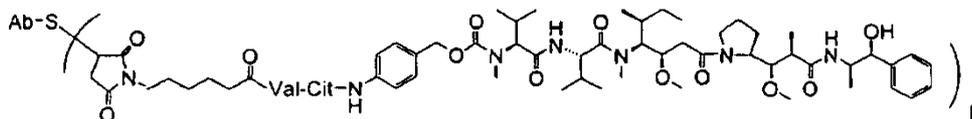
40

[0095] Las siguientes realizaciones se proporcionan adicionalmente para cualquiera de los inmunoconjugados anteriores. En una realización, un inmunoconjugado tiene actividad destructora de células *in vitro* o *in vivo*. En una realización, el ligador está unido al anticuerpo mediante un grupo tiol sobre el anticuerpo. En una realización, el ligador es escindible por una proteasa. En una realización, el ligador comprende un dipéptido val-cit. En una realización, el ligador comprende una unidad de p-aminobencilo. En una realización, la unidad de p-aminobencilo está dispuesta entre el fármaco y un sitio de escisión de proteasa en el ligador. En una realización, la unidad de p-aminobencilo es p-aminobenciloxycarbonilo (PAB). En una realización, el ligador comprende 6-maleimidocaproílo. En

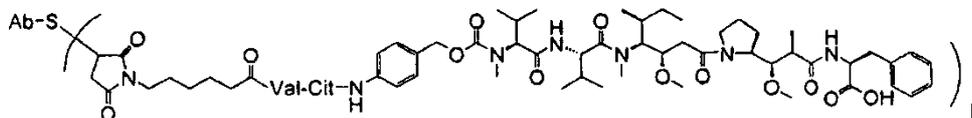
45

una realización, el 6-maleimidocaproílo está dispuesto entre el anticuerpo y un sitio de escisión de proteasa en el ligador. Las realizaciones anteriores pueden producirse individualmente o en cualquier combinación entre sí.

[0096] En una realización, el fármaco se selecciona de MMAE y MMAF. En una realización, el 5 inmunoconjugado tiene la fórmula



en la que Ab es cualquiera de los anticuerpos anti-STEAP-1 anteriores, S es un átomo de azufre y p oscila de 10 aproximadamente 2 a aproximadamente 5. En una realización, el inmunoconjugado tiene la fórmula



en la que Ab es cualquiera de los anticuerpos anti-STEAP-1 anteriores, S es un átomo de azufre y p oscila de 15 aproximadamente 1 a aproximadamente 6, de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, de aproximadamente 2 a aproximadamente 6, de aproximadamente 2 a aproximadamente 4, de aproximadamente 2 a aproximadamente 3, de aproximadamente 3 a aproximadamente 4, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5, de aproximadamente 3 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 4 a aproximadamente 6.

20 Procedimientos de obtención de imágenes de anticuerpos marcados:

[0097] En otra realización de la invención, los anticuerpos manipulados con cisteína pueden marcarse mediante el tiol de la cisteína con radionúclidos, colorantes fluorescentes, restos de sustratos desencadenantes de bioluminiscencia, restos de sustratos desencadenantes de quimioluminiscencia, enzimas y otras marcas de 25 detección para experimentos de obtención de imágenes con aplicaciones de diagnóstico, farmacodinámicas y terapéuticas. Generalmente, el anticuerpo marcado manipulado con cisteína, es decir, "biomarcador" o "sonda", se administra mediante inyección, perfusión o ingestión oral a un organismo vivo, por ejemplo, ser humano, roedor u otro animal pequeño, un órgano perfundido o muestra de tejido. La distribución de la sonda se detecta durante un transcurso de tiempo y se representa por una imagen.

30

Artículos de fabricación:

[0098] Se proporciona un artículo de fabricación, o "kit", que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto 35 sobre o asociado al recipiente. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, envase alveolado, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente 40 activo en la composición es un ADC. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección, tal como cáncer. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable tal como agua bacteriostática para inyección (BWF1), solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Adicionalmente puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del 45 usuario que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Composiciones farmacéuticas:

[0099] En un aspecto se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los 50 inmunoconjugados anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede usarse en un procedimiento para tratar un trastorno proliferativo de células de la próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario, o sarcoma de Ewing, en el que el procedimiento comprende administrar a un individuo la composición farmacéutica.

En una realización, el trastorno proliferativo de células de cáncer de próstata, pulmón, colon, vejiga y ovario y de sarcoma de Ewing es una metástasis de un cáncer de próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario primario o sarcoma de Ewing. En una realización, el trastorno proliferativo de células está asociado al aumento de la expresión de STEAP-1 sobre la superficie de una célula.

5

[0100] Se proporciona un procedimiento para inhibir la proliferación celular en el que el procedimiento comprende exponer una célula a cualquiera de los inmunocombinados anteriores en condiciones permisivas para la unión del inmunocombinado a STEAP-1. La célula de próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario o sarcoma de Ewing puede ser una célula tumoral. La célula tumoral puede ser una célula tumoral de próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario o célula de sarcoma de Ewing de un mamífero que experimenta o del que se sospecha que experimenta trastorno proliferativo de células de la próstata, pulmón, colon, vejiga o de sarcoma de Ewing que incluye, pero no se limita a, a metástasis de un tumor de cáncer de células de la próstata, pulmón, colon, vejiga primario o tumor de sarcoma de Ewing. La célula de próstata, pulmón, colon, vejiga o sarcoma de Ewing puede ser un xenoinjerto. La exposición puede tener lugar *in vitro* o *in vivo*.

15

[0101] También se proporciona un procedimiento de uso del anticuerpo anti-STEAP-1 de la invención para ensayar STEAP-1 soluble en suero en un mamífero que experimenta trastorno proliferativo de células de la próstata, pulmón o colon (o metástasis de una incidencia primaria de tal trastorno) medir la progresión o regresión clínica de las enfermedades, o evaluar la carga o recaída del tumor.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0102] El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. Las copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos(s) en color será proporcionada por la oficina tras la solicitud y pago de las tasas necesarias.

25

[0103] La **Figura 1** representa la secuencia de aminoácidos de STEAP-1 humana (SEQ ID NO: 1) alineada con STEAP-1 de ratón y mono cinomolgo (cino) (SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente). Los dominios extracelulares 1, 2 y 3 están etiquetados y marcados con recuadros sombreados.

30

[0104] **Figuras 2A-2B:** la **Figura 2A** representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-STEAP-1 120.545 murino alineada con el anticuerpo de quimera (120 quimera) y anticuerpo humanizado (120 injerto) y alineada con la secuencia del subgrupo III humana. Las CDR están recuadradas (CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3). Las secuencias que catalogan las CDR son las secuencias de la región estructural (FR-L1 a FR-L4). Las secuencias están numeradas según la numeración de Kabat. Las CDR de Kabat, Chothia y de contacto están indicadas alrededor de las CDR recuadradas. La **Figura 2B** representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-STEAP-1 murino (120.545) alineada con el anticuerpo de quimera (120 quimera) y el anticuerpo humanizado (120 injerto) y alineada con la secuencia de kappa I humana. Las variantes humanizadas 24, 37, 48, 67 y 37/48, 67, 71 y 78 se prepararon haciendo los siguientes cambios de aminoácidos: A24V, V37I, V48M, F67I y L78F en la cadena pesada del anticuerpo 120 injerto. Las CDR están recuadradas. Las secuencias de FR-H1, FR-H2, FR-H3 y FR-H4 encierran las CDR (CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3). Las secuencias están numeradas según la numeración de Kabat. Las CDR de Kabat, Chothia y de contacto están indicadas alrededor de las CDR recuadradas.

35

[0105] Las **Figuras 3A** y **3B** muestran secuencias de la región estructural consenso pesada variable (VH) humana del aceptor a modo de ejemplo para su uso en la práctica de la presente invención con identificadores de secuencia del siguiente modo, en las que SEQ ID NO de FR están enumerados en el orden FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4:

50 - región estructural consenso "A" del subgrupo I de VH humana menos CDR de Kabat (SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29).

- regiones estructurales consenso "B", "C" y "D" del subgrupo I de VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 30, 31, 28, 29; SEQ ID NO: 30, 31, 32, 29; y SEQ ID NO: 30, 31, 33, 29).

55 - región estructural consenso "A" del subgrupo II de VH humana menos CDR de Kabat (SEQ ID NO: 34, 35, 36, 29).

- regiones estructurales consenso "B", "C" y "D" del subgrupo II de VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 37, 38, 36, 29; SEQ ID NO: 37, 38, 39, 29; y SEQ ID NO: 37, 38, 40, 29).

- región estructural consenso "A" del subgrupo III de VH humana menos CDR de Kabat (SEQ ID NO: 41, 42, 43, 29).

- regiones estructurales consenso "B", "C" y "D" del subgrupo III de VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 44, 45, 43, 29; SEQ ID NO: 44, 45, 46, 29; y SEQ ID NO: 44, 45, 46, 29).

5

- región estructural "A" del aceptor 1 de VH humana menos CDR de Kabat (SEQ ID NO: 48, 42, 49, 29).

- regiones estructurales "B" y "C" del aceptor de VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 44, 45, 49, 29; y SEQ ID NO: 44, 45, 50, 29).

10

- región estructural "A" del aceptor 2 de VH humana menos CDR de Kabat (SEQ ID NO: 48, 42, 51, 29).

- región estructural "B", "C" y "D" del aceptor 2 de VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 44, 45, 51, 29; SEQ ID NO: 44, 45, 52, 29; y SEQ ID NO: 44, 45, 53, 29).

15

[0106] Las **Figuras 4A y 4B** muestran secuencias de la región estructural consenso ligera variable (VL) humana del aceptor a modo de ejemplo para su uso en la práctica de la presente invención con identificadores de secuencia del siguiente modo:

20 - región estructural consenso del subgrupo I-1 kappa de VL humana (kv1-1): SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57

- región estructural consenso del subgrupo I kappa de VL humana (kv1): SEQ ID NO: 54, 58, 56, 57

- región estructural consenso del subgrupo II kappa de VL humana (kv2): SEQ ID NO: 58, 59, 60, 57

25

- región estructural consenso del subgrupo III kappa de VL humana (kv3): SEQ ID NO: 61, 62, 63, 57

- región estructural consenso del subgrupo IV kappa de VL humana (kv4): SEQ ID NO: 64, 65, 66, 57.

30 **[0107]** La **Figura 5** representa alineamientos de secuencias de la región Fc de IgG humana de secuencia nativa, humIgG1 (alotipo no A, SEQ ID NO: 85; y alotipo A, en los que la secuencia de aminoácidos SREEM dentro de SEQ ID NO: 85 está cambiada por SRDEL), humIgG2 (SEQ ID NO: 86), humIgG3 (SEQ ID NO: 87) y humIgG4 (SEQ ID NO: 88) con diferencias entre las secuencias marcadas con asteriscos. Los números encima de las secuencias representan el sistema de numeración EU. También se muestra una región constante kappa a modo de ejemplo.

35

[0108] La **Figuras 6A-6D** representan un análisis de FACS normalizado para el nivel de expresión de cada anticuerpo o variante en fago. La Figura 6A muestra desplazamientos de FACS en STEAP-1 que expresa células (LB50) para cuatro anticuerpos a modo de ejemplo. La Figura 6B muestra desplazamientos de FACS en STEAP-1 que no expresa células (S408) para varios anticuerpos como se indica en la figura y en el Ejemplo 1. Las Figuras 6C y 6D son alineamientos de desplazamientos de FACS después de la normalización para el nivel de expresión en fago.

40

[0109] Las **Figuras 7A-7F** representan gráficamente análisis de FACS que muestran la unión de anticuerpos murinos anti-STEAP-1, de quimera y versión 24 humanizados a STEAP-1 humana expresada sobre la superficie celular. Las Figuras 7A-7C indican que anti-STEAP-1 murino 120, quimera 120 y humanizado 120v.24 se unen a STEAP-1 humana y de mono cinomolgo, pero no a STEAP-1 de ratón. Las Figuras 7D-7F son representaciones de FACS que muestran la unión de murino 120, 120 quimera y humanizado 120v.24 (clon 67) a STEAP-1 humana expresada sobre la superficie celular. STEAP-1 exógena se expresó establemente en células 293 (designadas células LB50) y células PC3 (designadas células PS5.4) (Figuras 7D y 7E), y se expresó endógenamente en células LNCaP BR (Figura 7F).

45

50

[0110] **Figuras 8A y 8B.** La **Figura 8A** es una gráfica que muestra que la administración de anti-STEAP-1 murino 120-MC-vc-PAB-MMAE a 3 mg/kg fue eficaz en un modelo de xenoinjerto de tumor de próstata (células LNCaP-Ner). Véase el Ejemplo 4. La **Figura 8B** es una gráfica que muestra la administración de dosis única del anticuerpo anti-STEAP-1 humanizado 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg), 120v.24-MC-MMAF (6 mg/kg), 120v.24-MC-MMAF (12 mg/kg) y se mostró que anti-STEAP-1 120 quimera-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) era eficaz en un modelo de tumor de próstata de xenoinjerto de células LNCaP. Véase el Ejemplo 4.

55

[0111] La **Figura 9** es una gráfica que muestra que la administración de anticuerpo anti-STEAP 120 quimera-MC-vc-PAB-MMAE (abreviado anti-STEAP vcMMAE) a 3 mg/kg, o anti-STEAP-1 120 quimera-MC-MMAF (abreviado anti-STEAP mcMMAF) a 6 mg/kg mostró ser eficaz en un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata de ratones beis SCID castrados trasplantados con células LNCaP. Véase el Ejemplo 4.

5

[0112] La **Figura 10** es una gráfica que muestra que la administración de anticuerpo anti-STEAP-1 120 quimera-MC-vc-PAB-MMAE (abreviado anti-STEAP vcMMAE) a 3 mg/kg mostró ser eficaz en un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata de ratones macho beis SCID (dependientes de andrógenos) trasplantados con células LuCap 77. Véase el Ejemplo 4.

10

[0113] La **Figura 11** es una gráfica que muestra que la administración de anticuerpo anti-STEAP-1 humanizado 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE a 3 mg/kg, anticuerpo anti-STEAP-1 humanizado 120v.24-MC-MMAF a 6 mg/kg y 12 mg/kg a ratones beis SCID castrados trasplantados con tumor de próstata LuCap35V mostró ser eficaz con respecto a los controles. Véase el Ejemplo 4.

15

[0114] La **Figura 12** es un diagrama que representa STEAP-1 incorporada en una membrana celular. La unión del anticuerpo anti-STEAP-1 120 es dependiente de la conformación y no reconoce un epítipo lineal de STEAP-1.

20 **[0115]** Las **Figuras 13A-13D** muestran STEAP-1 expresada sobre la superficie de células como se detecta por inmunohistoquímica. La **Figura 13A** muestra una tinción inmunohistoquímica de células 293 que expresan STEAP-1 exógena sobre la superficie celular. La **Figura 13B** muestra una tinción inmunohistoquímica de células PC3 que expresan STEAP-1 exógena sobre la superficie celular. La **Figura 13C** muestra una tinción inmunohistoquímica de células LNCaP que expresan STEAP-1 endógena sobre la superficie celular. La **Figura 13D** muestra una tinción inmunohistoquímica de células LuCAP 77 que expresan STEAP-1 endógena sobre la superficie celular.

25

[0116] Las **Figuras 14A-14E** son gráficas que muestran la eficacia relativa de anticuerpo anti-STEAP-1 120v.24-MCMMMAF y anticuerpo anti-STEAP-1 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE para destruir STEAP-1 que expresa células in vitro. Células PS5.4 (**Figura 14A**) son células PC3 transformadas con un vector que codifica STEAP-1 de forma que STEAP-1 se exprese sobre la superficie celular. Células LB50 (**Figura 14B**) son células 293 transformadas con un vector que codifica STEAP-1 de forma que STEAP-1 se exprese sobre la superficie celular. Las células LNCaP (**Figura 14C**) expresan STEAP-1 endógenamente. "PC3 vec" (**Figura 14D**) y "293 vec" (**Figura 14E**) se refieren a células 293 y células PC3, respectivamente, transformadas con un control de vector.

35

[0117] La **Figura 15** muestra representaciones de conjugados de anticuerpo anti-STEAP-1 manipulados con cisteína-fármaco (ADC) en los que un resto de fármaco está unido a un grupo cisteína manipulado en: la cadena ligera (LC-ADC); la cadena pesada (HC-ADC); y la región Fc (Fc-ADC).

40 **[0118]** La **Figura 16** muestra las etapas de: (i) reducir aductos de disulfuros de cisteína y disulfuros entre cadenas y dentro de las cadenas en un anticuerpo anti-STEAP-1 manipulado con cisteína (tioMab) con el agente reductor TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina); (ii) oxidar parcialmente, es decir, reoxidación para volver a formar disulfuros entre cadenas y dentro de las cadenas, con dhAA (ácido deshidroascórbico); y (iii) conjugar el anticuerpo reoxidado con un producto intermedio de fármaco-ligador para formar un conjugado de anticuerpo anti-STEAP-1 manipulado con cisteína-fármaco (ADC).

45

[0119] Las **Figuras 17A-C** muestran los sitios de sustituciones de aminoácidos hechas para generar anticuerpos anti-STEAP-1 manipulados con cisteína (tio-mAb). La **Figura 17A** muestra la variante de tio-LC V205C con numeración secuencial correspondiente y numeración normalizada según el sistema de Kabat. La **Figura 17B** muestra la variante de tio-HC A118C con numeración secuencial correspondiente y numeración normalizada según el sistema EU. La **Figura 17C** muestra la variante de tio-Fc S400C con numeración secuencial correspondiente y numeración normalizada según el sistema EU.

50

Las **Figuras 18A-F** representan análisis de FACS que muestran que los conjugados de tio-anticuerpo anti-STEAP-1-fármaco (TDC) retienen la capacidad de unirse a STEAP-1 expresada sobre la superficie celular. Las **Figuras 18A-18C** son representaciones de FACS que muestran la unión de TDC anti-STEAP-1 tio-120-vc-PAB-MMAE humano (LCV205C) (abreviado huSteap1 TDC (L205C) vcE) y tio-120-vc-PAB-MMAE humano (HCA 118C) (abreviado huSteap1 TDC (HCA 118C) vcE) a STEAP-1 humana expresada sobre la superficie celular. STEAP-1 exógena se expresó establemente en células 293 (designadas células LB50) y células PC3 (designadas células PS5.4) (**Figuras**

55

18A y 18B) y se expresó endógenamente en células LNCaP BR (**Figura 18C**). Las **Figuras 18D, 18E y 18F** son alineamientos de los desplazamientos de FACS mostrados en la **Figura 7A, 7B y 7C**, respectivamente.

[0120] Las **Figuras 19A-C** muestran la eficacia relativa de los conjugados de tio-anticuerpo anti-STEAP-1-fármaco (TDC) tio-120-vc-PAB-MMAE humano (LCV205C) (abreviado huSteap1 TDC (L205C) vcE) y tio-120-vc-PAB-MMAE humano (HCA 118C) (abreviado huSteap1 TDC (HCA118C) vcE) para destruir STEAP-1 que expresa células in vitro. Células LB50 (**Figura 19A**) son células 293 transformadas con un vector que codifica STEAP-1 de forma que STEAP-1 se exprese sobre la superficie celular. Células PS5.4 (**Figura 19B**) son células PC3 transformadas con un vector que codifica STEAP-1 de forma que STEAP-1 se exprese sobre la superficie celular. Las células LNCaP (**Figura 19C**) expresan STEAP-1 endógenamente.

[0121] La **Figura 20** es una gráfica que muestra que la administración del TDC anti-STEAP-1 tio-120-vc-PAB-MMAE humano (HCA 118C) (abreviado hu Steap1 HC TDC vcE) a 3 mg/kg se mostró que era eficaz con respecto a los controles en un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata de ratones beis SCID macho (dependientes de andrógenos) trasplantados con células LNCaP. Véase el Ejemplo 8.

[0122] La **Figura 21** es una gráfica que muestra que la administración del TDC anti-STEAP-1 tio-120-vc-PAB-MMAE humano (HCA118C) (abreviado hu Steap1 HC TDC vcE) a 3 mg/kg, o tio-120-MC-MMAF humano (HCA118C) (abreviado hu Steap1 HC TDC mcF) a 1, 3 o 6 mg/kg, se mostró que era eficaz con respecto a los controles en un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata de ratones beis SCID macho (dependientes de andrógenos) trasplantados con células LNCaP. Véase el Ejemplo 8.

[0123] La **Figura 22** es una gráfica que muestra que la administración del TDC anti-STEAP-1 tio-120-vc-PAB-MMAE humano (HCA118C) (abreviado hu Steap1 HC TDC vcE) a 3 mg/kg, o tio-120-MC-MMAF humano (HCA125C) (abreviado hu Steap1 HC TDC mcF) a 3 o 6 mg/kg, se mostró que era eficaz con respecto a los controles en un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata de ratones beis SCID castrados trasplantados con tumor de próstata LuCaP 35V. Véase el Ejemplo 8.

[0124] La **Figura 23** muestra los sitios de sustituciones de aminoácidos hechas para generar el anticuerpo anti-STEAP-1 manipulado con cisteína (tio-mAb) designado "Simmons IV" o simplemente "SGIV". La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SGIV (SEQ ID NO: 90) se muestra en alineamiento con la cadena ligera del anticuerpo mu120 (SEQ ID NO: 5) y anticuerpo 120.v24 (SEQ ID NO: 91). La variante de tio-LC SGIV con numeración secuencial correspondiente y numeración normalizada según el sistema de Kabat se muestra alineada con el anticuerpo parental murino 120, además de la variante de tio-LC 120.v24 con numeración secuencial correspondiente y numeración normalizada según el sistema de Kabat. Las CDR están recuadradas (CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3). Las secuencias que encierran las CDR son las secuencias de la región estructural (FR-L1 a FR-L4). Las secuencias están numeradas según la numeración de Kabat. Las CDR de Kabat, Chothia y de contacto están indicadas alrededor de las CDR recuadradas. Véase el Ejemplo 9.

[0125] La **Figura 24** muestra los sitios de sustituciones de aminoácidos de la región estructural hechas para generar diversas variantes de anticuerpos anti-STEAP-1 manipulados por cisteína (tio-mAb) de SGIV y anticuerpos 120v.24. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SGIV se muestra con numeración normalizada según el sistema de Kabat, en alineamiento con variantes LS.VLVH1 (SEQ ID NO: 92); LS.VLVH2 (SEQ ID NO: 93); LS.Q (SEQ ID NO: 94); y LS.CH1 (SEQ ID NO: 95). La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 120.v24 con numeración normalizada según el sistema de Kabat se muestra en alineamiento con variantes ED.FW1 (SEQ ID NO: 96); ED.FW2 (SEQ ID NO: 97); ED.FW3 (SEQ ID NO: 98); ED.all (SEQ ID NO: 99); ED.Pro (SEQ ID NO: 100); y ED.pl (SEQ ID NO: 101). Las CDR están recuadradas. Las secuencias están numeradas según la numeración de Kabat. Véase el Ejemplo 9.

[0126] La **Figura 25** muestra representaciones de Scatchard de la unión de anticuerpo a STEAP-1 expresada sobre la superficie de células LNCaP.BR. Se midieron muestras por duplicado usando el anticuerpo 120.v24 (Figuras 25(A)-(D)) y la variante SGIV (Figuras 25(E)-(H)). Véase el Ejemplo 9.

[0127] La **Figura 26** muestra representaciones de Scatchard de la unión de anticuerpo a STEAP-1 expresada sobre la superficie de células 293.LB50. Se midieron muestras por duplicado usando el anticuerpo 120.v24 (Figuras 26(A)-(D)) y la variante SGIV (Figuras 26(E)-(H)). Véase el Ejemplo 9.

[0128] La **Figura 27** es una tabla que compara las afinidades de unión promedio, como se miden por análisis de Scatchard, para los anticuerpos 1789 murino, murino 120, de quimera de Fc, humanizados 120.v24, tio-120.v24 y

tio-SGIV en células PC-3-PS5.4, 293-LB50 y LNCaP-BR, además de en células 293 que expresan transitoriamente STEAP-1. Véase el Ejemplo 9.

[0129] La **Figura 28** representa un análisis de FACS que muestra desplazamientos de FACS en células establemente transfectadas con STEAP-1 (293 STEAP-1 LB48, 293 STEAP-1 LB50 y 293 STEAP-LB53) con muestras de anticuerpo SGIV y 120.v24. Véase el Ejemplo 9.

[0130] La **Figura 29** muestra el título de anticuerpos observado en diferentes recogidas de células que producen anticuerpo SGIV o 120.v24.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES DE LA INVENCIÓN

[0131] Se proporcionan anticuerpos aislados como se define en la reivindicación 1 que se unen a STEAP-1. Adicionalmente se proporcionan inmunoconjugados como se define en la reivindicación 8 que comprenden anticuerpos anti-STEAP-1. Los anticuerpos e inmunoconjugados de la invención son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de trastornos asociados a expresión alterada, por ejemplo, aumento de la expresión, de STEAP-1. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención son útiles para el diagnóstico o tratamiento de un trastorno proliferativo de células, tal como un tumor o cáncer. En ciertas realizaciones, STEAP-1 se expresa en tumor o cáncer de tejido de próstata, pulmón o colon. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención son útiles para la detección de STEAP-1, por ejemplo, STEAP-1 expresada sobre la superficie celular. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención son útiles para la detección de la expresión de STEAP-1 sobre la superficie de células normales y/o tumorales o cancerosas de tejido de próstata, pulmón o colon.

[0132] Se proporcionan polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-STEAP-1. Se proporcionan vectores que comprenden polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-STEAP-1, y se proporcionan células huésped que comprende tales vectores. También se proporcionan composiciones, que incluyen formulaciones farmacéuticas, que comprenden uno cualquiera o más de los polinucleótidos, anticuerpos anti-STEAP-1 o inmunoconjugados de la invención.

30

[0133] La presente divulgación proporciona procedimientos para tratar un trastorno proliferativo de células que incluye, pero no se limita a, tumor o cáncer, con un anticuerpo anti-STEAP-1, conjugado de anticuerpo-fármaco o inmunoconjugado. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, tratamiento de tumor o cáncer en próstata, pulmón o colon de un mamífero. La presente divulgación proporciona procedimientos de detección de la expresión de STEAP-1 en una célula de tejido usando un anticuerpo anti-STEAP-1, conjugado de anticuerpo-fármaco o inmunoconjugado. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, detección de la expresión de STEAP-1 en, como un ejemplo no limitante, una célula normal, célula tumoral o célula cancerosa de célula de próstata, pulmón o colon.

40 Técnicas generales

[0134] Las técnicas y procedimientos descritos o citados en este documento son generalmente bien entendidos y comúnmente empleados usando metodología convencional por aquellos expertos en la materia, tal como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel y col. eds., (2003)); las series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *Pcr 2: A Practical Approach* (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths y D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis y col., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan y col., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley y Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y

55

Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita y col., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

5 Definiciones

[0135] Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de investigación, diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunas realizaciones, un anticuerpo está purificado (1) a más del 95 % en peso del anticuerpo como se ha determinado, por ejemplo, por el procedimiento de Lowry, y en algunas realizaciones a más del 99 % en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos del extremo N o interna usando, por ejemplo, un secuenciador de taza giratoria, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, tinción con azul de Coomassie o con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, generalmente, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

[0136] Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se separa de al menos otra molécula de ácido nucleico con la que está generalmente asociada, por ejemplo, en su natural entorno. Una molécula de ácido nucleico aislada incluye adicionalmente una molécula de ácido nucleico contenida en células que generalmente expresan la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

[0137] "Purificado" significa que una molécula está presente en una muestra a una concentración de al menos el 95 % en peso, o al menos el 98 % en peso de la muestra en la que está contenida.

[0138] El término "sustancialmente similar" o "sustancialmente los mismos", como se usa en este documento, denota un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado a un anticuerpo de la invención y el otro asociado a un anticuerpo de referencia/comparador), de forma que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores es de poca o ninguna significancia biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, inferior a aproximadamente el 50 %, inferior a aproximadamente el 40 %, inferior a aproximadamente el 30 %, inferior a aproximadamente el 20 % y/o inferior a aproximadamente el 10 % en función del valor de referencia/comparador.

[0139] El término "sustancialmente reducido" o "sustancialmente diferente", como se usa en este documento, denota un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado a una molécula y el otro asociado a una molécula de referencia/comparador), de forma que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores es de significancia estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, superior a aproximadamente el 10 %, superior a aproximadamente el 20 %, superior a aproximadamente el 30 %, superior a aproximadamente el 40 % y/o superior a aproximadamente el 50 % en función del valor para la molécula de referencia/comparadora.

[0140] El término "vector", como se usa en este documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico con el que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un ADN bicatenario circular en el que se han ligado segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que segmentos de ADN adicionales pueden ligarse en el genoma vírico. Ciertos vectores pueden replicarse autónomamente en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y así se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que están operativamente ligados. Tales vectores se denominan en este documento "vectores de expresión recombinantes" o, simplemente, "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector.

[0141] "Polinucleótido", o "ácido nucleico", como se usan indistintamente en este documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero por ADN o ARN polimerasa, o por una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación a la estructura del nucleótido puede conferirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes de no nucleótido. Un polinucleótido puede comprender una modificación o modificaciones hechas después de la síntesis tales como conjugación con una marca. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "tapas", sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones de internucleótidos tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforditioatos, etc.), aquellos que contienen restos laterales tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, ply-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), además de formas sin modificar del (de los) polinucleótido(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo generalmente presente en los azúcares puede sustituirse, por ejemplo, con grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse con soportes sólidos o semisólidos. Los OH del extremo 5' y 3' pueden fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos de remate orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que generalmente son conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos básicos tales como metilribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden sustituirse con grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en las que el fosfato está sustituido con P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en las que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o sin sustituir que opcionalmente contiene un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos citados en este documento, que incluyen ARN y ADN.

[0142] "Oligonucleótido", como se usa en este documento, generalmente se refiere a polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, generalmente sintéticos, que tienen generalmente, pero no necesariamente, menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para polinucleótidos es igualmente y completamente aplicable a oligonucleótidos.

[0143] "Porcentaje (%) de identidad de secuencias de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptidos de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencias, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencias. El alineamiento para los fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos puede lograrse de diversas formas que están dentro de la habilidad en la materia, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr el máximo alineamiento con respecto a la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los fines en este documento, los valores de % de identidad de secuencias de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue autorizado por Genentech, Inc., y el código fuente ha sido presentado con documentación de usuario en la Oficina estadounidense para los derechos de autor, Washington D.C., 20559, en la que está registrado bajo el registro estadounidense para los derechos de autor N° TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

[0144] En situaciones en las que ALIGN-2 se emplea para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencias de aminoácidos para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula del siguiente modo:

100 veces la fracción X/Y

10 en la que X es el número de residuos de aminoácidos puntuados como apareamientos idénticos por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de ese programa de A y B, y en la que Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos A con respecto a B no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácidos B con respecto a A. A menos que se establezca
15 específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencias de aminoácidos usados en este documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

[0145] El término "STEAP-1", como se usa en este documento, se refiere a cualquier STEAP-1 nativa de cualquier fuente de vertebrado, que incluye mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos, mono cinomolgo (cino)) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término engloba STEAP-1 de "longitud completa", sin procesar, además de cualquier forma de STEAP-1 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes de STEAP-1 que se producen naturalmente, por ejemplo, variantes de corte y empalme, variantes alélicas e isoformas. La secuencia de aminoácidos de STEAP-1
25 humana se representa en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). En una realización, STEAP-1 se expresa sobre la superficie celular, tal como sobre la superficie de una célula de próstata, pulmón o colon normal, y tiene expresión elevada en células de cáncer de próstata, pulmón o colon o metástasis de tales células cancerosas. La Figura 1 también representa la secuencia de aminoácidos de STEAP-1 de ratón y mono cinomolgo (SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente).

30 **[0146]** "Anticuerpos" (Ab) e "inmunoglobulinas" (Ig) son glicoproteínas que tienen características estructurales similares. Mientras que los anticuerpos presentan especificidad de unión por un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que generalmente carecen de especificidad por antígenos. Los polipéptidos del último tipo se producen, por ejemplo, a bajos niveles
35 por el sistema linfático y a altos niveles por mielomas.

[0147] Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos monovalentes, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por
40 ejemplo, anticuerpos biespecíficos en tanto que presenten la actividad biológica deseada) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpos (como se describe en mayor detalle en este documento). Un anticuerpo puede ser quimérico, humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

[0148] El término "anticuerpo anti-STEAP-1" o "un anticuerpo que se une a STEAP-1" se refiere a un anticuerpo que puede unirse a STEAP-1 con suficiente afinidad de forma que el anticuerpo sea útil como agente diagnóstico y/o terapéutico en la elección de STEAP-1 como diana. Preferentemente, el grado de unión de un anticuerpo anti-STEAP-1 a una proteína no STEAP-1 no relacionada es inferior a aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a STEAP-1 como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a STEAP-1 tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, \leq
50 10 nM , $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-STEAP-1 se une a un epítipo de STEAP-1 que está conservado entre STEAP-1 de diferentes especies.

[0149] La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios del extremo amino de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada puede denominarse en lo sucesivo "VH". El dominio variable de la cadena ligera puede denominarse en lo sucesivo "VL". Estos dominios son
55 generalmente las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

[0150] El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables se diferencien ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y la especificidad de cada

anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida por todos los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables (HVR) tanto en los dominios variables de las cadenas ligeras como de las cadenas pesadas. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman las regiones estructurales (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran parte una configuración de hoja beta, conectadas por tres CDR que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte, de la estructura de hoja beta. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en una estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos (véase Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

[0151] Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de los dos tipos claramente distintos llamados kappa (κ) y lambda (λ) basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

[0152] Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos puede asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ y IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas y generalmente se describen en, por ejemplo, Abbas y col. *Cellular and Mol. Immunology*, 4^a ed. (2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o varias proteínas o péptidos.

[0153] Los términos “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo intacto” y “anticuerpo completo” se usan en este documento indistintamente para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no fragmentos de anticuerpos como se define más adelante. Los términos se refieren particularmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen la región Fc.

[0154] “Fragmentos de anticuerpos” comprenden sólo una parte de un anticuerpo intacto, en el que la porción retiene al menos una, y hasta la mayoría o todas, de las funciones normalmente asociadas a esa porción cuando está presente en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, por tanto, retiene la capacidad para unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, uno que comprende la región Fc, retiene al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas a la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión a FcRn, modulación de la semivida del anticuerpo, función de ADCC y unión al complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo tal puede comprender sobre el antígeno el brazo de unión ligado a una secuencia de Fc que puede conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

[0155] La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos llamados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento “Fc” residual cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina da un fragmento F(ab)₂ que tiene dos sitios de combinación con antígeno y que todavía puede reticular el antígeno.

[0156] “Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En una realización, esta especie de Fv bicatenaria consiste en un dímero de un dominio variable de las cadenas pesadas y ligeras en estrecha asociación no covalente. En una especie de Fv monocatenaria (scFv), un dominio variable de las cadenas pesadas y ligeras puede estar covalentemente ligado por un ligador de péptido flexible de forma que las cadenas ligeras y pesadas puedan asociarse en un análogo de estructura “dimérica” con el de en una especie de Fv bicatenaria. En esta configuración, las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero de VH-VL. En conjunto, las seis CDR confieren especificidad de unión del antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que sólo comprende tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse a antígeno, aunque a una menor afinidad que el sitio de unión entero.

- [0157]** El fragmento Fab contiene los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxi del dominio de las cadenas pesadas CH1 que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en este documento para Fab' en el que el (los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.
- 10 **[0158]** Los fragmentos de anticuerpos "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios de anticuerpo VH y VL, estando estos dominios presentes en una única cadena de polipéptidos. Generalmente, el polipéptido de scFv comprende además un ligador de polipéptidos entre los dominios VH y VL que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de scFv véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994).
- 15 **[0159]** El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable (VH) de las cadenas pesadas conectados a un dominio variable (VL) de las cadenas ligeras en la misma cadena de polipéptidos (VH - VL). Usando un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son obligados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; Hudson y col. (2003) *Nat. Med.* 9: 129-134; y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson y col. (2003) *Nat. Med.* 9: 129-134.
- 20 **[0160]** El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en este documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo, ya que no es una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal tal normalmente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptidos que se une a diana, en el que la secuencia de polipéptidos de unión a diana se obtuvo mediante un procedimiento que incluye la selección de una única secuencia de polipéptidos de unión a diana de una pluralidad de secuencias de polipéptidos. Por ejemplo, el procedimiento de selección pueden ser la selección de un único clon de una pluralidad de clones, tal como un conjunto de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que una secuencia de unión diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión diana, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpo policlonal que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpo monoclonal son ventajosas ya que normalmente están sin contaminar por otras inmunoglobulinas.
- 30 **[0161]** El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo, ya que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden producirse mediante una variedad de técnicas que incluyen, por ejemplo, el procedimiento de hibridoma (por ejemplo, Kohler y col., *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 4.816.567), tecnologías de expresión en fago (véanse, por ejemplo, Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu y col., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee y col., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34): 12467-12472 (2004); y Lee y col., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004) y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen partes o todos los loci o genes de inmunoglobulinas humanas que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO98/24893; WO96/34096; WO96/33735; WO91/10741; Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann y col., *Year in Immunol.* 7: 33 (1993);

las patentes de EE.UU. Nº 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; Marks y col., Bio.Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg y col., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild y col., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

5

[0162] Los anticuerpos monoclonales en este documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos
10 derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, además de fragmentos de tales anticuerpos, en tanto que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. Nº 4.816.567; y Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)).

[0163] Formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos
15 que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una región hipervariable del receptor están sustituidos con residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana
20 son sustituidos con residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones pueden ser para refinar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no
25 humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones y col., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en su interior: Vaswani y
30 Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1: 105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995); Hurlle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5: 428-433 (1994).

[0164] Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o ha sido producido usando cualquiera de las técnicas para
35 producir anticuerpos humanos como se ha desvelado en este documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

[0165] El término “región hipervariable”, “HVR” o “HV”, cuando se usa en este documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles
40 estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en VH (H1, H2, H3) y tres en VL (L1, L2, L3). En anticuerpos nativos, H3 y L3 muestran la mayor diversidad de las seis regiones hipervariables, y se cree en particular que H3 desempeña una función única en conferir excelente especificidad por anticuerpos. Xu y col. (2000) Immunity 13: 37-45; Johnson y Wu (2003) en Methods in Molecular Biology 248: 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ). De hecho, anticuerpos de camélido que se producen naturalmente que
45 consisten en una cadena pesada sólo son funcionales y estables en ausencia de la cadena ligera. Hamers-Casterman y col. (1993) Nature 363: 446-448; Sheriff y col. (1996) Nature Struct. Biol. 3: 733-736.

[0166] Varias delineaciones de la región hipervariable están en uso y están englobadas en este documento. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencias y
50 son las más comúnmente usadas (Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere por el contrario a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son usadas por el software de modelado de anticuerpos Oxford Molecular's AbM. Las regiones hipervariables de
55 “contacto” se basan en un análisis de las complejas estructuras cristalinas disponibles. Los residuos de cada una de estas regiones hipervariables se anotan a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto	
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36	
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55	
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96	
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B	(numeración de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35	(numeración de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58	
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101	

[0167] Las regiones hipervariables pueden comprender “regiones hipervariables extendidas” del siguiente modo: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en VL y 26-35 o 26-35A (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en VH. Los residuos del dominio variable están numerados según Kabat y col., arriba, para cada una de estas definiciones. Las regiones hipervariables HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de los anticuerpos anti-STEAP-1 120v.24 humanizados de la invención son H26-H35A, H49-H6 y H95-H 102 usando la numeración de Kabat. Las regiones hipervariables HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de los anticuerpos anti-STEAP-1 120v.24 humanizados de la invención son L24-34, L50-56 y L89-97 usando la numeración de Kabat. Como se usa en este documento, los términos “HVR” y “CDR” se usan indistintamente.

[0168] Residuos de la “región estructural” o “FR” son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable como se define en este documento.

[0169] El término “numeración de residuos del dominio variable como en Kabat” o “numeración de la posición de aminoácidos como en Kabat” y variaciones de los mismos se refiere al sistema de numeración usado para dominios variables de la cadena pesada o dominios variables de la cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Usando esta numeración, la presente secuencia de aminoácidos lineal puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir un inserto de un único aminoácido (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del residuo de FR de la cadena pesada 82. La numeración de residuos de Kabat puede determinarse para un anticuerpo dado por alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat “convencional”.

[0170] Un anticuerpo “madurado por afinidad” es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que producen una mejora en la afinidad del anticuerpo por antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee aquella(s) alteración (alteraciones). En una realización, un anticuerpo madurado por afinidad tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks y col. *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) describe la maduración por afinidad por barajado de dominios VH y VL. La mutagénesis al azar de residuos de HVR y/o de regiones estructurales se describe por: Barbas y col. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91: 3809-3813 (1994); Schier y col. *Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton y col. *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson y col., *J. Immunol.* 154(7): 3310-9 (1995); y Hawkins y col., *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992).

[0171] Un anticuerpo “bloqueante” o un anticuerpo “antagonista” es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno con el que se une. Ciertos anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas inhiben sustancialmente o completamente la actividad biológica del antígeno.

[0172] Un “anticuerpo agonista”, como se usa en este documento, es un anticuerpo que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

[0173] Las “funciones efectoras” de los anticuerpos se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de la secuencia nativa o región Fc de variante de secuencias de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

[0174] “Receptor de Fc” o “FcR” describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas

realizaciones, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas realizaciones, un FcR es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y formas alternativamente cortadas y empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activante”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”) que tienen secuencias de aminoácidos similares que se diferencian principalmente en los dominios citoplásmicos del mismo. El receptor activante FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). Los FcR son revisados en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991); Capel y col., Immunomethods 4: 25-34 (1994); y de Haas y col., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Otras FcR, que incluyen aquellos que van a identificarse en el futuro, están englobados por el término “FcR” en este documento.

[0175] El término “receptor de Fc” también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y col., J. Immunol. 117: 587 (1976); y Kim y col., J. Immunol. 24: 249 (1994)) y la regulación de la homeostasis de inmunoglobulinas. Se conocen procedimientos de medición de la unión a FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie 1997, Hinton 2004). La unión a FcRn humano *in vivo* y la semivida en suero de polipéptidos de unión con alta afinidad a FcRn humano pueden ensayarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates administrados con los polipéptidos de variante de Fc.

[0176] El documento WO00/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida a FcR. Véase, por tanto, Shields y col. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).

[0177] “Células efectoras humanas” son leucocitos que expresan una o más FcR y realizan funciones efectoras. En ciertas realizaciones, las células expresan al menos FcγRIII y realizan función (funciones) efectora(s) de ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median en ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos espontáneos (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

[0178] “Citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo” o “ADCC” se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig secretada unida sobre receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos espontáneos (NK), neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que lleva antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan FcγRIII solo, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de EE.UU. N° 5.500.362 o 5.821.337 o la patente de EE.UU. de Presta N° 6.737.056. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos espontáneos (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes y col. PNAS (USA) 95: 652-656 (1998).

[0179] “Citotoxicidad dependiente del complemento” o “CDC” se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta del complemento clásica se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno relacionado. Para evaluar la activación del complemento puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996).

[0180] Variantes de polipéptidos con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q elevada o disminuida se describen en la patente de EE.UU. N° 6.194.551B1 y WO99/51642.

Por tanto, véase, Idusogie y col. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

[0181] El término “polipéptido que comprende región Fc” se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o inmuno adhesina, que comprende una región Fc. La lisina del extremo C (residuo 447 según el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o por ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Por consiguiente, una composición que comprende un polipéptido que tiene una región Fc según la presente invención puede comprender polipéptidos con

K447, con todos los K447 eliminados, o una mezcla de polipéptidos con y sin el residuo K447.

[0182] Una "región estructural humana del aceptor" para los fines en este documento es una región estructural que comprende la secuencia de aminoácidos de una región estructural VL o VH derivada de una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana. Una región estructural humana del aceptor "derivada de" una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios de secuencias de aminoácidos preexistentes. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos preexistentes son 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. Si los cambios de aminoácidos preexistentes están presentes en una VH, preferentemente aquellos cambios se producen en solo tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos de aminoácidos en aquellas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una realización, la región estructural humana del aceptor VL es idéntica en secuencia a la secuencia de la región estructural de inmunoglobulina humana VL o secuencia de la región estructural consenso humana.

[0183] Una "región estructural consenso humana" es una región estructural que representa los residuos de aminoácidos que se producen más comúnmente en una selección de secuencias de la región estructural VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias del dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una realización, para VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat y col., arriba. En una realización, para VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat y col., arriba.

[0184] Una "región estructural consenso del subgrupo III de VH" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III pesado variable de Kabat y col., arriba. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la región estructural consenso del subgrupo III de VH comprende al menos una parte o todas de cada una de las siguientes secuencias:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (FR-H1, SEQ ID NO:21)-HVR-H1-

WVRQAPGKGLEWV (FR-H2, SEQ ID NO:22)-HVR-H2-

RFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (FR-H3, SEQ ID NO:23)-HVR-H3-

WGQGTLVTVSS (FR-H4, SEQ ID NO:24).

[0185] Una "región estructural consenso del subgrupo I de VL" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa ligero variable de Kabat y col., arriba. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la región estructural consenso del subgrupo I de VH comprende al menos una parte o todas de cada una de las siguientes secuencias:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (FR-L1, SEQ ID NO: 17)-HVR-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (FR-L2, SEQ ID NO: 18)-HVR-L2-GVPSRFSGSGSGDFTLTISLQPEDFATYYC (FR-L3, SEQ ID NO: 19)-HVR-L3-FGQGTKVEIKR (FR-L4, SEQ ID NO: 20). "Secuencia señal de la secreción" o "secuencia señal" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal corto que puede usarse para dirigir una proteína de interés recientemente sintetizada mediante una membrana celular, normalmente la membrana interna o tanto las membranas internas como externas de procariontes. Como tal, la proteína de interés tal como el polipéptido de la cadena ligera o pesada de la inmunoglobulina es secretada en el periplasma de las células huésped procariontes o en el medio de cultivo. El péptido señal codificado por la secuencia señal de la secreción puede ser endógeno para las células huésped, o puede ser exógeno, que incluye péptidos señal nativos para el polipéptido que va a expresarse. Las secuencias señal de la secreción están normalmente presentes en el extremo amino de un polipéptido que va a expresarse, y son normalmente eliminadas enzimáticamente entre la biosíntesis y la secreción del polipéptido del citoplasma. Por tanto, el péptido señal no está normalmente presente en un producto de proteína madura.

[0186] Un "aminoácido de cisteína libre" se refiere a un residuo de aminoácido de cisteína que se ha manipulado en un anticuerpo parental, tiene un grupo funcional tiol (-SH) y no está emparejado como, o de otro modo parte de, un puente disulfuro intramolecular o intermolecular.

[0187] El término "valor de reactividad del tiol" es una caracterización cuantitativa de la reactividad de

aminoácidos de cisteína libres. El valor de reactividad del tiol es el porcentaje de un aminoácido de cisteína libre en un anticuerpo manipulado con cisteína que reacciona con un reactivo reactivo con tiol, y convertido en un valor máximo de 1. Por ejemplo, un aminoácido de cisteína libre en un anticuerpo manipulado con cisteína que reacciona con el 100 % de rendimiento con un reactivo reactivo con tiol, tal como un reactivo de biotina-maleimida, para formar un anticuerpo marcado con biotina tiene un valor de reactividad del tiol de 1,0. Otro aminoácido de cisteína manipulado en el mismo o diferente anticuerpo parental que reacciona con el 80 % de rendimiento con un reactivo reactivo con tiol tiene un valor de reactividad del tiol de 0,8. Otro aminoácido de cisteína manipulado en el mismo anticuerpo parental o anticuerpo parental diferente que fracasa totalmente en reaccionar con un reactivo reactivo con tiol tiene un valor de reactividad del tiol de 0. La determinación del valor de reactividad del tiol de una cisteína particular puede realizarse por ensayo de ELISA, espectroscopía de masas, cromatografía de líquidos, autorradiografía u otras pruebas analíticas cuantitativas. Los reactivos reactivos con tiol que permiten la captura del anticuerpo manipulado con cisteína y comparación y cuantificación de la reactividad de la cisteína incluyen biotina-PEO-maleimida ((+)-biotinil-3-maleimidopropionamidil-3,6-dioxaoctainodiamina, Oda y col. (2001) Nature Biotechnology 19: 379-382, Pierce Biotechnology, Inc.), biotina-BMCC, PEO-yodoacetil-biotina, yodoacetil-LC-biotina y biotina-HPDP (Pierce Biotechnology, Inc.) y $N\alpha$ -(3-maleimidilpropionil)biotina (MPB, Molecular Probes, Eugene, OR). Otras fuentes comerciales para la biotinylación, reactivos de ligador bifuncionales y multifuncionales incluyen Molecular Probes, Eugene, OR, y Sigma, St. Louis, MO

[0188] Un “anticuerpo parental” es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o más residuos de aminoácidos están sustituidos con uno o más residuos de cisteína. El anticuerpo parental puede comprender una secuencia nativa o natural. El anticuerpo parental puede tener modificaciones de secuencias de aminoácidos preexistentes (tales como adiciones, deleciones y/o sustituciones) con respecto a otras formas nativas, naturales o modificadas de un anticuerpo. Un anticuerpo parental puede estar dirigido contra un antígeno diana de interés, por ejemplo, un polipéptido biológicamente importante. También se contemplan anticuerpos dirigidos contra antígenos de no polipéptido (tales como antígenos de glicolípido asociados a tumor; véase el documento US 5091178).

[0189] “Afinidad de unión” generalmente se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su componente de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en este documento, “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1: 1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su componente Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (K_d). La afinidad puede medirse por procedimientos comunes conocidos en la técnica, que incluyen aquellos descritos en este documento. Los anticuerpos de baja afinidad se unen generalmente al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápidamente y tienden a permanecer unidos durante más tiempo. En la técnica se conoce una variedad de procedimientos de medición de la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para los fines de la presente invención. A continuación se describen realizaciones ilustrativas específicas.

[0190] En una realización, “ K_d ” o “valor de K_d ” según la presente invención se mide por un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado en la versión de Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo. La afinidad de unión en disolución de Fab por antígeno se mide equilibrando el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (^{125}I) en presencia de una serie de valoración de antígeno sin marcar, luego capturando el antígeno unido con una placa recubierta de anticuerpo anti-Fab (Chen, y col., (1999) J. Mol. Biol. 293: 865-881). Para establecer condiciones para el ensayo, placas de microtitulación (Dynex) se recubren durante la noche con 5 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6), y posteriormente se bloquean con 2 % (peso/volumen) de albúmina de suero bovino en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc N° 269620), [^{125}I]-antígeno 100 pM o 26 pM se mezcla con diluciones seriadas de un Fab de interés (por ejemplo, de acuerdo con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta y col., (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599). Entonces, el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo prolongado (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcance el equilibrio. Después, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Entonces, la disolución se elimina y la placa se lava ocho veces con 0,1 % de Tween-20 en PBS. Cuando las placas se han secado se añaden 150 μl /pocillo de centelleante (MicroScint-20; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan menos de o igual al 20 % de unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitivos.

[0191] Según otra realización, K_d o el valor de K_d se mide usando ensayos de resonancia de plasmones

superficiales usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con pastillas CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, pastillas de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore® Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico 5 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para medidas cinéticas, diluciones seriadas dobles de Fab (0,78 nM a 500 nM) se inyectan en PBS con 0,05 % de Tween 20 (PBST) a 25 °C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las constantes de asociación (k_{as}) y las constantes de disociación (k_{dis}) se calculan 10 usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno simple (software de evaluación BIAcore® versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calcula como la relación k_{dis}/k_{as} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., y col., (1999) J. Mol. Biol. 293: 865-881. Si la constante de asociación supera $106 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmones superficiales anterior, entonces la constante de asociación puede determinarse usando una técnica de extinción fluorescente que mide el 15 aumento o la disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de paso banda) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma de Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo de parada (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta con agitación.

20 **[0192]** Una “constante de asociación” o “ k_{as} ” según la presente invención también puede determinarse como se ha descrito anteriormente usando un sistema BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore®, Inc., Piscataway, NJ).

25 **[0193]** Un “trastorno” es cualquier afección o enfermedad que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia/molécula o procedimiento de la invención. Éste incluye trastornos crónicos y agudos que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos que van a tratarse en este documento incluyen afecciones cancerígenas tales como cánceres o metástasis de próstata, pulmón y colon.

30 **[0194]** Los términos “trastorno proliferativo de células” y “trastorno proliferativo” se refieren a trastornos que están asociados a algún grado de proliferación de células anormales. En una realización, el trastorno proliferativo de células es cáncer.

35 **[0195]** “Tumor”, como se usa en este documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásico, tanto maligno como benigno, y a todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos. Los términos “cáncer”, “canceroso”, “trastorno proliferativo de células”, “trastorno proliferativo” y “tumor” no son mutuamente excluyentes tal y como se denominan en este documento.

40 **[0196]** Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, 45 adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de las vías urinarias, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, melanoma, mieloma múltiple y linfoma de linfocitos B, cáncer cerebral, 50 además de cabeza y cuello, y metástasis asociadas.

[0197] Una “célula que expresa STEAP-1” es una célula que expresa STEAP-1 endógena o transfectada sobre la superficie celular. Un “cáncer que expresa STEAP-1” es un cáncer que comprende células que tienen 55 proteína STEAP-1 presente sobre la superficie celular. Un “cáncer que expresa STEAP-1” produce niveles suficientes de STEAP-1 sobre la superficie de células del mismo, de forma que un anticuerpo anti-STEAP-1 puede unirse al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer. Un cáncer que “expresa en exceso” STEAP-1 es uno que tiene niveles significativamente superiores de STEAP-1 en la superficie celular del mismo, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Tal expresión en exceso puede producirse por

amplificación génica o por aumento de la transcripción o traducción. La expresión de STEAP-1 en exceso puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando el aumento de niveles de la proteína STEAP-1 presente sobre la superficie de una célula (por ejemplo, mediante un ensayo inmunohistoquímico; análisis de FACS). Alternativamente, o adicionalmente, pueden medirse niveles de ácido nucleico o ARNm que codifica STEAP-1 en la célula, por ejemplo, mediante hibridación *in situ* fluorescente; (FISH; véase el documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), transferencia Southern, transferencia Northern, o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tales como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). También puede estudiarse la expresión de STEAP-1 en exceso midiendo antígeno liberado en un líquido biológico tal como suero, por ejemplo, usando ensayos basados en anticuerpos (véase, por tanto, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.933.294 concedida el 12 de junio de 1990; el documento WO91/05264 publicado el 18 de abril de 1991; la patente de EE.UU. 5.401.638 concedida el 28 de marzo de 1995; y Sias y col. J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)). Además de los ensayos anteriores, están disponibles diversos ensayos *in vivo* para el médico especializado. Por ejemplo, pueden exponerse células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con una marca detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y la unión del anticuerpo con las células en el paciente puede evaluarse, por ejemplo, por barrido externo para radiactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo. Un cáncer que expresa STEAP-1 incluye cáncer de próstata, pulmón y colon.

[0198] Como se usa en este documento, "tratamiento" (y variaciones tales como "tratar") se refiere a la intervención clínica en un intento por alterar el curso natural del individuo o célula que está tratándose, y puede realizarse tanto para la profilaxis como durante el curso de patología clínica. Efectos deseables del tratamiento incluyen prevenir la manifestación o reaparición de enfermedad, alivio de síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno o para ralentizar la progresión de una enfermedad o trastorno.

[0199] Los parámetros anteriores para evaluar el tratamiento satisfactorio y la mejora en la enfermedad son fácilmente medibles por procedimientos rutinarios familiares para un médico. Para terapia contra el cáncer, la eficacia puede medirse, por ejemplo, evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (RR). Para cáncer de próstata, el progreso de la terapia puede evaluarse por procedimientos rutinarios, normalmente midiendo niveles de PSA en suero (antígeno prostático específico); cuanto mayor sea el nivel de PSA en sangre, más amplio será el cáncer. Están disponibles ensayos comerciales para detectar PSA, por ejemplo, kits de ensayo de PSA Hybitech Tandem-E y Tandem-R, el ensayo policlonal ProCheck de Yang (Yang Labs, Bellevue, WA), Imx de Abbott (Abbott Labs, Abbott Park, IL), etc. Las metástasis pueden determinarse por pruebas de estadificación y por barridos óseos y pruebas para el nivel de calcio y otras enzimas para determinar la diseminación al hueso. También pueden hacerse barridos de CT para buscar la diseminación a la pelvis y ganglios linfáticos en el área. La radiografía del tórax y la medición de los niveles de enzimas en el hígado mediante procedimientos conocidos se usan para buscar metástasis a los pulmones e hígado, respectivamente. Otros procedimientos rutinarios para monitorizar la enfermedad incluyen ultrasonografía transrectal (TRUS) y biopsia transrectal con aguja (TRNB).

[0200] Un "individuo" es un vertebrado. En ciertas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales de granja (tales como vacas), animales para deportes, mascotas (tales como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas. En ciertas realizaciones, un mamífero es un ser humano.

[0201] Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz engloba una cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula es compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero no necesariamente, como una dosis profiláctica se usa en sujetos antes de o en su estado temprano de enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz sería inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto grado y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto grado y preferentemente detener) metástasis tumorales; inhibir, hasta cierto grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto grado uno o más de los síntomas asociados al cáncer. Véase la definición

precedente de “tratar”. Hasta el grado de que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o destruir células cancerosas existentes, puede ser citostática y/o citotóxica.

[0202] Administración “crónica” se refiere a la administración del (de los) agente(s) en un modo continuo a diferencia de un modo de dosis única, de forma que se mantenga el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un periodo de tiempo prolongado. La administración “intermitente” es tratamiento que no se hace consecutivamente sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.

[0203] La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

[0204] “Vehículos” como se usa en este documento incluyen vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que se expone a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Frecuentemente, el vehículo fisiológicamente aceptable es una disolución de pH tamponado acuosa. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

[0205] “Marca” como se usa en este documento se refiere a un compuesto o composición detectable que está directamente o indirectamente conjugado con el anticuerpo de forma que genere un anticuerpo “marcado”. La marca puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, marcas de radioisótopo o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

[0206] El término “epítotope marcado” usado en este documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido de anticuerpo anti-PSCA fusionado con un “polipéptido de marca”. El polipéptido de marca tiene suficientes residuos para proporcionar un epítotope contra el que puede producirse un anticuerpo, sin embargo es suficientemente corto de forma que no interfiere con la actividad del polipéptido de Ig con el que está fusionado. El polipéptido de marca también es preferentemente bastante único de manera que el anticuerpo no reaccione de forma sustancialmente cruzada con otros epítotopes. Los polipéptidos de marca adecuados tienen generalmente al menos seis residuos de aminoácidos y normalmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos).

[0207] Una “molécula pequeña” se define en este documento por tener un peso molecular inferior a aproximadamente 500 Dalton.

[0208] El término “prospecto” se usa para referirse a instrucciones habitualmente incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias referentes al uso de tales productos terapéuticos.

[0209] Un “ácido nucleico aislado” es un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN, ADN, o un polímero mixto, que está sustancialmente separado de otras secuencias de ADN del genoma, además de proteínas o complejos tales como ribosomas y polimerasas, que acompañan naturalmente a una secuencia nativa. El término engloba una secuencia de ácidos nucleicos que ha sido eliminada de su entorno en el que se produce naturalmente, e incluye aislados de ADN recombinantes o clonados y análogos químicamente sintetizados o análogos biológicamente sintetizados por sistemas heterólogos. Una molécula sustancialmente pura incluye formas aisladas de la molécula.

[0210] “Vector” incluye vectores lanzadera y de expresión. Normalmente, la construcción de plásmido también incluirá un origen de replicación (por ejemplo, el origen de replicación ColE) y un marcador de selección (por ejemplo, resistencia a ampicilina o tetraciclina), para la replicación y selección, respectivamente, de los plásmidos en bacterias. Un “vector de expresión” se refiere a un vector que contiene las secuencias de control o elementos reguladores necesarios para la expresión de los anticuerpos que incluyen fragmento de anticuerpo de la invención, en células bacterianas o eucariotas. Vectores adecuados se desvelan más adelante.

[0211] La célula que produce un anticuerpo anti-STEAP de la invención incluirá la célula de hibridoma parental, por ejemplo, los hibridomas que se depositan en la ATCC, además de células huésped bacterianas y eucariotas en las que se han introducido el ácido nucleico que codifica los anticuerpos. Células huésped adecuadas se desvelan más adelante.

5

[0212] Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se usa en este documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente un PSCA, que expresa célula cancerosa, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan PSCA en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un sitio distinto de la fase S), tal como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Bloqueantes de la fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs” de Murakami y col. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerígenos derivados ambos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan microtúbulos previniendo la despolimerización, que produce la inhibición de la mitosis en células.

[0213] El término “agente citotóxico” como se usa en este documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o produce muerte o destrucción celular. Está previsto que el término incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, que incluyen fragmentos y/o variantes de los mismos, toxinas, agentes inhibidores del crecimiento, restos de fármaco y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos desvelados más adelante. Otros agentes citotóxicos se describen más adelante. Un agente tumoricida produce la destrucción de células tumorales.

[0214] Una “toxina” es cualquier sustancia que pueda tener un efecto perjudicial sobre el crecimiento o la proliferación de una célula.

[0215] Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Algunos ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y la ciclofosfamida CYTOXAN®; alquilsulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocuaona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen alretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapacol; colcicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calmentestatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiestatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediína (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 11 y caliqueamicina omega 11 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, que incluye dinemicina A; una esperamicina; además de cromóforo de neocarzinostatina y la cromoproteína relacionada cromóforos antibióticos de enediína), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina,

ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, 5 propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; recuperador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; 10 nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclolorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, 15 Princeton, N.J.), formulación de nanopartículas manipuladas con albúmina de paclitaxel sin Cremophor ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); 20 novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; además de combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para una pauta de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) 25 combinado con 5-FU y leucovovina.

[0216] En esta definición también se incluyen agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento de cáncer, y están frecuentemente en forma de tratamiento sistémico, o de cuerpo completo. Pueden ser las propias hormonas. Ejemplos incluyen 30 antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM) que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo el tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; antiprogesteronas; reguladores por disminución de receptores de estrógenos (ERD); agentes que funcionan para suprimir o cerrar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH) tales como acetato de leuprolida 35 LUPRON® y ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina y triptorelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®. Además, tal definición de agentes quimioterapéuticos 40 incluye bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID® o risedronato ACTONEL®; además de troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular anómala tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor 45 del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de moléculas pequeñas de tirosina cinasa dual ErbB-2 y EGFR también conocido como GW572016); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

50 **[0217]** Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en este documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (tal como una célula que expresa STEAP-1), tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células (tal como una célula que expresa STEAP-1) en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento 55 incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un sitio distinto de la fase S), tal como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Bloqueantes de la fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina,

cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" de Murakami y col. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerígenos derivados ambos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan microtúbulos previniendo la despolimerización, que produce la inhibición de la mitosis en células.

[0218] El término "metabolito intracelular" se refiere a un compuesto resultante de un proceso o reacción metabólica dentro de una célula en un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC). El proceso o reacción metabólica puede ser un proceso enzimático, tal como escisión proteolítica de un péptido ligador del ADC, o hidrólisis de un grupo funcional tal como una hidrazona, éster o amida. Los metabolitos intracelulares incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y fármacos libres que han experimentado escisión intracelular después de la entrada, difusión, captación o transporte en una célula.

[0219] Los términos "intracelularmente escindido" y "escisión intracelular" se refieren a un proceso o reacción metabólica dentro de una célula en un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) por el cual la unión covalente, es decir, el ligador, entre el resto de fármaco (D) y el anticuerpo (Ab) se rompe, haciendo que el fármaco libre se disocie del anticuerpo dentro de la célula. Por tanto, los restos escindidos del ADC son metabolitos intracelulares.

[0220] El término "biodisponibilidad" se refiere a la disponibilidad sistémica (es decir, niveles en sangre/plasma) de una cantidad dada de fármaco administrado a un paciente. La biodisponibilidad es un término absoluto que indica la medida de tanto el tiempo (tasa) como la cantidad total (grado) de fármaco que alcanza la circulación general de una forma de dosificación administrada.

[0221] El término "actividad citotóxica" se refiere a un efecto destructor de células, citostático o inhibidor del crecimiento de un conjugado de anticuerpo-fármaco o un metabolito intracelular de un conjugado de anticuerpo-fármaco. La actividad citotóxica puede expresarse como el valor de CI_{50} , que es la concentración (molar o másica) por unidad de volumen a la que sobreviven la mitad de las células.

[0222] "Alquilo" es hidrocarburo C_1-C_{18} que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos. Ejemplos son metilo (Me, $-CH_3$), etilo (Et, $-CH_2CH_3$), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, $-CH_2CH_2CH_3$), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, $-CH(CH_3)_2$), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, $-C(CH_3)_3$), 1-pentilo (n-pentilo, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-pentilo ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$), 3-pentilo ($-CH(CH_2CH_3)_2$), 2-metil-2-butilo ($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$), 3-metil-2-butilo ($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3-metil-1-butilo ($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$), 2-metil-1-butilo ($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1-hexilo ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-hexilo ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$), 3-hexilo ($-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$), 2-metil-2-pentilo ($-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$), 3-metil-2-pentilo ($-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$), 4-metil-2-pentilo ($-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$), 3-metil-3-pentilo ($-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$), 2-metil-3-pentilo ($-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$), 2,3-dimetil-2-butilo ($-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$), 3,3-dimetil-2-butilo ($-CH(CH_3)C(CH_3)_3$).

[0223] El término "alquilo C_1-C_8 ", como se usa en este documento, se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificado, saturado o insaturado, que tiene de 1 a 8 átomos de carbono. Grupos "alquilo C_1-C_8 " representativos incluyen, pero no se limitan a, -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo, -n-octilo, -n-nonilo y -n-decilo; mientras que alquilos C_1-C_8 ramificados incluyen, pero no se limitan a, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo, 2-metilbutilo, alquilos C_1-C_8 insaturados incluyen, pero no se limitan a, -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, -acetilenilo, -propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo, -3-metil-1-butinilo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, isohexilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 2,3,4-trimetilpentilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilhexilo, 2,4-dimetilhexilo, 2,5-dimetilhexilo, 3,5-dimetilhexilo, 2,4-dimetilpentilo, 2-metilheptilo, 3-metilheptilo, n-heptilo, isoheptilo, n-octilo e iso-octilo. Un grupo alquilo C_1-C_8 puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C_1-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -arilo, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, -halógeno, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ y $-CN$; en las que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C_1-C_8 y arilo.

[0224] "Alquenilo" es hidrocarburo C_2-C_{18} que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o

cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace sp^2 carbono-carbono. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a: etileno o vinilo ($-CH = CH_2$), alilo ($-CH_2CH = CH_2$), ciclopentenilo ($-C_5H_7$) y 5-hexenilo ($-CH_2CH_2CH_2CH = CH_2$)

5 **[0225]** “Alquinilo” es hidrocarburo C_2-C_{18} que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un triple enlace sp carbono-carbono. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a: acetilénico ($-C \equiv CH$) y propargilo ($-CH_2C \equiv CH$),

10 **[0226]** “Alquilenlo” se refiere a un radical hidrocarburo saturado, de cadena ramificada o lineal, o cíclico de 1-18 átomos de carbono y que tiene dos centros de radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alcano parental. Radicales alquilenlo típicos incluyen, pero no se limitan a: metileno ($-CH_2-$), 1,2-etilo ($-CH_2CH_2-$), 1,3-propilo ($-CH_2CH_2CH_2-$) y 1,4-butilo ($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$).

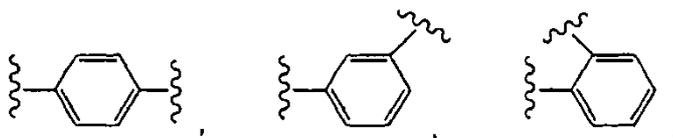
15 **[0227]** Un “alquilenlo C_1-C_{10} ” es un grupo de hidrocarburo saturado de cadena lineal de fórmula $-(CH_2)_{1-10}-$. Ejemplos de un alquilenlo C_1-C_{10} incluyen metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno y decaleno.

20 **[0228]** “Alquenileno” se refiere a un radical de hidrocarburo insaturado de cadena ramificada o lineal, o cíclico, de 2-18 átomos de carbono y que tiene dos centros de radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alqueno parental. Radicales alquilenlo típicos incluyen, pero no se limitan a: 1,2-etileno ($-CH = CH-$).

25 **[0229]** “Alquinileno” se refiere a un radical hidrocarburo insaturado de cadena ramificada o lineal, o cíclico, de 2-18 átomos de carbono y que tiene dos centros de radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alquino parental. Radicales alquinileno típicos incluyen, pero no se limitan a: acetileno ($-C \equiv C-$), propargilo ($-CH_2C \equiv C-$) y 4-pentnilo ($-CH_2CH_2CH_2C \equiv C-$).

30 **[0230]** “Arilo” se refiere a un grupo aromático carbocíclico. Ejemplos de grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo y antraceno. Un grupo aromático carbocíclico o un grupo aromático heterocíclico puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C_1-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -arilo, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, -halógeno, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ y $-CN$; en las que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C_1-C_8 y arilo.

35 **[0231]** Un “arileno” es un grupo arilo que tiene dos enlaces covalentes y puede estar en las configuraciones orto, meta o para como se muestra en las siguientes estructuras:



40 en las que el grupo fenilo puede estar sin sustituir o sustituido con hasta cuatro grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C_1-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -arilo, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, -halógeno, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ y $-CN$; en las que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C_1-C_8 y arilo.

45 **[0232]** “Arilalquilo” se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono terminal o sp^3 , está sustituido con un radical arilo. Grupos arilalquilo típicos incluyen, pero no se limitan a, bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobencilo y 2-naftofeniletan-1-ilo. El grupo arilalquilo comprende 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, el resto alquilo, que incluye grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del grupo arilalquilo tiene 1 a 6 átomos de carbono y el resto arilo tiene 5 a 14 átomos de carbono.

55 **[0233]** “Heteroarilalquilo” se refiere a un radical alquilo acíclico en que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono terminal o sp^3 , está sustituido con un radical heteroarilo. Grupos heteroarilalquilo típicos incluyen, pero no se limitan a, 2-bencimidazolimetilo y 2-furiletilo. El grupo

heteroarilalquilo comprende 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, el resto alquilo, que incluye grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del grupo heteroarilalquilo tiene 1 a 6 átomos de carbono y el resto heteroarilo tiene 5 a 14 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S. El resto heteroarilo del grupo heteroarilalquilo puede ser un monociclo que tiene 3 a 7 miembros de anillo (2 a 6 átomos de carbono o un biciclo que tiene 7 a 10 miembros de anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S), por ejemplo: un sistema de biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6].

[0234] “Alquilo sustituido”, “arilo sustituido” y “arilalquilo sustituido” significan alquilo, arilo y arilalquilo, respectivamente, en los que uno o más átomos de hidrógeno están cada uno independientemente sustituidos con un sustituyente. Sustituyentes típicos incluyen, pero no se limitan a, -X, -R, -O⁻, -OR, -SR, -S⁻, -NR₂, -NR₃, = NR, -CX₃, -CN, -OCN, -SCN, -N = C = O, -NCS, -NO, -NO₂, = N₂, -N₃, NC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR₂, -SO₃⁻, -SO₃H, -S(=O)₂R, -OS(=O)₂OR, -S(=O)₂NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)₂, -P(=O)(OR)₂, -PO₃⁻, -PO₃H₂, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO₂R, -CO₂⁻, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR₂, -C(=S)NR₂, -C(=NR)NR₂ en las que cada X es independientemente un halógeno: F, Cl, Br o I; y cada R es independientemente -H, alquilo C₂-C₁₈, arilo C₆-C₂₀, heterociclo C₃-C₁₄, grupo protector o resto de profármaco. Grupos alquilenos, alquenileno y alquinileno como se han descrito anteriormente también pueden estar similarmente sustituidos.

[0235] “Heteroarilo” y “heterociclo” se refieren a un sistema de anillo en el que uno o más átomos de anillo es un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre. El radical heterociclo comprende 1 a 20 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene 3 a 7 miembros de anillo (2 a 6 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S) o un biciclo que tiene 7 a 10 miembros de anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S), por ejemplo: un sistema de biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6].

[0236] Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A.; “Principles of Modern Heterocyclic Chemistry” (W.A. Benjamin, Nueva York, 1968), particularmente Capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; “The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs” (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 hasta el presente), en particular los volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82: 5566.

[0237] Ejemplos de heterociclos incluyen a modo de ejemplo y no limitación piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo oxidado con azufre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, bis-tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, bis-tetrahidropiranilo, tetrahydroquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, decahydroquinolinilo, octahydroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tiantrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizínilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, 4aH-carbazolilo, carbazolilo, β-carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, bencisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolínilo e isatinoílo.

[0238] A modo de ejemplo y no limitación, heterociclos unidos por carbono están unidos en la posición 2, 3, 4, 5 o 6 de una piridina, posición 3, 4, 5 o 6 de una piridazina, posición 2, 4, 5 o 6 de una pirimidina, posición 2, 3, 5 o 6 de una pirazina, posición 2, 3, 4 o 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, posición 2, 4 o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, posición 3, 4 o 5 de un isoxazol, pirazol o isotiazol, posición 2 o 3 de una aziridina, posición 2, 3 o 4 de una azetidina, posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una quinolina o posición 1, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una isoquinolina. Todavía más normalmente, heterociclos unidos por carbono incluyen 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 5-piridilo, 6-piridilo, 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 5-piridazinilo, 6-piridazinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 6-pirimidinilo, 2-pirazinilo, 3-pirazinilo, 5-pirazinilo, 6-pirazinilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo o 5-tiazolilo.

[0239] A modo de ejemplo y no limitación, heterociclos unidos por nitrógeno están unidos en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, posición 2 de un isoindol o isoindolina, posición 4 de una morfolina, y posición 9 de un carbazol o β-carbolina. Todavía más normalmente, heterociclos unidos por carbono incluyen 1-aziridilo, 1-azetidilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo y 1-piperidinilo.

[0240] Un “heterociclo C₃-C₈” se refiere a un carbociclo C₃-C₈ aromático o no aromático en el que uno a cuatro

de los átomos de carbono del anillo están independientemente sustituidos con un heteroátomo del grupo que consiste en O, S y N. Ejemplos representativos de un heterociclo C₃-C₈ incluyen, pero no se limitan a, benzofuranilo, benzotiofeno, indolilo, benzopirazolilo, cumarinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo. Un heterociclo C₃-C₈ puede estar sin sustituir o sustituido con hasta siete grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en las que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

10 **[0241]** “Heterociclo C₃-C₈” se refiere a un grupo heterociclo C₃-C₈ definido anteriormente en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo heterociclo está sustituido con un enlace. Un heterociclo C₃-C₈ puede estar sin sustituir o sustituido con hasta seis grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en las que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

15 **[0242]** “Carbociclo” significa un anillo saturado o insaturado que tiene 3 a 7 átomos de carbono como un monociclo o 7 a 12 átomos de carbono como un biciclo. Carbociclos monocíclicos tienen 3 a 6 átomos de anillo, todavía más normalmente 5 o 6 átomos de anillo. Carbociclos bicíclicos tienen 7 a 12 átomos de anillo, por ejemplo, dispuestos como un sistema de biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], o 9 o 10 átomos de anillo dispuestos como un sistema de biciclo [5,6] o [6,6]. Ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

25 **[0243]** Un “carbociclo C₃-C₈” es un anillo carbocíclico no aromático de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 miembros saturado o insaturado. Carbociclos C₃-C₈ representativos incluyen, pero no se limitan a, -ciclopropilo, -ciclobutilo, -ciclopentilo, -ciclopentadienilo, -ciclohexilo, -ciclohexenilo, -1,3-ciclohexadienilo, -1,4-ciclohexadienilo, -cicloheptilo, -1,3-cicloheptadienilo, -1,3,5-cicloheptatrienilo, -ciclooctilo y -ciclooctadienilo. Un grupo carbociclo C₃-C₈ puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en las que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

30 **[0244]** Un “carbociclo C₃-C₈” se refiere a un grupo carbociclo C₃-C₈ definido anteriormente en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo carbociclo está sustituido con un enlace.

35 **[0245]** “Ligador” se refiere a un resto químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo a un resto de fármaco. En diversas realizaciones, los ligadores incluyen un radical divalente tal como un alquildiilo, un arildiilo, un heteroarildiilo, restos tales como: -(CR₂)_nO(CR₂)_n-, unidades de repetición de alquiloxi (por ejemplo, polietilenoxi, PEG, polimetilenoxi) y alquilamino (por ejemplo, polietilenamino, JeffaminaTM); y éster de diácido y amidas que incluyen succinato, succinamida, diglicolato, malonato y caproamida.

45 **[0246]** El término “quiral” se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superponibilidad del componente de la imagen especular, mientras que el término “aquiral” se refiere a moléculas que son superponibles sobre el componente de la imagen especular.

[0247] El término “estereoisómeros” se refiere a compuestos que tienen constitución química idéntica, pero se diferencian con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

50 **[0248]** “Diaestereómero” se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diaestereómeros tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diaestereómeros pueden separarse bajo procedimientos analíticos de alta resolución tales como electroforesis y cromatografía.

55 **[0249]** “Enantiómeros” se refieren a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí.

[0250] Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en este documento generalmente siguen S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel,

E. y Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de girar el plano del plano-luz polarizada. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S, se usan para denotar la configuración absoluta de la molécula alrededor de su(s) centro(s) quiral(es). Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación del plano-luz polarizada por el compuesto, significando (-) o l que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos, excepto que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también puede denominarse en lo sucesivo un enantiómero, y una mezcla de tales isómeros se llama frecuentemente una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50: 50 de enantiómeros se denomina en lo sucesivo una mezcla racémica o un racemato, que puede producirse cuando no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción química o procedimiento. Los términos "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, carentes de actividad óptica.

[0251] "Grupo saliente" se refiere a un grupo funcional que puede estar sustituido por otro grupo funcional. Ciertos grupos salientes son muy conocidos en la técnica, y ejemplos incluyen, pero no se limitan a, un haluro (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), metanosulfonilo (mesilo), p-toluenosulfonilo (tosilo), trifluorometilsulfonilo (triflato) y trifluorometilsulfonato.

Abreviaturas

- 20 **[0252]** COMPONENTES DE LIGADOR:
- MC = 6-maleimidocaproilo
- 25 Val-Cit o "vc" = valina-citulina (un dipéptido a modo de ejemplo en un ligador escindible por proteasa)
- Citulina = ácido 2-amino-5-ureidopentanoico
- PAB = p-aminobenciloxycarbonilo (un ejemplo de un componente de ligador "auto-inmolativo")
- 30 Me-Val-Cit = N-metil-valina-citulina (en el que el enlace peptídico del ligador se ha modificado para evitar su escisión por catepsina B)
- MC(PEG)6-OH = maleimidocaproil-polietilenglicol (puede unirse a cisteínas de anticuerpo).
- 35 SPP = 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo
- SPDP = 3-(2-piridiltio)propionato de N-succinimidilo
- 40 SMCC = 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo
- IT = iminotiolano
- FÁRMACOS CITOTÓXICOS:
- 45 **[0253]** MMAE = mono-metilauristatina E (MW 718)
- MMAF = variante de auristatina E (MMAE) con una fenilalanina en el extremo C del fármaco (MW 731,5)
- 50 MMAF-DMAEA = MMAF con DMAEA (dimetilaminoetilamina) en un enlace de amida con la fenilalanina del extremo C (MW 801,5)
- MMAF-TEG = MMAF con tetraetilenglicol esterificada con la fenilalanina
- 55 MMAF-NtBu = N-t-butilo, unido como una amida al extremo C de MMAF
- DM1 = N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina
- DM3 = N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina

DM4 = N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina

[0254] Otras abreviaturas son las siguientes: AE es auristatina E, Boc es N-(t-butoxicarbonilo), cit es citrulina, 5 dap es dolaproína, DCC es 1,3-diciclohexilcarbodiimida, DCM es diclorometano, DEA es dietilamina, DEAD es dietilazodicarboxilato, DEPC es dietilfosforilcianidato, DIAD es diisopropilazodicarboxilato, DIEA es N,N-diisopropiletilamina, dil es dolaisoleucina, DMA es dimetilacetamida, DMAP es 4-dimetilaminopiridina, DME es éter dimetílico de etilenglicol (o 1,2-dimetoxietano), DMF es N,N-dimetilformamida, DMSO es sulfóxido de dimetilo, doe es dolafenina, dov es N,N-dimetilvalina, DTNB es ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico), DTPA es ácido 10 dietilentriaminapentaacético, DTT es ditioneitol, EDCI es clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, EEDQ es 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, EM-ES es espectrometría de masas por electropulverización, EtOAc es acetato de etilo, Fmoc es N-(9-fluorenilmetoxicarbonilo), gly es glicina, HATU es hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio, HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, HPLC es cromatografía líquida de alta presión, ile es isoleucina, lys es lisina, MeCN (CH₃CN) es acetonitrilo, MeOH es metanol, Mtr es 4- 15 anisildifenilmetilo (o 4-metoxitritilo), nor es (1S, 2R)-(+)-norefedrina, PBS es solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4), PEG es polietilenglicol, Ph es fenilo, Pnp es p-nitrofenilo, MC es 6-maleimidocaproilo, phe es L-fenilalanina, PyBrop es hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidinofosfonio, SEC es cromatografía de exclusión por tamaño, Su es succinimida, TFA es ácido trifluoroacético, CCF es cromatografía en capa fina, UV es ultravioleta y val es valina.

20 COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS DE PREPARACIÓN DE LAS MISMAS

[0255] Se proporcionan anticuerpos que se unen a STEAP-1. Se proporcionan inmunoconjugados que comprenden anticuerpos anti-STEAP-1. Los anticuerpos e inmunoconjugados de la invención son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de trastornos asociados a expresión alterada, por ejemplo, expresión 25 elevada, de STEAP-1. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención son útiles para el diagnóstico o tratamiento de un trastorno proliferativo de células, tal como cáncer.

Anticuerpos anti-STEAP-1

[0256] En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que se unen a STEAP-1. En algunas 30 realizaciones se proporcionan anticuerpos que se unen a una forma madura de STEAP-1 humana y de mono cinomolgo (cino). En una realización tal, una forma madura de STEAP-1 humana tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (Figura 1). La STEAP-1 de cino tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (Figura 1). En algunas realizaciones, un anticuerpo para STEAP-1 se une a una forma madura de STEAP-1 35 expresada sobre la superficie celular. En algunas realizaciones, un anticuerpo que se une a una forma madura de STEAP-1 expresada sobre la superficie celular inhibe el crecimiento de la célula. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-STEAP-1 se une a una forma madura de STEAP-1 expresada sobre la superficie celular e inhibe la proliferación celular. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-STEAP-1 se une a una forma madura de STEAP-1 expresada sobre la superficie celular e induce muerte celular. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-STEAP-1 40 se une a una forma madura de STEAP-1 expresada sobre la superficie de células cancerosas. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-STEAP-1 se une a una forma madura de STEAP-1 que se expresa en exceso sobre la superficie de células cancerosas con respecto a células normales del mismo origen de tejido. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-STEAP-1 está conjugado con una citotoxina o una marca detectable y se une a STEAP-1 sobre una superficie celular. En algunas realizaciones, el conjugado de anticuerpo-toxina inhibe el 45 crecimiento de la célula. En algunas realizaciones, el conjugado de anticuerpo-marca detectable produce una célula que expresa STEAP-1 sobre su superficie para que sea detectable *in vitro* o *in vivo*.

[0257] El anticuerpo anti-STEAP-1 es un anticuerpo monoclonal humanizado. El anticuerpo anti-STEAP-1 puede ser un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv o (Fab')₂. Un anticuerpo 50 anti-STEAP-1 puede ser un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En un aspecto, cualquiera de los anticuerpos anti-STEAP-1 descritos en este documento está purificado.

[0258] En este documento se proporcionan anticuerpos monoclonales a modo de ejemplo derivados de una biblioteca de fagos. El antígeno usado para cribar la biblioteca fue un polipéptido que tenía la secuencia de 55 secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 30, correspondientes a los dominios extracelulares (ECD) de STEAP-1 beta y alfa. Los anticuerpos resultantes del cribado de bibliotecas están madurados por afinidad.

[0259] En un aspecto se proporcionan anticuerpos monoclonales que compiten con murino 120.545, 120 injerto y 120v.24 humanizado por la unión a STEAP-1. También se proporcionan anticuerpos monoclonales que se

unen al mismo epítoto que murino 120.545, 120 injerto y 120v.24 humanizado.

[0260] Se proporcionan polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-STEAP-1. Se proporcionan vectores que comprenden polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-STEAP-1. Se proporcionan células huésped que comprenden tales vectores. Se proporcionan composiciones que comprenden anticuerpos anti-STEAP-1 o polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-STEAP-1. En ciertas realizaciones, una composición de la invención es una formulación farmacéutica para el tratamiento de un trastorno proliferativo de células, tal como aquellos enumerados en este documento.

10 Una descripción detallada de anticuerpos anti-STEAP-1 a modo de ejemplo es del siguiente modo:

1. Realizaciones específicas de anticuerpos anti-STEAP-1

[0261] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 10 de la Figura 2B. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 6 de la Figura 2A.

[0262] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 9, que tiene los siguientes cambios de amino en la posición de Kaben indicada: A24V y opcionalmente uno o más de V37I, V48M, F67I y L78F.

La cadena pesada comprende una región estructural de la cadena pesada FR-H1 de SEQ ID NO: 25. Como se usa en este documento, las regiones estructurales de la cadena pesada se designan "FR-H1-H4" o "HC-FR1-FR4" y las regiones estructurales de la cadena ligera se designan "FR-L1-L4" o "LC-FR1-FR4". En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 6.

[0263] La invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende 6 de las secuencias de HVR del anticuerpo 120.v24 mostrado en las Figuras 2A y 2B.

[0264] Generalmente, un anticuerpo anti-STEAP-1 puede comprender cualquier secuencia del dominio variable de la región estructural adecuada, siempre que el anticuerpo retenga la capacidad para unirse a STEAP-1. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos anti-STEAP-1 de la invención comprenden una secuencia consenso de la región estructural de la cadena pesada del subgrupo III humana. La secuencia consenso de la región estructural de la cadena pesada puede comprender sustitución (sustituciones) en la posición 24, 37, 48, 67 y/o 78. La posición 24 puede ser A o V, la posición 37 puede ser I o V, la posición 48 puede ser M o V, la posición 67 puede ser I o F y/o la posición 78 puede ser F o L. En una realización, estos anticuerpos comprenden una secuencia de la región estructural del dominio variable de la cadena pesada de huMAb4D5-8, por ejemplo, SEQ ID NO: 22, 23 y 24 (FR-H2, FR-H3, FR-H4, respectivamente). huMAb4D5-8 es comercialmente conocido como el anticuerpo anti-HER2 HERCEPTIN[®], Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EE.UU.; también se refiere en las patentes de EE.UU. N^o 6.407.213 y 5.821.337, y Lee y col., J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93. En una realización tal, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de la región estructural de la cadena ligera humana. En una realización tal, estos anticuerpos comprenden una secuencia de la región estructural del dominio variable de la cadena ligera de huMAb4D5-8, por ejemplo SEQ ID NO: 17, 18, 19 y 20 (FR-L1, FR-L2, FR-L3, FR-L4, respectivamente).

[0265] En una realización, un anticuerpo anti-STEAP-1 comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de la región estructural y regiones hipervariables, en el que la secuencia de la región estructural comprende las secuencias de FR-H1-FR-H4 SEQ ID NO: 25 (FR-H1), 22 (FR-H2), 23 (FR-H3) y 24 (FR-H4), respectivamente; HVR H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y HVR-H3 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. En una realización, un anticuerpo anti-STEAP-1 comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de la región estructural y regiones hipervariables, en el que la secuencia de la región estructural comprende las secuencias de FR-L1-FR-L4 de SEQ ID NO: 17, 18, 19 y 20, respectivamente; HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 11, 12 y 13. En una realización de estos anticuerpos, el dominio variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 10 y el dominio variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 6.

[0266] En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende un

dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencias con una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9 o 10. En algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de 5 secuencias contiene sustituciones, inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia de aminoácidos retiene la capacidad para unirse a STEAP-1. En algunas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado o deleccionado en una secuencia SEQ ID NO: 9, 10, 14, 15, 16, 21, 22, 23, 24, 25, 75, 76, 77, 78 y/o 79. En algunas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En algunas realizaciones, 10 un anticuerpo anti-STEAP-1 comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

[0267] En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende un dominio variable de la cadena pesada como se representa en la Figura 2B (SEQ ID NO: 10).

15

[0268] Las secuencias de HVR y FR de la cadena pesada descritas en este documento pueden comprender las siguientes:

- HVR-H1 (GYSITSDYAWN, SEQ ID NO: 14)
- 20 HVR-H2 (GYISNSGSTSYNPSLKS, SEQ ID NO: 15)
- HVR-H3 (ERNYDYDDYYAMDY, SEQ ID NO: 16)
- FR-H1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS, SEQ ID NO: 21)
- FR-H1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS, SEQ ID NO: 25)
- FR-H2 (WVRQAPGKGLEWV, SEQ ID NO: 22)
- 25 FR-H2 (WIRQAPGKGLEWV, SEQ ID NO: 75)
- FR-H2 (WVRQAPGKGLEWM, SEQ ID NO: 76)
- FR-H2 (WIRQAPGKGLEWM, SEQ ID NO: 77)
- FR-H3 (RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR, SEQ ID NO: 23)
- FR-H3 (RITISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR, SEQ ID NO: 78)
- 30 FR-H3 (RFTISRDNKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCAR, SEQ ID NO: 79)
- FR-H4 (WGQGTLVTVSS, SEQ ID NO: 24)

[0269] En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende un dominio variable de la cadena ligera como se representa en la Figura 2A (SEQ ID NO: 6).

35

[0270] Las secuencias de HVR de la cadena ligera comprenden las siguientes:

- HVR-L1 (KSSQSLLYRSNQKNYLA, SEQ ID NO: 11)
- HVR-L2 (WASTRES, SEQ ID NO: 12)
- 40 HVR-L3 (QQYYNYPRT, SEQ ID NO: 13).

[0271] En algunas realizaciones, las secuencias de FR de la cadena ligera comprenden las siguientes:

- FR-L1 (DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC, SEQ ID NO: 17);
- 45 FR-L2 (WYQQKPGKAPKLLIY, SEQ ID NO: 18);
- FR-L3 (GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC, SEQ ID NO: 19)
- FR-L4 (FGQGTKVEIKR, SEQ ID NO: 20).

[0272] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencias con una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencias contiene sustituciones, adiciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que 50 comprende esa secuencia de aminoácidos retiene la capacidad para unirse a STEAP-1. Un total de 1 a 10 aminoácidos pueden estar sustituidos, insertados o deleccionados en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 6, 17, 18, 19 y 20. Las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-STEAP-1 comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6. 55

[0273] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende (a) un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencias con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 9 y 10; y (b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencias con una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencias contiene sustituciones, adiciones, o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia de aminoácidos retiene la capacidad para unirse a STEAP-1. Un total de 1 a 10 aminoácidos pueden estar sustituidos, insertados o delecionados en la secuencia de referencia que incluye, pero no se limita a, una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 9, 10, 21, 22, 23, 24, 75, 76, 77, 78, 79. Las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-STEAP-1 comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 6.

[0274] La presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende (a) una, dos o tres HVR de VH seleccionadas de aquellas mostradas en la Figura 2B y/o (b) una, dos o tres HVR de VL seleccionadas de aquellas mostradas en la Figura 2A. La divulgación proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende un dominio variable de la cadena pesada seleccionado de aquellos mostrados en la Figura 2B y un dominio variable de la cadena ligera seleccionado de aquellos mostrados en la Figura 2A.

2. Fragmentos de anticuerpos

[0275] La presente invención engloba fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos pueden generarse por medios tradicionales tales como digestión enzimática, o por técnicas recombinantes. En ciertas circunstancias hay ventajas de uso de fragmentos de anticuerpos en vez de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite la rápida eliminación, y puede conducir al acceso mejorado a tumores sólidos. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpos véase Hudson y col. (2003) Nat. Med. 9: 129-134.

[0276] Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); y Brennan y col., Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ahora ser directamente producidos por células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv pueden todos expresarse en y secretarse de *E. coli*, permitiendo así la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos tratadas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente de cultivo de células huésped recombinantes. El fragmento Fab y F(ab')₂ con elevada semivida *in vivo* que comprende residuos del epítipo de unión al receptor silvestre se describe en la patente de EE.UU. N° 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el médico experto. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; las patentes de EE.UU. N° 5.571.894; y 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes; por tanto, pueden ser adecuadas para la unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión de scFv para dar la fusión de una proteína efectora en tanto el extremo amino como el carboxi de un scFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, arriba. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5.641.870. Tales anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

3. Anticuerpos humanizados

[0277] La invención engloba anticuerpos humanizados. En la técnica se conocen diversos procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente en lo sucesivo residuos de "importación", que se toman normalmente de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y

colaboradores (Jones y col. (1986) Nature 321: 522-525; Riechmann y col. (1988) Nature 332: 323-327; Verhoeyen y col. (1988) Science 239: 1534-1536) sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. N° 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano
5 intacto ha sido sustituido con la secuencia correspondiente de un especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

[0278] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que van a usarse en la
10 producción de anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. Según el llamado procedimiento "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano conocido. La secuencia humana que está más próxima a la del roedor es entonces aceptada como la región estructural humana para el anticuerpo humanizado (Sims y col. (1993) J. Immunol. 151: 2296; Chothia y col. (1987) J. Mol. Biol. 196: 901. Otro procedimiento usa una
15 región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región estructural puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285; Presta y col. (1993) J. Immunol., 151: 2623.

[0279] Es adicionalmente generalmente deseable que los anticuerpos se humanicen con retención de alta
20 afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un procedimiento, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares
25 para aquellos expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR pueden seleccionarse y
30 combinarse a partir de las secuencias del receptor y de importación de manera que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como aumento de la afinidad por el (los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y principalmente sustancialmente implicados en influir la unión a antígeno.

4. Anticuerpos humanos

[0280] Los anticuerpos anti-STEAP-1 humanos pueden construirse combinando secuencia(s) del dominio
35 variable del clon de Fv seleccionada(s) de bibliotecas de expresión in fago derivadas de ser humano con secuencias(s) del dominio constante humano conocida(s) como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos anti-STEAP-1 monoclonales humanos pueden producirse por el procedimiento de hibridoma. Se han
40 descrito líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, por Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner y col., J. Immunol., 147: 86 (1991).

[0281] Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, tras la inmunización,
45 pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (JH) en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal produce la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz del gen de inmunoglobulina de la línea germinal
50 humana en tales ratones mutantes de la línea germinal producirá la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362: 255 (1993); Bruggemann y col., Year in Immunol., 7: 33 (1993).

[0282] El barajado de genes también puede usarse para derivar anticuerpos humanos de no humanos, por
55 ejemplo, de roedor, en el que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. Según este procedimiento, que también se llama "sellado de epítopes", tanto la región variable de la cadena pesada como de la ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido por técnicas de expresión in fago como se describen en este documento están sustituidas con un repertorio de genes del dominio V humano, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena no humana / cadena humana. La selección

con antígeno produce el aislamiento de un scfv o Fab quimérico de cadena no humana / cadena humana en el que la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido tras la eliminación de la cadena no humana correspondiente en el clon de expresión en fago primario, es decir, el epítipo gobierna (sella) la elección del componente de la cadena humana. Si el procedimiento se repite con el fin de sustituir la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de FR o CDR de origen no humano.

5. Anticuerpos biespecíficos

10

[0283] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos humanos o humanizados. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es por STEAP-1 y la otra es por cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopes diferentes de STEAP-1. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos a células que expresan STEAP-1. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a STEAP-1 y un brazo que se une a agente citotóxico, tal como, por ejemplo, saporina, anti-interferón- α , alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

20

[0284] Los procedimientos para producir anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina en los que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature 305: 537 (1993)). Debido al surgido aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las que sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se hace normalmente por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante embarazosa, y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se desvelan en el documento WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993 y en Traunecker y col., EMBO J., 10: 3655 (1991).

30

[0285] Según un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios que combinan anticuerpo-antígeno) están fusionados a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. En ciertas realizaciones, la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones en las que relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales produzca altos rendimientos o cuando las relaciones no sean de significancia particular.

45

[0286] En una realización de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Esta solución se desvela en el documento WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y col., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986).

50

[0287] Según otro enfoque, la superficie de separación entre un par de moléculas de anticuerpos puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La superficie de separación comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la superficie de separación de la primera molécula de anticuerpo están sustituidos con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se

55

crean sobre la superficie de separación de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos grandes por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

5

[0288] Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para elegir como diana células del sistema inmunitario para células no deseadas (patente de EE.UU. Nº 4.676.980) y para el tratamiento de infección por el VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 10 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden producirse usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Agentes de reticulación adecuados son muy conocidos en la técnica y se desvelan en la patente de EE.UU. Nº 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

[0289] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando enlace químico. Brennan y col., Science 229: 81 (1985), describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditioi arsenito de sodio para estabilizar ditioles vecinos y prevenir la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). 20 Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte entonces en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro Fab'-TNB derivado para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[0290] El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden 25 acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992), describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido in vitro para formar el anticuerpo biespecífico. Por tanto, el anticuerpo biespecífico formado podía unirse a células que expresan en exceso el receptor HER2 y linfocitos T humanos normales, además de desencadenar la actividad lítica de linfocitos 30 citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

[0291] También se han descrito diversas técnicas para producir y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se han producido usando cremalleras de leucina. Kostelny y col., J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes 35 mediante fusión de genes. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y entonces se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993), ha proporcionado un mecanismo alternativo para 40 producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) por un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento están obligados a aparearse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formándose así dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado otra estrategia para producir fragmentos de anticuerpos 45 biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv (sFv). Véase, Gruber y col., J. Immunol., 152: 5368 (1994).

[0292] Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt y col., J. Immunol. 147: 60 (1991).

50 **6. Anticuerpos multivalentes**

[0293] Un anticuerpo multivalente puede ser internalizado (y/o catabolizado) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención puede ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de los de la clase de IgM) con tres o más sitios de 55 unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetraivalentes), que pueden ser fácilmente producidos por expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptidos del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En ciertas realizaciones, el dominio de dimerización comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno del extremo amino a la región Fc. En

ciertas realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho sitios de unión a antígeno. En una realización tal, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena de polipéptidos (por ejemplo, dos cadenas de polipéptidos), en el que la(s) cadena(s) de polipéptidos comprende(n) dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptidos puede(n) comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc en la que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptidos de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 o 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptidos puede(n) comprender: cadena de VH-CH1-ligador flexible-VH-CH1-región Fc; o cadena de VH-CH1-VH-CH1-región Fc. El anticuerpo multivalente en este documento puede comprender adicionalmente al menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. El anticuerpo multivalente en este documento puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de la cadena ligera y, opcionalmente, además comprenden un dominio CL.

15 **7. Anticuerpos de un único dominio**

[0294] Un anticuerpo puede ser un anticuerpo de un único dominio. Un anticuerpo de un único dominio es una cadena de un único polipéptido que comprende toda o una parte del dominio variable de la cadena pesada o toda o una parte del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. Un anticuerpo de un único dominio puede ser un anticuerpo de un único dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.248.516 B1). Un anticuerpo de un único dominio puede consistir en toda o una parte del dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo.

25 **8. Variantes de anticuerpo**

[0295] En algunas realizaciones se contemplan modificación (modificaciones) de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en este documento. Por ejemplo, puede desearse mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo pueden prepararse introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede hacerse cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento de producirse la secuencia.

[0296] Un procedimiento útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son las localizaciones preferidas para mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Well (1989) Science, 244: 1081-1085. Aquí se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen con un aminoácido neutro o negativamente cargado (por ejemplo, alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con antígeno. Entonces, aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan introduciendo más u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, mientras que el sitio para la introducción de una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación por sí misma no necesita predeterminarse. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, el barrido de ala o la mutagénesis al azar se realiza en el codón o región diana y las inmunoglobulinas expresadas se criban para la actividad deseada.

[0297] Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de extremos amino y/o carboxilo que oscilan en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, además de inserciones de secuencia dentro de la secuencia de un único o múltiples residuos de aminoácidos. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo en el extremo N. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

[0298] En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención es alterado para aumentar o disminuir el grado al que el anticuerpo está glicosilado. La glicosilación de polipéptidos está normalmente tanto ligada a N como ligada a O. Ligado a N se refiere a la unión de un resto hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina en las que X es cualquier aminoácido, excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto hidrato de carbono a la

cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un posible sitio de glicosilación. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, el más comúnmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

5

[0299] La adición o delección de sitios de glicosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que se creen o se eliminen una o más de las secuencias de tripéptidos anteriormente descritas (para sitios de glicosilación ligados a N). La alteración también puede hacerse mediante la adición, delección o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación ligados a O).

10

[0300] Si el anticuerpo comprende una región Fc, el hidrato de carbono unido al mismo puede alterarse. Por ejemplo, anticuerpos con una estructura de hidrato de carbono madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la solicitud de patente de EE.UU. N° US 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también el documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina bisecante (GlcNAc) en el hidrato de carbono unido a una región Fc del anticuerpo se mencionan en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet y col. y la patente de EE.UU. N° 6.602.684, Umana y col. Anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se informan en el documento WO 1997/30087, Patel y col. Véanse, por tanto, el documento WO 1998/58964 (Raju, S.) y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.) referente a anticuerpos con hidrato de carbono alterado unidos a la región Fc de los mismos. Véase también el documento US 2005/0123546 (Umana y col.) sobre moléculas de unión a antígeno con glicosilación modificada.

15

20

[0301] En ciertas realizaciones, una variante de glicosilación comprende una región Fc, en la que una estructura de hidrato de carbono unida a la región Fc carece de fucosa. Tales variantes tienen función ADCC mejorada. Opcionalmente, la región Fc comprende además una o más sustituciones de aminoácidos en su interior que mejoran adicionalmente ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración de residuos Eu). Ejemplos de publicaciones relacionadas con los anticuerpos “defucosilados” o “deficientes en fucosa” incluyen: documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki y col. J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki y col. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos defucosilados incluyen células Lec13 CHO deficientes en la fucosilación de proteínas (Ripka y col. Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986); solicitud de patente de EE.UU. N° US 2003/0157108 A1, Presta, L; y documento WO 2004/056312 A1, Adams y col., especialmente en el Ejemplo 11) y líneas celulares de genes inactivados tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO de genes inactivados (Yamane-Ohnuki y col. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)).

25

30

35

[0302] En una realización, el anticuerpo está alterado para mejorar su semivida en suero. Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) puede incorporarse un epítipo de unión a receptor silvestre como se describe, por ejemplo, en el documento US 5739277. Como se usa en este documento, el término “epítipo de unión a receptor silvestre” se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG (documentos US 2003/0190311, US6821505; US 6165745; US 5624821; US 5648260; US 6165745; US 5834 597).

40

45

[0303] Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo sustituida con un residuo diferente. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de “Sustituciones preferidas”. Si tales sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados “Sustituciones a modo de ejemplo” en la Tabla 1, o como se describen adicionalmente más adelante en referencia a clases de aminoácidos, y cribarse los productos.

50

TABLA 1

Residuo original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

5 **[0304]** Se llevan a cabo modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que se diferencian significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) la masa de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse según similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, 10 en Biochemistry, segunda ed., pág. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

(1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polares sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácidos: Asp (D), Glu (E)

15 (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His(H)

[0305] Alternativamente, los residuos que se producen naturalmente pueden dividirse en grupos basándose en propiedades comunes de las cadenas laterales:

20 (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

25 (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

[0306] Las sustituciones no conservativas supondrán el intercambio de un miembro de una de estas clases con otra clase. Tales residuos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa o, en los sitios (no conservados) restantes.

30

[0307] Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para el desarrollo posterior tendrá(n) propiedades biológicas modificadas (por ejemplo, mejoradas) con respecto al anticuerpo parental del que se generan. Una forma conveniente de generar tales

35 variantes de sustitución implica maduración por afinidad usando expresión en fago. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se maduran para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Por tanto, los anticuerpos generados se expresan en partículas de fago filamentosas como

fusiones con al menos parte de una proteína de la envoltura del fago (por ejemplo, el producto génico III de M13) encapsidada dentro de cada partícula. Entonces, las variantes expresadas en fago se criban para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Con el fin de identificar sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, la mutagénesis por barrido (por ejemplo, barrido de alanina) puede realizarse para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas conocidas en la técnica, incluyendo aquellas elaboradas en este documento. Una vez se generan tales variantes, el panel de variantes se somete a cribado usando técnicas conocidas la técnica, incluyendo aquellas descritas en este documento, y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para el posterior desarrollo.

[0308] Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que se producen naturalmente) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida a sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete de una versión de variante o de no variante anteriormente preparada del anticuerpo.

[0309] Puede desearse introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de los anticuerpos de la invención, generándose así una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos que incluyen la de una cisteína bisagra.

[0310] Según esta descripción y las enseñanzas de la materia, se contempla que en algunas realizaciones un anticuerpo de la invención pueda comprender una o más alteraciones con respecto al anticuerpo homólogo natural, por ejemplo, en la región Fc. Sin embargo, estos anticuerpos retendrían sustancialmente las mismas características requeridas para la utilidad terapéutica con respecto a su homólogo natural. Por ejemplo, se cree que pueden hacerse ciertas alteraciones en la región Fc que producirían unión de C1q alterada (es decir, tanto mejorada como disminuida) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan & Winter Nature 322: 738-40 (1988); la patente de EE.UU. Nº 5.648.260; la patente de EE.UU. Nº 5.624.821; y el documento WO94/29351 referente a otros ejemplos de variantes de región Fc. El documento WO00/42072 (Presta) y el documento WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a FcR.

Véase también Shields y col., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con semividas elevadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y col., J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim y col., J. Immunol. 24: 249 (1994)), se describen en el documento US2005/0014934A1 (Hinton y col.). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en su interior que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Las variantes de polipéptidos con secuencias de aminoácidos de región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q elevada o disminuida se describen en la patente de EE.UU. Nº 6.194.551B1, documento WO99/51642. Véase también Idusogie y col. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

[0311] En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en la superficie de separación de polipéptidos de Fc que comprenden la región Fc, en el que las modificaciones facilitan y/o promueven la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido de Fc y una cavidad en un segundo polipéptido de Fc, siendo la protuberancia posicionable en la cavidad de manera que se promueva la complejación del primer y segundo polipéptidos de Fc. Los procedimientos de generación de anticuerpos con estas modificaciones se conocen en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. Nº 5.731.168.

9. Derivados de anticuerpos

[0312] Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse adicionalmente para contener restos no proteínicos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferentemente, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano,

poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (tanto homopolímeros como copolímeros al azar) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El polietilenglicol-propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o sin ramificar. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si está unido más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización pueden determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que va a mejorarse, si el anticuerpo derivado se usará o no en una terapia en condiciones definidas, etc.

[0313] En otra realización se proporcionan conjugados de un anticuerpo y resto no proteináceo que pueden calentarse selectivamente por exposición a radiación. En una realización, el resto no proteináceo es un nanotubo de carbono (Kam y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero no se limita a, longitudes de onda que no dañan células ordinarias, pero que calientan el resto no proteináceo a una temperatura a la que las células próximas al anticuerpo-resto no proteináceo se destruyen.

Ciertos procedimientos de producción de anticuerpos

1. Ciertos procedimientos basados en hibridoma

[0314] Los anticuerpos anti-STEAP-1 monoclonales de la invención pueden producirse usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., Nature, 256: 495 (1975), o resto no proteináceo mediante procedimientos de ADN recombinante (patente de EE.UU. N° 4.816.567).

[0315] En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado tal como un hámster se inmuniza para provocar que los linfocitos produzcan o puedan producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Los anticuerpos para STEAP-1 se producen generalmente en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de STEAP-1 y un adyuvante. STEAP-1 puede producirse usando procedimientos muy conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen adicionalmente en este documento. Por ejemplo, STEAP-1 puede producirse recombinantemente. En una realización, los animales se inmunizan con un derivado de STEAP-1 que contiene una porción extracelular de STEAP-1 fusionada con la porción de Fc de una cadena pesada de la inmunoglobulina. En una realización, los animales se inmunizan con una proteína de fusión de STEAP-1-IgG1. En una realización, los animales se inmunizan con derivados inmunogénicos de STEAP-1 en una disolución con monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT), y la disolución se inyecta intradérmicamente en múltiples sitios. Dos semanas después los animales se refuerzan. Siete a catorce días después los animales se sangran, y el suero se ensaya para título anti-STEAP-1. Los animales se refuerzan hasta las mesetas del título.

[0316] Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse in vitro. Entonces, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado tal como polietilenglicol para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)).

[0317] Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma sin fusionar parentales. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

[0318] En ciertas realizaciones, células de mieloma son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Células de mieloma a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, líneas de mieloma murino tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección americana de cultivos tipo, Rockville, Mariland, EE.UU. Las líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and

Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

[0319] El medio de cultivo en el que las células de hibridoma están cultivándose se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales que se unen a STEAP-1. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson y col., *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

10 **[0320]** Después de identificarse células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante procedimientos convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

2. Ciertos procedimientos de cribado de bibliotecas

20

[0321] Los anticuerpos anti-STEAP-1 de la invención pueden producirse usando bibliotecas combinatorias para cribar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, en la técnica se conocen una variedad de procedimientos para generar bibliotecas de expresión en fago y cribar tales bibliotecas para anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Tales procedimientos se describen generalmente en Hoogenboom y col. (2001) en *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien y col., ed., Human Press, Totowa, NJ) y, en ciertas realizaciones, en Lee y col. (2004) *J. Mol. Biol.* 340: 1073-1093.

[0322] En principio, se seleccionan clones de anticuerpos sintéticos cribando bibliotecas de fagos que contienen el fago que muestra diversos fragmentos de la región variable (Fv) del anticuerpo fusionada con la proteína de la envoltura del fago. Tales bibliotecas de fagos son inmunopurificadas por cromatografía de afinidad contra el antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos de Fv que pueden unirse al antígeno deseado son adsorbidos al antígeno y, por tanto, se separan de los clones de no unión en la biblioteca. Entonces, los clones de unión se eluyen del antígeno y pueden enriquecerse adicionalmente por ciclos adicionales de adsorción/elución de antígenos. Cualquiera de los anticuerpos anti-STEAP-1 de la invención puede obtenerse diseñando un procedimiento de cribado de antígenos adecuado para seleccionar el clon del fago de interés, seguido de la construcción de un clon del anticuerpo anti-STEAP-1 de longitud completa usando las secuencias de Fv del clon del fago de interés y secuencias de la región constante (Fc) adecuadas descritas en Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3.

40 **[0323]** En ciertas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, cada una de ellas de las cadenas ligeras (VL) y pesadas (VH), que presentan ambas tres bucles hipervariables (HVR) o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los dominios variables pueden expresarse funcionalmente en fago, tanto como fragmentos de Fv monocatenarios (scFv), en los que VH y VL están covalentemente unidas mediante un péptido flexible corto, como fragmentos Fab, en los que cada uno está fusionado con un dominio constante e interactúan no covalentemente, como se describe en Winter y col., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Como se usa en este documento, clones del fago que codifican scFv y clones del fago que codifican Fab se denominan conjuntamente en lo sucesivo "clones del fago de Fv" o "clones de Fv".

50 **[0324]** Los repertorios de genes VH y VL pueden clonarse por separado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse al azar en bibliotecas de fagos, que luego pueden buscarse para clones de unión a antígeno como se describe en Winter y col., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio sin tratamiento previo puede clonarse para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos para un amplio intervalo de no auto- y también auto-antígenos sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths y col., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las bibliotecas sin tratamiento previo también pueden prepararse sintéticamente clonando los segmentos del gen V sin reorganizar de citoblastos y usando cebadores de PCR que contienen la secuencia al azar para codificar las regiones de CDR3 altamente variables y para realizar la reorganización *in vitro* como se describe por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:

381-388 (1992).

[0325] En ciertas realizaciones se usa fago filamentoso para expresar fragmentos de anticuerpos por fusión a la proteína de la envoltura menor pIII. Los fragmentos de anticuerpos pueden expresarse como fragmentos de Fv monocatenarios, en los que los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena de polipéptidos por un espaciador de polipéptidos flexible, por ejemplo, como se describe por Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena está fusionada con pIII y la otra es secretada en el periplasma de células huésped bacterianas en las que el ensamblaje de una estructura de Fab-proteína de la envoltura que se expresa en la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de la envoltura natural, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom y col., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

[0326] En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpos se obtienen de células inmunitarias recogidas de seres humanos o animales. Si se desea una biblioteca sesgada en favor de clones anti-STEAP-1, el sujeto se inmuniza con STEAP-1 para generar una respuesta de anticuerpos, y células del bazo y/o linfocitos B en circulación distintos de linfocitos de la sangre periférica (PBL) se recuperan para la construcción de bibliotecas. En una realización preferida, una biblioteca de fragmentos de genes de anticuerpos humanos sesgada en favor de clones anti-STEAP-1 se obtiene generando una respuesta de anticuerpos anti-STEAP-1 en ratones transgénicos que llevan una matriz de genes de inmunoglobulina humana funcional (y que carece de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcionales) de forma que la inmunización con STEAP-1 da lugar a anticuerpos humanos productores de linfocitos B contra STEAP-1. La generación de ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos se describe más adelante.

[0327] El enriquecimiento adicional en poblaciones de células reactivas anti-STEAP-1 puede obtenerse usando un procedimiento de cribado adecuado para aislar linfocitos B que expresan anticuerpo unido a la membrana específico para STEAP-1, por ejemplo, por separación de células usando cromatografía de afinidad por STEAP-1 o adsorción de células a STEAP-1 marcada con fluorocromo, seguido de citometría de flujo (FACS).

[0328] Alternativamente, el uso de células del bazo y/o linfocitos B u otros PBL de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos, y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos usando cualquier especie de animal (humana o no humana) en la que STEAP-1 no sea antigénica. Para bibliotecas que incorporan la construcción de genes de anticuerpos in vitro, los citoblastos se recogen del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos de genes de anticuerpos sin reorganizar. Las células inmunitarias de interés pueden obtenerse a partir de una variedad de especies de animales tales como especies humanas, de ratón, de rata, de lagomorfo, luprina, canina, felina, porcina, bovina, equina y aviar, etc.

[0329] Segmentos de genes variables de anticuerpos que codifican ácidos nucleicos (incluyendo segmentos de VH y VL) se recuperan de las células de interés y se amplifican. En el caso de bibliotecas de genes VH y VL reorganizadas, el ADN deseado puede obtenerse aislando ADN genómico o ARNm de linfocitos, seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que hacen coincidir los extremos 5' y 3' de los genes VH y VL reorganizados como se describe en Orlandi y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989), produciendo así diversos repertorios de genes V para la expresión. Los genes V pueden amplificarse a partir de ADNc y ADN genómico, con cebadores inversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y cebadores directos basados dentro del segmento J como se describe en Orlandi y col. (1989) y en Ward y col., *Nature*, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir de ADNc, los cebadores inversos también pueden basarse en el exón conductor como se describe en Jones y col., *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), y los cebadores directos dentro de la región constante como se describe en Sastry y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad puede incorporarse degeneración en los cebadores como se describe en Orlandi y col. (1989) o Sastry y col. (1989). En ciertas realizaciones, la diversidad de bibliotecas se maximiza usando cebadores de PCR elegidos como diana para cada familia del gen V con el fin de amplificar todas las disposiciones de VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácidos nucleicos de células inmunitarias, por ejemplo, como se describe en el procedimiento de Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) o como se describe en el procedimiento de Orum y col., *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). Para clonar el ADN amplificado en vectores de expresión, sitios de restricción raros pueden introducirse dentro del cebador de PCR como una marca en un extremo como se describe en Orlandi y col. (1989), o por posterior amplificación por PCR con un cebador marcado como se describe en Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991).

[0330] Pueden derivarse repertorios de genes V sintéticamente reorganizados in vitro de segmentos de genes V. La mayoría de los segmentos de genes VH humanos se han clonado y secuenciado (informado en Tomlinson y

col., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)) y mapeado (informado en Matsuda y col., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)); estos segmentos clonados (incluyendo todas las conformaciones principales del bucle H1 y H2) pueden usarse para generar diversos repertorios de genes VH con cebadores de PCR que codifican bucles H3 de diversa secuencia y longitud como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Los repertorios de VH
 5 también pueden prepararse con toda la diversidad de secuencias centrada en un bucle H3 largo de una única longitud como se describe en Barbas y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos de Vk y Vλ humanos se han clonado y secuenciado (informado en Williams y Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)) y pueden usarse para producir repertorios de cadenas ligeras sintéticas. Los repertorios de genes V sintéticos, basados en un intervalo de veces de VH y VL, y longitudes de L3 y H3, codificarán anticuerpos de
 10 considerable diversidad estructural. Tras la amplificación del gen V que codifica ADN, los segmentos del gen V de la línea germinal pueden reorganizarse in vitro según los procedimientos de Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

[0331] Pueden construirse repertorios de fragmentos de anticuerpos combinando repertorios de genes VH y
 15 VL juntos de varias formas. Cada repertorio puede crearse en diferentes vectores, y los vectores recombinarse *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe y col., Gene, 128: 119-126 (1993), o *in vivo* por infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse y col., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). El enfoque de recombinación *in vivo* explota la naturaleza bicatenaria de fragmentos Fab para superar el límite en el tamaño de biblioteca impuesto por la eficiencia de transformación de *E. coli*. Los repertorios de VH y VL sin
 20 tratamiento previo se clonan por separado, uno en un fagémido y el otro en un vector de fago. Entonces, las dos bibliotecas se combinan por infección en fago de bacterias que contienen fagémido de manera que cada célula contiene una combinación diferente y el tamaño de biblioteca está limitado sólo por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo* de manera que los genes VH y VL se recombinan sobre un único replicón y se co-encapsidan en viriones de fago. Estas enormes
 25 bibliotecas proporcionan grandes números de diversos anticuerpos de buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^8 M).

[0332] Alternativamente, los repertorios pueden clonarse secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), o ensamblarse juntos por PCR
 30 y luego clonarse, por ejemplo, como se describe en Clackson y col., Nature, 352: 624-628 (1991). El ensamblaje por PCR también puede usarse para unir ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador de péptidos flexible para formar repertorios de Fv monocatenarios (scFv). En otra técnica más, "en ensamblaje por PCR en células" se usa para combinar genes VH y VL dentro de linfocitos por PCR y luego clonar repertorios de genes ligados como se describe en Embleton y col., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

[0333] Los anticuerpos producidos por bibliotecas sin tratamiento previo (tanto naturales como sintéticas) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M⁻¹), pero la maduración por afinidad también puede imitarse in vitro construyendo y reselectionando de bibliotecas secundarias como se describe en Winter y col.
 (1994), arriba. Por ejemplo, la mutación puede introducirse al azar in vitro usando polimerasa propensa a error
 40 (informado en Leung y col., Technique, 1: 11-15 (1989)) en el procedimiento de Hawkins y col., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) o en el procedimiento de Gram y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, la maduración por afinidad puede realizarse mutando al azar una o más CDR, por ejemplo, usando PCR con cebadores que llevan secuencia al azar que abarca la CDR de interés, en clones de Fv individuales seleccionados y cribando clones de afinidad superior. El documento WO 9607754 (publicado el 14 de marzo de
 45 1996) describe un procedimiento para inducir mutagénesis en una región determinante de la complementariedad de una cadena ligera de la inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de la cadena ligera. Otro enfoque eficaz es recombinar los dominios de VH o VL seleccionados por expresión en fago con repertorios de variantes del dominio de V que se producen naturalmente obtenidas a partir de donantes no inmunizados y cribar para mayor afinidad en varias rondas de rebarajado de cadenas como se describe en Marks y col., Biotechnol., 10: 779-783
 50 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades de aproximadamente 10^9 M o menos.

[0334] El cribado de las bibliotecas puede llevarse a cabo por diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, STEAP-1 puede usarse para recubrir los pocillos de placas de adsorción, expresarse sobre células
 55 huésped fijadas a placas de adsorción o usarse en la clasificación de células, o conjugarse con biotina para la captura con perlas recubiertas de estreptavidina, o usarse en cualquier otro procedimiento para inmunopurificar bibliotecas de expresión en fago.

[0335] Las muestras de bibliotecas de fagos se ponen en contacto con STEAP-1 inmovilizada en condiciones

adecuadas para la unión de al menos una parte de las partículas de fago al adsorbente. Normalmente, las condiciones, que incluyen pH, fuerza iónica y temperatura, se seleccionan para imitar condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y luego se eluyen con ácido, por ejemplo, como se describe en Barbas y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991), o con álcali, por ejemplo como se describe en Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o por competencia de antígeno por STEAP-1, por ejemplo en un procedimiento similar al procedimiento de competencia por antígeno de Clackson y col., Nature, 352: 624-628 (1991). Los fagos pueden enriquecerse 20-1.000 veces en una única ronda de selección. Además, los fagos enriquecidos pueden cultivarse en cultivo bacteriano y someterse a rondas adicionales de selección.

10 **[0336]** La eficiencia de la selección depende de muchos factores, que incluyen la cinética de disociación durante el lavado, y de si múltiples fragmentos de anticuerpos en un único fago pueden engranarse o no simultáneamente con el antígeno. Los anticuerpos con cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débiles) puede ser retenidos usando lavados cortos, expresión en fago multivalente y alta densidad de recubrimiento de antígeno en fase sólida. La alta densidad no sólo estabiliza el fago mediante interacciones multivalentes, sino que
15 favorece la unión del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) puede promoverse usando lavados largos y expresión en fago monovalente como se describe en Bass y col., Proteínas, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de recubrimiento de antígeno como se describe en Marks y col., Biotechnol., 10: 779-783 (1992).

20 **[0337]** Es posible seleccionar entre anticuerpos de fago de diferentes afinidades, incluso con afinidades que se diferencian ligeramente, para STEAP-1. Sin embargo, la mutación al azar de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, como se realiza en algunas técnicas de maduración por afinidad) es probable que dé lugar a muchos mutantes, la mayoría de los cuales une a antígeno, y algunos con mayor afinidad. Con STEAP-1 limitante, fagos de alta afinidad raros podrían ser más competitivos. Para retener todos los mutantes de mayor afinidad, los fagos
25 pueden incubarse con STEAP-1 biotinilada en exceso, pero con la STEAP-1 biotinilada a una concentración de menor molaridad que la constante de afinidad molar diana para STEAP-1. Los fagos de unión por alta afinidad pueden entonces ser capturados por perlas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina. Tal "captura en equilibrio" permite que los anticuerpos se seleccionen según sus afinidades de unión, con sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con afinidad de tan sólo dos veces superior a un gran exceso de fagos con menor
30 afinidad. Las condiciones usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también pueden manipularse para discriminar basándose en la cinética de disociación.

[0338] Los clones anti-STEAP-1 pueden seleccionarse basándose en la actividad. En ciertas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos anti-STEAP-1 que se unen a células vivas que naturalmente expresan STEAP-1.
35 En una realización, la invención proporciona anticuerpos anti-STEAP-1 que bloquean la unión entre un ligando de STEAP-1 y STEAP-1, pero no bloquean la unión entre un ligando de STEAP-1 y una segunda proteína. Los clones de Fv correspondientes a tales anticuerpos anti-STEAP-1 pueden seleccionarse (1) aislando clones anti-STEAP-1 de una biblioteca de fagos como se ha descrito anteriormente y opcionalmente amplificando la población aislada de clones de fago cultivando la población en un huésped bacteriano adecuado; (2) seleccionando STEAP-1 y una
40 segunda proteína contra la que se desea actividad de bloqueo y de no bloqueo, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones del fago anti-STEAP-1 a STEAP-1 inmovilizada; (4) usando un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconozca determinantes de unión a STEAP-1 que solapan o son compartidos con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) eluyendo los clones que siguen adsorbidos tras la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades de bloqueo/no bloqueo deseadas pueden enriquecerse
45 adicionalmente repitiendo una o más veces los procedimientos de selección descritos en este documento.

[0339] El ADN que codifica anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o clones de Fv de expresión en fago de la invención se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando cebadores de oligonucleótidos diseñados para amplificar específicamente las regiones codificantes de las cadenas pesadas y ligeras de interés del molde de ADN de hibridoma o fago). Una vez aislado, el ADN puede colocarse en
50 vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica
55 anticuerpo incluyen Skerra y col., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993) y Plückthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992).

[0340] El ADN que codifica los clones de Fv de la invención puede combinarse con secuencias de ADN conocidas que codifican regiones constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras (por ejemplo, las secuencias de

ADN apropiadas pueden obtenerse de Kabat y col., arriba) para formar clones que codifican cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa o parcial. Se apreciará que regiones constantes de cualquier isotipo puedan usarse para este fin, que incluyen regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD y IgE, y que tales regiones constantes puedan obtenerse de cualquier especie humana o animal. Un clon de Fv se derivó del ADN del dominio variable de una especie animal (tal como humana) y luego se fusionó con ADN de la región constante de otra especie animal para formar secuencia(s) codificante(s) para cadena pesada y/o cadena ligera de longitud completa "híbrida" se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" como se usa en este documento. En ciertas realizaciones, un clon de Fv derivado de ADN variable humano está fusionado con ADN de la región constante humana para formar secuencia(s) codificante(s) para cadenas pesadas y/o ligeras humanas de longitud completa o parcial.

10 **[0341]** El ADN que codifica anticuerpo anti-STEAP-1 derivado de un hibridoma de la invención también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de las cadenas pesadas y cadenas ligeras humanas en lugar de secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el procedimiento de Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado de hibridoma o clon de Fv puede modificarse adicionalmente uniendo covalentemente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido de no inmunoglobulina. De este modo se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión del clon de Fv o anticuerpos derivados del clon de hibridoma de la invención.

20 3. Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

[0342] Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención, el ácido nucleico que codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para la posterior clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula huésped que vaya a usarse. Generalmente, las células huésped son de origen tanto procariota como eucariota (generalmente de mamífero). Se apreciará que las regiones constantes de cualquier isotipo pueden usarse para este fin, que incluyen regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD y IgE, y que tales regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal.

Generación de anticuerpos usando células huésped procariotas:

Construcción de vectores

35 **[0343]** Las secuencias de polinucleótidos que codifican componentes de polipéptido del anticuerpo de la invención pueden obtenerse usando técnicas convencionales. Las secuencias de polinucleótidos deseadas pueden aislarse y secuenciarse a partir de células productoras de anticuerpos tales como células de hibridoma. Alternativamente, los polinucleótidos pueden sintetizarse usando sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante que puede replicarse y expresar polinucleótidos heterólogos en huéspedes procariotas. Muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la técnica pueden usarse con el fin de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que van a insertarse en el vector y de la célula huésped particular que va a transformarse con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambos) y su compatibilidad con la célula huésped particular en la que reside. Los componentes de vector generalmente incluyen, pero no se limitan a: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

50 **[0344]** En general, los vectores de plásmido que contienen secuencias de replicón y de control que se derivan de especies compatibles con la célula huésped se usan a propósito de estos huéspedes. El vector generalmente lleva un sitio de replicación, además de marcar las secuencias que pueden proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma normalmente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, por tanto, proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos o bacteriófago también puede contener, o modificarse para contener, promotores que pueden ser usados por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Algunos ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos particulares se describen en detalle en Carter y col., patente de EE.UU. Nº 5.648.237.

[0345] Además, los vectores de fago que contienen secuencias de replicón y de control que son compatibles con el microorganismo huésped pueden usarse como vectores transformantes a propósito de estos huéspedes. Por ejemplo, el bacteriófago tal como λ GEM.TM.-11 puede utilizarse en la preparación de un vector recombinante que puede usarse para transformar células huésped susceptibles tales como LE392 de *E. coli*.

[0346] El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón que codifican cada uno los componentes del polipéptido. Un promotor es una secuencia reguladora sin traducir localizada en la dirección 5' con respecto a un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariontes normalmente se clasifican en dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia niveles elevados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en la condición de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

[0347] Son muy conocidos un gran número de promotores reconocidos mediante una variedad de posibles células huésped. El promotor seleccionado puede estar operativamente ligado a ADN de cistrón que codifica la cadena ligera o pesada eliminando el promotor de la fuente ADN por una digestión con enzima de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector de la invención. Tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores heterólogos pueden usarse para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas realizaciones se utilizan promotores heterólogos, ya que generalmente permiten mayor transcripción y mayores rendimientos del gen diana expresado con respecto al promotor de polipéptido diana nativo.

[0348] Promotores adecuados para su uso con huéspedes procariontes incluyen el promotor PhoA, los sistemas de promotores de β -galactosidasa y lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac* o *trc*. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fago conocidos). Sus secuencias de nucleótidos han sido publicadas, permitiendo así que un experto los ligue operablemente a cistrones que codifican las cadenas ligeras y pesadas diana (Siebenlist y col. (1980) Cell 20: 269) usando ligadores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido.

[0349] En un aspecto de la invención, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de la secreción que dirige la translocalización de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN de polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada con el fin de la presente invención debería ser una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para células huésped procariontes que no reconocen y procesan las secuencias señal nativas para los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal está sustituida por una secuencia señal procarionte seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en los conductores de fosfatasa alcalina, penicilinas, *lpp* o enterotoxina estable al calor II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización de la invención, las secuencias señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal de STII o variantes de las mismas.

[0350] En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas según la invención puede producirse en el citoplasma de la célula huésped y, por tanto, no requiere la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistrón. En ese aspecto, las cadenas ligeras y pesadas de la inmunoglobulina se expresan, se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas huésped (por ejemplo, las cepas *trxB* de *E. coli*) proporcionan condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiéndose así el plegamiento y ensamblaje apropiado de subunidades de proteína expresada. Proba y Plückthun Gene, 159: 203 (1995).

[0351] Los anticuerpos de la invención también pueden producirse usando un sistema de expresión en el que la relación cuantitativa de componentes de polipéptido expresados puede modularse con el fin de maximizar el rendimiento de anticuerpos secretados y apropiadamente ensamblados de la invención. Tal modulación se lleva a cabo al menos en parte modulando simultáneamente las fuerzas de traducción para los componentes de polipéptido.

[0352] Una técnica para modular la fuerza de traducción se desvela en Simmons y col., patente de EE.UU. Nº 5.840.523. Se utilizan variantes de la región de iniciación de la traducción (TIR) dentro de un cistrón. Para una TIR dada puede crearse una serie de variantes de secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos con un intervalo de fuerzas de traducción, proporcionándose así un medio conveniente por el cual se ajusta este factor para el nivel de expresión deseado de la cadena específica. Las variantes de TIR pueden generarse por técnicas de mutagénesis convencionales que producen cambios de codones que pueden alterar la secuencia de aminoácidos. En ciertas

realizaciones, los cambios en la secuencia de nucleótidos son silenciosos. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o la separación de las secuencias de Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia señal. Un procedimiento para generar secuencias señal mutantes es la generación de un "banco de codones" al principio de una secuencia codificante que no cambia la secuencia de aminoácidos de la secuencia 5 señal (es decir, los cambios son silenciosos). Esto puede llevarse a cabo cambiando la tercera posición de los nucleótidos de cada codón; adicionalmente, algunos aminoácidos tales como leucina, serina y arginina tienen múltiples primeras y segundas posiciones que pueden añadir complejidad en la preparación del banco. Este procedimiento de mutagénesis se describe en detalle en Yansura y col. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4: 151-158.

10

[0353] En una realización, un conjunto de vectores se genera con un intervalo de fuerzas de TIR para cada cistrón en su interior. Este conjunto limitado proporciona una comparación de niveles de expresión de cada cadena, además del rendimiento de los productos de anticuerpo deseados bajo diversas combinaciones de fuerzas de TIR. Las fuerzas de TIR pueden determinarse cuantificando el nivel de expresión de un gen indicador como se describe 15 en detalle en Simmons y col., patente de EE.UU. N° 5.840.523. Basándose en la comparación de fuerzas de traducción, las TIR individuales deseadas se seleccionan para combinarse en las construcciones de vector de expresión de la invención.

[0354] Células huésped procariotas adecuadas para expresar anticuerpos de la invención incluyen 20 *Archaeobacteria* y *Eubacteria*, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos. Ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), bacilos (por ejemplo, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En una realización se usan células Gram-negativas. En una realización se usan células de *E. coli* como huéspedes para la invención. Ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 25 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pág. 1190-1219; depósito de ATCC N° 27.325) y derivados de las mismas, que incluyen la cepa 33D3 que tiene genotipo W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) *ptr3 lac lq lacL8 $\Delta ompT\Delta(nmpc-fepE)$ degP41 kan^R* (patente de EE.UU. N° 5.639.635). También son adecuadas otras cepas y derivados de las mismas, tales como 294 de *E. coli* (ATCC 31.446), B de *E. coli*, λ 1776 de *E. coli* (ATCC 31.537) y RV308 de *E. coli* (ATCC 31.608). Estos ejemplos son ilustrativos en vez de 30 limitantes. Los procedimientos para construir derivados de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas que tienen genotipos definidos se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Bass y col., Proteins, 8: 309-314 (1990). Es generalmente necesario seleccionar bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, pueden usarse adecuadamente especies de *E. coli*, *Serratia*, o *Salmonella* como huésped cuando se usan plásmidos muy conocidos tales como pBR322, pBR325, 35 pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón. Normalmente, la célula huésped debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, e inhibidores de proteasas adicionales pueden incorporarse deseablemente en el cultivo celular.

Producción de anticuerpos

40

[0355] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión anteriormente descritos y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según convenga para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes que codifican las secuencias deseadas.

45 **[0356]** Transformación significa introducir ADN en el huésped procariota de manera que el ADN sea replicable, tanto como un elemento extracromosómico como por integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se hace usando técnicas convencionales apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio empleando cloruro de calcio es generalmente usado para células bacterianas que contienen barreras sustanciales de las paredes celulares. Otro procedimiento para la transformación emplea 50 polietilenglicol/DMSO. Todavía otra técnica usada es la electroporación.

[0357] Las células procariotas usadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Ejemplos de medios adecuados incluyen caldo Luria (LB) más complementos nutritivos necesarios. En algunas realizaciones, los medios 55 también contiene un agente de selección elegido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina al medio para el crecimiento de células que expresan gen de resistencia a ampicilina.

[0358] También puede incluirse cualquier complemento necesario, además de fuentes de carbono, nitrógeno y

fosfato inorgánico, a concentraciones apropiadas introducido solo o como una mezcla con otro complemento o medio tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioneitol y ditioneitol.

5

[0359] Las células huésped procariotas se cultivan a temperatura adecuadas. En ciertas realizaciones, para el crecimiento de *E. coli*, las temperaturas de crecimiento oscilan de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C; de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C; o aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier pH que oscile de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. En ciertas realizaciones, para *E. coli*, el pH es de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, o aproximadamente 7,0.

10

[0360] Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, la expresión de proteínas se induce en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, los promotores PhoA se usan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células huésped transformadas se cultivan en un medio limitante con fosfato para la inducción. En ciertas realizaciones, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P. (véase, por ejemplo, Simmons y col., *J. Immunol. Methods* (2002), 263: 133-147). Puede usarse una variedad de otros inductores según la construcción de vectores empleada, como se conoce en la técnica.

15

20

[0361] En una realización, los polipéptidos expresados son secretados en y recuperados del periplasma de las células huésped. La recuperación de proteínas normalmente implica romper el microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez se han roto las células, el residuo de células o las células completas pueden eliminarse por centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía en resina de afinidad. Alternativamente, las proteínas pueden transportarse en los medios de cultivo y aislarse en su interior. Las células pueden eliminarse del cultivo y el sobrenadante de cultivo filtrarse y concentrarse para más purificación de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse adicionalmente e identificarse usando procedimientos comúnmente conocidos tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia Western.

25

30

[0362] En un aspecto de la invención, la producción de anticuerpos se realiza en gran cantidad por un proceso de fermentación. Diversos procesos de fermentación de lotes alimentados a gran escala están disponibles para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, y en ciertas realizaciones aproximadamente 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan hélices agitadoras para distribuir el oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferida). Fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a la fermentación en fermentador que no tiene más de aproximadamente 100 litros en capacidad volumétrica y puede oscilar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

35

40

[0363] En un proceso de fermentación, la inducción de expresión de proteínas es normalmente iniciada después de que las células se hayan cultivado bajo condiciones adecuadas a una densidad deseada, por ejemplo, una DO₅₅₀ de aproximadamente 180-220, en cuyo estadio las células están en la fase estacionaria temprana. Puede usarse una variedad de inductores, según la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica y se describe anteriormente. Las células pueden cultivarse durante periodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen normalmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque puede usarse un tiempo de inducción más largo o más corto.

45

[0364] Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención pueden modificarse diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento apropiado de los polipéptidos de anticuerpo secretados, vectores adicionales que expresan en exceso proteínas de chaperona tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y o DsbG) o FkpA (una peptidilproilil cis,trans-isomerasa con actividad de chaperona) pueden usarse para co-transformar las células procariotas huésped. Se ha demostrado que las proteínas de chaperona facilitan el plegamiento apropiado y la solubilidad de proteínas heterólogas producidas en células huésped bacterianas. Chen y col. (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 19601-19605; Georgiou y col., patente de EE.UU. N° 6.083.715; Georgiou y col., patente de EE.UU. N° 6.027.888; Ambosmann y Plückthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 17100-17105; Ramm y Plückthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 17106-17113; Arie y col. (2001) *Mol. Microbiol.* 39: 199-210.

50

55

[0365] Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son

proteolíticamente sensibles), ciertas cepas huésped deficientes para enzimas proteolíticas pueden usarse para la presente invención. Por ejemplo, las cepas de células huésped pueden modificarse para efectuar mutación (mutaciones) genética(s) en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas tales como proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, proteasa I, proteasa Mi, proteasa V, proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas deficientes para proteasas de *E. coli* están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly y col. (1998), arriba; Georgiou y col., patente de EE.UU. N° 5.264.365; Georgiou y col., patente de EE.UU. N° 5.508.192; Hara y col., *Microbial Drug Resistance*, 2: 63-72 (1996).

[0366] En una realización, las cepas de *E. coli* deficientes para enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que expresan en exceso una o más proteínas de chaperona se usan como células huésped en el sistema de expresión de la invención.

Purificación de anticuerpos

[0367] En una realización, la proteína de anticuerpos producida en este documento se purifica adicionalmente para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos y usos adicionales. Pueden emplearse los procedimientos de purificación de proteínas convencionales conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son a modo de ejemplo de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento sobre columnas de inmunoafinidad o intercambio de iones, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

[0368] En un aspecto, la proteína A inmovilizada sobre una fase sólida se usa para la purificación por inmunoafinidad de los productos de anticuerpo de la invención. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con alta afinidad a la región Fc de anticuerpos. Lindmark y col. (1983) *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13. La fase sólida a la que la proteína A se inmoviliza puede ser una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, o una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna está recubierta con un reactivo, tal como glicerol, para posiblemente prevenir la adherencia no específica de contaminantes.

[0369] Como primera etapa de purificación, una preparación derivada del cultivo celular como se ha descrito anteriormente puede aplicarse sobre una proteína A inmovilizada sobre la fase sólida para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la proteína A. Entonces, la fase sólida se lavaría para eliminar contaminantes no específicamente unidos a la fase sólida. Finalmente, el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida por elución.

Generación de anticuerpos usando células huésped eucariotas:

[0370] Un vector para uso en una célula huésped eucariota generalmente incluye uno o más de los siguientes componentes no limitantes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

Componente de secuencia señal

[0371] Un vector para su uso en una célula huésped eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura o polipéptido de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada puede ser una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. En la expresión de células de mamífero están disponibles secuencias señal de mamífero, además de conductores secretorios víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN para una región precursora tal está ligado en el marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

Origen de replicación

[0372] Generalmente, un componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero. Por ejemplo, el origen de SV40 puede usarse normalmente sólo debido a que contiene el promotor temprano.

Componente de gen de selección

[0373] Los vectores de expresión y de clonación pueden contener un gen de selección, también llamado un marcador de selección. Genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, cuando sean relevantes, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos.

5

[0374] Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que son satisfactoriamente transformadas con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármaco y, por tanto, sobrevive a la pauta de selección. Ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

10

[0375] Otro ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para la captación del ácido nucleico de anticuerpo, tal como DHFR, timidina cinasa, metalotioneína-I y -II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

15

[0376] Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células transformadas con el gen de selección de DHFR son primero identificadas cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. En algunas realizaciones, una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR natural es la línea de células de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

20

[0377] Alternativamente, células huésped (particularmente huéspedes naturales que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína de DHFR natural y otro marcador de selección tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador de selección tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE.UU. N° 4.965.199.

25

Componente de promotor

30

[0378] Los vectores de expresión y de clonación normalmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está operativamente ligado a ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo). Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Por ejemplo, prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases en la dirección 5' del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada 70 a 80 bases en la dirección 5' desde el inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas está una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. En ciertas realizaciones, cualquiera o todas de estas secuencias están adecuadamente insertadas en vectores de expresión eucariotas.

40

[0379] La transcripción de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

45

[0380] Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamífero usando el virus del papiloma bovino como vector se desvela en la patente de EE.UU. N° 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE.UU. N° 4.601.978. Véase también Reyes y col., Nature 297: 598-601 (1982) que describe la expresión de ADNs de β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Alternativamente, como promotor puede usarse la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous.

50

Componente de elemento potenciador

[0381] La transcripción de ADN que codifica un anticuerpo de esta invención por eucariotas superiores

aumenta frecuentemente insertando una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras se conocen ahora de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Ejemplos incluyen el potenciador del SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) que describe elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia codificante de polipéptidos del anticuerpo, pero generalmente está localizado en un sitio 5' desde el promotor.

10 Componente de terminación de la transcripción

[0382] Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles de las regiones sin traducir de 5' y, ocasionalmente 3', de ADN eucariotas o víricos o ADNc. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción sin traducir del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/1102 y el vector de expresión desvelado en su interior.

20 Selección y transformación de células huésped

[0383] Células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en este documento incluyen células eucariotas superiores descritas en este documento, que incluyen células huésped de vertebrado. La propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejido) se ha vuelto un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea de riñón de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello de útero humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

[0384] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o de clonación anteriormente descritos para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según convenga para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

40 Cultivo de células huésped

[0385] Las células huésped usadas para producir un anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en una variedad de medios. Medios comercialmente disponibles tales como Ham F10 (Sigma), medio mínimo esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes y col., Anal. Biochem, 102: 255 (1980), las patentes de EE.UU. N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o la patente de EE.UU. Re. 30.985 puede usarse como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento a concentraciones apropiadas que serían conocidas para aquellos expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura y pH y, son aquellas previamente usadas con la célula huésped seleccionada para expresión, y serán evidentes para el experto.

Purificación de anticuerpo

[0386] Si se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, o directamente secretarse en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, el residuo particulado, tanto células huésped como fragmentos lisados, pueden eliminarse, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Si el anticuerpo es secretado en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión pueden primero concentrarse usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa tal como PMSF puede incluirse en cualquiera de las anteriores etapas para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes fortuitos.

10

[0387] La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad una técnica conveniente. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio de Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark y col., J. Immunol. Methods 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss y col., EMBO J. 5: 15671575 (1986)). La matriz a la que está unida el ligando de afinidad puede ser agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten flujos de velocidad más rápida y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden lograrse con agarosa. Si el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que vaya a recuperarse.

[0388] Tras cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes pueden someterse a posterior purificación, por ejemplo, por cromatografía de interacción hidrófoba a bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, realizado preferentemente a bajas concentraciones de sales (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0,25 M).

[0389] En general, diversas metodologías para preparar anticuerpos para su uso en investigación, ensayo y uso clínico están bien establecidas en la materia, de acuerdo con las metodologías anteriormente descritas y/o como se considere apropiado por un experto en la materia para un anticuerpo particular de interés.

35

Inmunoconjugados

[0390] La invención también proporciona inmunoconjugados (denominados indistintamente en lo sucesivo "conjugados de anticuerpo-fármaco" o "ADC") que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-STEAP-1 de la invención conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

[0391] En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-STEAP-1 y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen en este documento (por ejemplo, anteriormente). Toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas también pueden usarse y se describen en este documento.

[0392] En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-STEAP-1 y una o más toxinas de moléculas pequeñas que incluyen, pero no se limitan a, fármacos de moléculas pequeñas tales como una caliqueamicina, maitansinoide, dolastatina, auristatina, tricoteceno y CC1065, y los derivados de estos fármacos que tienen actividad citotóxica. Ejemplos de tales inmunoconjugados se tratan en más detalle más adelante.

1. Inmunoconjugados a modo de ejemplo

55

[0393] Un inmunoconjugado (o "conjugado de anticuerpo-fármaco" ("ADC")) de la invención puede ser de la fórmula I, a continuación, en el que un anticuerpo anti-STEAP-1 está conjugado (es decir, covalentemente unido) con uno o más restos de fármaco (D) mediante un ligador opcional (L).

Ab-(L-D)_p

Fórmula I

[0394] Por consiguiente, el anticuerpo anti-STEAP-1 puede conjugarse con el fármaco tanto directamente como por un ligador. En la fórmula I, p es el número promedio de restos de fármaco por anticuerpo, que puede oscilar, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de fármaco por anticuerpo, y en ciertas realizaciones de 1 a aproximadamente 8 restos de fármaco por anticuerpo.

Ligadores a modo de ejemplo

10 [0395] En este documento se desvelan ligadores y restos de fármaco a modo de ejemplo. Un ligador puede comprender uno o más componentes de ligador. Componentes de ligador a modo de ejemplo incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit" o "vc"), alanina-fenilalanina ("alaphé"), p-aminobenciloxicarbonilo (un "PAB"), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo ("SPP"), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo ("SMCC"), (4-yodo-acetil)aminobenzoato de N-succinimidilo ("SIAB") y etilenoxi -CH₂CH₂O- como una o más unidades de repetición ("EO" o "PEO"). En la técnica se conocen diversos componentes de ligador, algunos de los cuales se describen más adelante.

20 [0396] Un ligador puede ser un "ligador escindible" que facilita la liberación de un fármaco en la célula. Por ejemplo, un ligador lábil ácido (por ejemplo, hidrazona), ligador sensible a proteasa (por ejemplo, sensible a peptidasa), ligador fotolábil, ligador de dimetilo o puede usarse un ligador que contiene disulfuro (Chari y col., Cancer Research 52: 127-131 (1992); patente de EE.UU. N° 5.208.020).

[0397] En una realización, el ligador L de un ADC tiene la fórmula:

25
$$-A_a-W_w-Y_y-$$

en la que:

- A- es una unidad de estirador covalentemente unida a un tiol de la cisteína del anticuerpo (Ab); a es 0 o 1;
30 cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido;
 w es independientemente un número entero que oscila de 0 a 12;
 - Y- es una unidad espaciadora covalentemente unida al resto de fármaco; y
 y es 0, 1 o 2.

35 Unidad de estirador

[0398] La unidad de estirador (-A-), cuando está presente, puede ligar una unidad de anticuerpo a una unidad de aminoácido (-W-). A este respecto, un anticuerpo (Ab) tiene un grupo tiol de la cisteína libre que puede formar un enlace con un grupo funcional electrófilo en una unidad de estirador. Unidades de estirador a modo de ejemplo conjugadas de la fórmula I se representan por las fórmulas II y III en las que Ab-, -W-, -Y-, -D, w y y son como se definen anteriormente y R¹⁷ es un radical divalente seleccionado de (CH₂)_r, carbociclilo C₃-C₈, O-(CH₂)_r, arileno, (CH₂)_r-arileno, -arileno-(CH₂)_r, (CH₂)_r-(carbociclilo C₃-C₈), (carbociclilo C₃-C₈)-(CH₂)_r, heterociclilo C₃-C₈, (CH₂)_r-(heterociclilo C₃-C₈), -(heterociclilo C₃-C₈)-(CH₂)_r, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂)_r, -(CH₂CH₂O)_r, -(CH₂CH₂O)_r-CH₂, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂, -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r, -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂ y -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂)_r en las que R^b es H, alquilo C₁-C₆, fenilo o bencilo; y r es independientemente un número entero que oscila de 1-10.

[0399] Arileno incluye radicales de hidrocarburo aromático divalente de 6-20 átomos de carbono derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno del sistema de anillo aromático. Grupos arileno típicos incluyen, pero no se limitan a, radicales derivados de benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno y bifenilo.

[0400] Grupos heterociclilo incluyen un sistema de anillo en el que uno o más átomos de anillo es un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre. El radical heterociclo comprende 1 a 20 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene 3 a 7 miembros de anillo (2 a 6 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S) o un biciclo que tiene 7 a 10 miembros de anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S), por ejemplo: un sistema de biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6]. Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, Nueva York, 1968), particularmente los Capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 hasta el

presente), en particular los volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82: 5566.

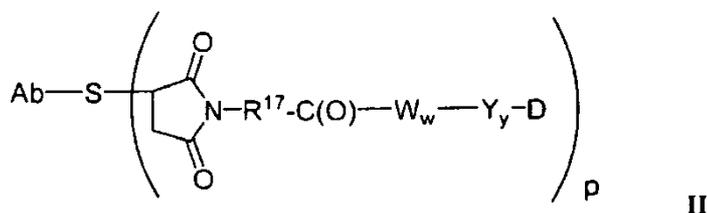
[0401] Ejemplos de heterociclos incluyen a modo de ejemplo y no limitación piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo oxidado con azufre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, bis-tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, bis-tetrahidropiranilo, tetrahydroquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, octahydroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tiantrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizínilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, 4aH-carbazolilo, carbazolilo, β-carbolínilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, bencisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo e isatinoílo.

15

[0402] Grupos carbocíclico incluyen un anillo saturado o insaturado que tiene 3 a 7 átomos de carbono como un monociclo o 7 a 12 átomos de carbono como un biciclo. Carbociclos monocíclicos tienen 3 a 6 átomos de anillo, todavía más normalmente 5 o 6 átomos de anillo. Carbociclos bicíclicos tienen 7 a 12 átomos de anillo, por ejemplo, dispuestos como un sistema de biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], o 9 o 10 átomos de anillo dispuestos como un sistema de biciclo [5,6] o [6,6]. Ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

[0403] Debe entenderse de todas las realizaciones a modo de ejemplo de ADC de fórmula I tales como II-VI, que incluso cuando no se denote expresamente, de 1 a 4 restos de fármaco están ligados a un anticuerpo (p = 1-4), dependiendo del número de residuos de cisteína manipulados.

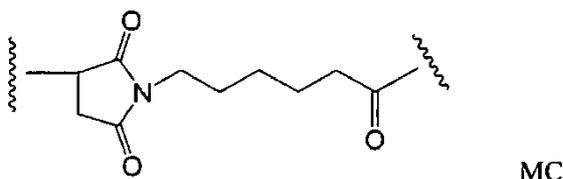
25



30

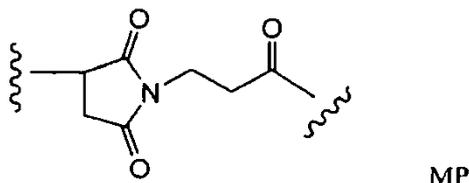


[0404] Una unidad de estirador ilustrativa de fórmula II se deriva de maleimido-caproílo (MC) en la que R¹⁷ es -(CH₂)₅-:



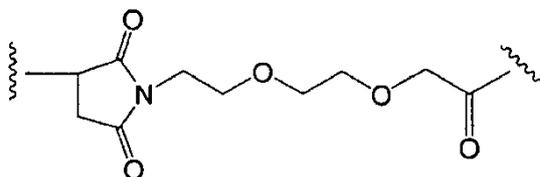
35

[0405] Una unidad de estirador ilustrativa de fórmula II se deriva de maleimido-propanoílo (MP) en la que R¹⁷ es -(CH₂)₂-:

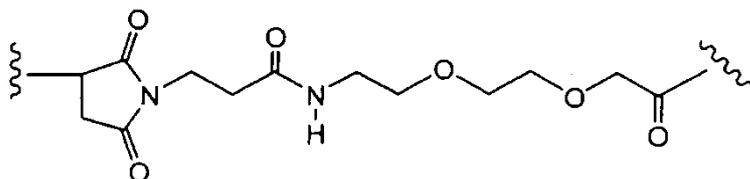


40

[0406] Otra unidad de estirador ilustrativa de fórmula II en la que R¹⁷ es -(CH₂CH₂O)_r-CH₂- y r es 2:

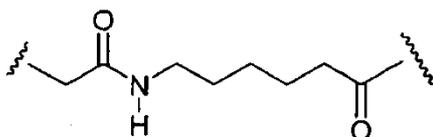


5 **[0407]** Otra unidad de estirador ilustrativa de fórmula II en la que R¹⁷ es -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂- en la que R^b es H y cada r es 2:

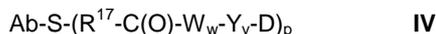


MPEG

10 **[0408]** Una unidad de estirador ilustrativa de fórmula III en la que R¹⁷ es -(CH₂)₅-:

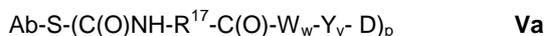


[0409] En otra realización, la unidad de estirador está ligada al anti-anticuerpo manipulado con cisteína por un enlace disulfuro entre el átomo de azufre de la cisteína manipulado del anticuerpo y un átomo de azufre de la unidad de estirador. Una unidad de estirador representativa de esta realización se representa por la fórmula IV en la que R¹⁷, Ab-, -W-, -Y-, -D, w y y son como se definen anteriormente.

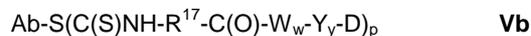


20

[0410] En otra realización más, el grupo reactivo del estirador contiene un grupo funcional reactivo con tiol que puede formar un enlace con un tiol de la cisteína libre de un anticuerpo. Algunos ejemplos de grupos funcionales de reacción con tiol incluyen, pero no se limitan a, maleimida, α-haloacetilo, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres 4-nitrofenílicos, ésteres pentafluorofenílicos, ésteres tetrafluorofenílicos, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Unidades de estirador representativas de esta realización se representan por las fórmulas Va y Vb en las que -R¹⁷-, Ab-, -W-, -Y-, -D, w y y son como se definen anteriormente;



30



[0411] En otra realización, el ligador puede ser un ligador de tipo dendrítico para la unión covalente de más de un resto de fármaco mediante un resto de ligador multifuncional de ramificación con un anticuerpo (Sun y col. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12: 2213-2215; Sun y col. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11: 1761-1768; King (2002) Tetrahedron Letters 43: 1987-1990). Los ligadores dendríticos pueden aumentar la relación molar de fármaco con respecto a anticuerpo, es decir, la carga, que está relacionada con la potencia del ADC. Por tanto, si un anticuerpo manipulado con cisteína lleva sólo un grupo tiol de la cisteína reactivo, una multitud de restos de fármaco pueden unirse mediante un ligador dendrítico.

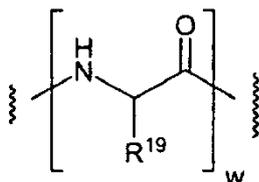
40

Unidad de aminoácido

[0412] El ligador puede comprender residuos de aminoácidos. La unidad de aminoácido (-W_w-), cuando está presente, une el anticuerpo (Ab) con el resto de fármaco (D) del conjugado de anticuerpo manipulado con cisteína-

fármaco (ADC) de la invención.

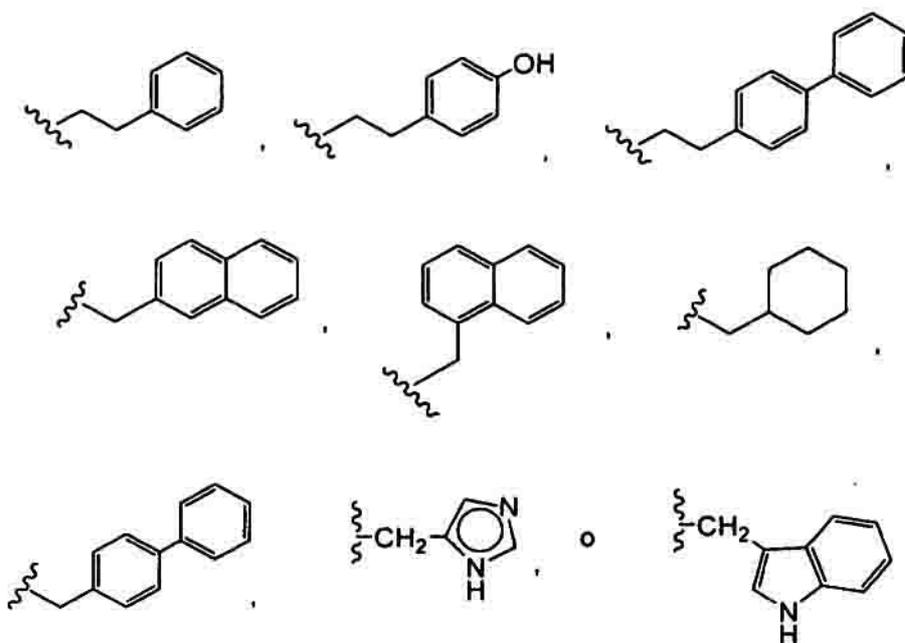
[0413] $-W_w-$ es una unidad de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido. Los residuos de aminoácidos que comprenden la unidad de aminoácido incluyen aquellos que se producen naturalmente, además de aminoácidos menores y análogos de aminoácidos que se producen no naturalmente tales como citrulina. Cada unidad de $-W-$ tiene independientemente la fórmula denotada a continuación en los corchetes y w es un número entero que oscila de 0 a 12:



10

en la que R^{19} es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo,

15



20 **[0414]** Si R^{19} es distinto de hidrógeno, el átomo de carbono al que R^{19} está unido es quiral. Cada átomo de carbono con el que R^{19} está unido está independientemente en la configuración (S) o (R), o es una mezcla racémica. Por tanto, las unidades de aminoácidos pueden ser enantioméricamente puras, racémicas o diaestereoméricas.

25 **[0415]** Las unidades de aminoácido $-W_w-$ a modo de ejemplo incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Dipéptidos a modo de ejemplo incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Tripéptidos a modo de ejemplo incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Residuos de aminoácidos que comprenden un componente de ligador de aminoácido incluyen aquellos que se producen naturalmente, además de aminoácidos menores y análogos de aminoácidos que se producen no naturalmente, tales como citrulina.

30

[0416] La unidad de aminoácido puede escindirse enzimáticamente por una o más enzimas, que incluyen una proteasa asociada a tumor, para liberar el resto de fármaco (-D), que en una realización se protona *in vivo* tras la liberación para proporcionar un fármaco (D). Los componentes de ligador de aminoácido pueden diseñarse y optimizarse en su selectividad para la escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa de plasmina.

Unidad espaciadora

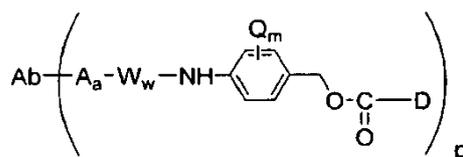
[0417] La unidad espaciadora (-Y_y-), cuando está presente (y = 1 o 2), une una unidad de aminoácido (-W_w-) con el resto de fármaco (D) cuando una unidad de aminoácido está presente (w = 1-12). Alternativamente, la unidad espaciadora une la unidad de estirador con el resto de fármaco cuando la unidad de aminoácido está ausente. La unidad espaciadora también une el resto de fármaco con la unidad de anticuerpo cuanto tanto la unidad de aminoácido como la unidad de estirador están ausentes (w, y = 0). Las unidades espaciadoras son de dos tipos generales: auto-inmolativas y no auto-inmolativas. Una unidad espaciadora no auto-inmolativa es una en la que parte o toda la unidad espaciadora sigue unida al resto de fármaco después de la escisión, particularmente enzimática, de una unidad de aminoácido del conjugado de anticuerpo-fármaco o el resto de fármaco-ligador. Si un ADC que contiene una unidad espaciadora de glicina-glicina o una unidad espaciadora de glicina se somete a escisión enzimática por una proteasa asociada a célula de tumor, una proteasa asociada a célula de cáncer o una proteasa asociada a linfocito, una glicina-glicina-resto de fármaco o una glicina-resto de fármaco se escinde de Ab-A_a-W_w-. En una realización, dentro de la célula diana tiene lugar una reacción de hidrólisis independiente, escindiendo la glicina-resto de fármaco unido y liberando el fármaco.

[0418] En otra realización, -Y_y- es una unidad de p-aminobencilcarbamoilo (PAB) cuya porción de fenileno está sustituida con Q_m en la que Q es -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que oscila de 0-4.

[0419] Realizaciones a modo de ejemplo de una unidad espaciadora no auto-inmolativa (-Y-) son: - Gly-Gly-; - Gly-; -Ala-Phe-; -Val-Cit-.

[0420] En una realización se proporciona un resto de fármaco-ligador o un ADC en el que la unidad espaciadora está ausente (y = 0), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.

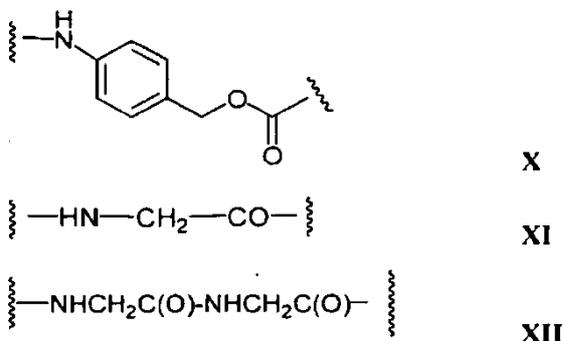
[0421] Alternativamente, un ADC que contiene una unidad espaciadora auto-inmolativa puede liberar -D. En una realización, -Y- es un grupo PAB que está ligado a -W_w- por el átomo de nitrógeno amino del grupo PAB, y conectado directamente con -D por un grupo carbonato, carbamato o éter, en el que el ADC tiene la estructura a modo de ejemplo:



en la que Q es -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que oscila de 0-4; y p oscila de 1 a 4.

[0422] Otros ejemplos de espaciadores auto-inmolativos incluyen, pero no se limitan a, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB tal como 2 derivados de -aminoimidazol-5-metanol (Hay y col. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 2237), análogos de PAB heterocíclicos (documento US 2005/0256030), beta-glucuronido (documento WO 2007/011968) y orto o para-aminobencilacetales. Pueden usarse espaciadores que experimentan ciclación tras la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y sin sustituir (Rodríguez y col. (1995) *Chemistry Biology* 2: 223), sistemas de anillo biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] apropiadamente sustituidos (Storm y col. (1972) *J. Amer. Chem. Soc.* 94: 5815) y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry, y col. (1990) *J. Org. Chem.* 55: 5867). La eliminación de fármacos que contienen amina que están sustituidos en la glicina (Kingsbury y col. (1984) *J. Med. Chem.* 27: 1447) también son ejemplos de espaciador auto-inmolativo útil en ADC.

[0423] Unidades espaciadoras a modo de ejemplo (-Y_y-) se representan por las fórmulas X-XII:

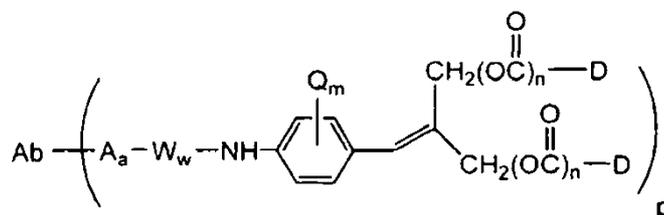


Ligadores dendríticos

5

[0424] En otra realización, el ligador L puede ser un ligador de tipo dendrítico para la unión covalente de más de un resto de fármaco mediante un resto de ligador multifuncional de ramificación con un anticuerpo (Sun y col. (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12: 2213-2215; Sun y col. (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11: 1761-1768). Los ligadores dendríticos pueden aumentar la relación molar de fármaco con respecto a anticuerpo, es decir, la carga, que está relacionada con la potencia del ADC. Por tanto, si un anticuerpo manipulado con cisteína lleva sólo un grupo tiol de la cisteína reactivo, una multitud de restos de fármaco pueden unirse mediante un ligador dendrítico. Realizaciones a modo de ejemplo de ligadores dendríticos ramificados incluyen unidades dendrimeras de 2,6-bis(hidroximetil)-p-cresol y 2,4,6-tris(hidroximetil)-fenol (documento WO 2004/01993; Szalai y col. (2003) *J. Amer. Chem. Soc.* 125: 15688-15689; Shamis y col. (2004) *J. Amer. Chem. Soc.* 126: 1726-1731; Amir y col. (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 4494-4499).

[0425] En una realización, la unidad espaciadora es un bis(hidroximetil)estireno (BHMS) ramificado que puede usarse para incorporar y liberar múltiples fármacos, que tiene la estructura:

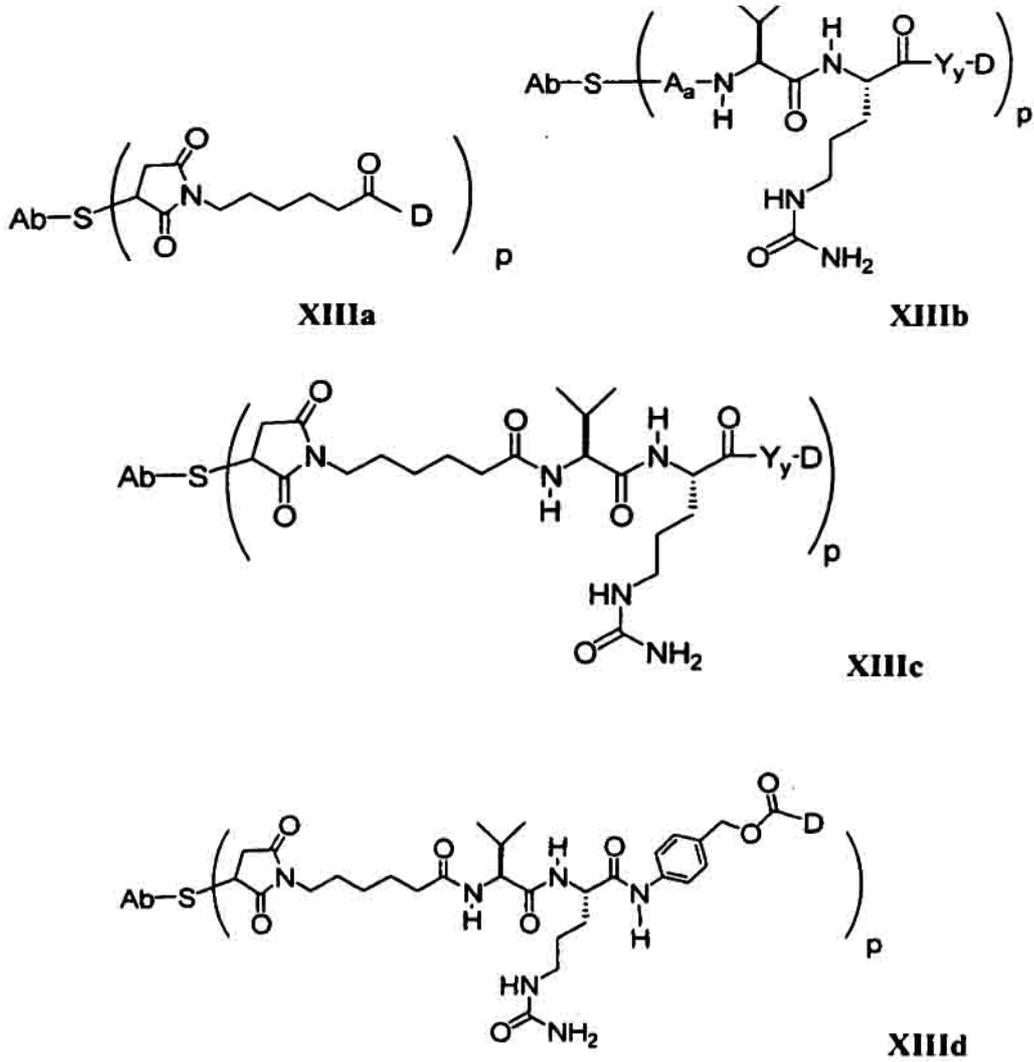


20

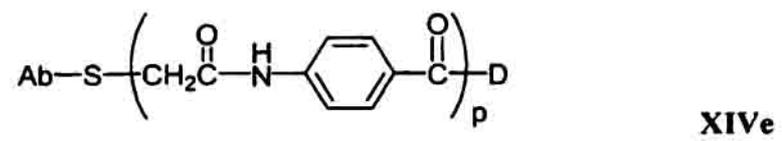
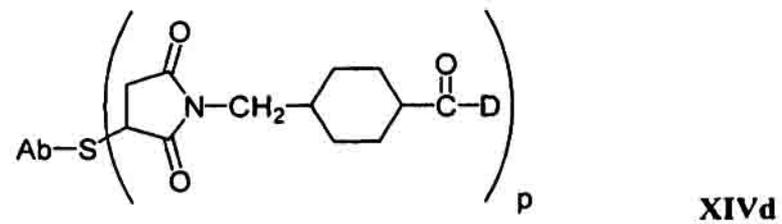
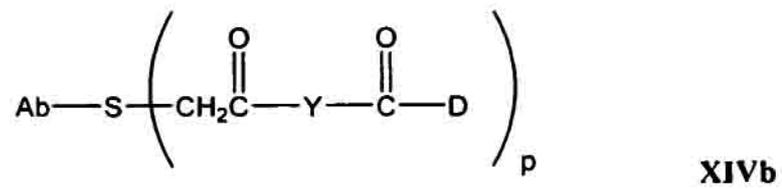
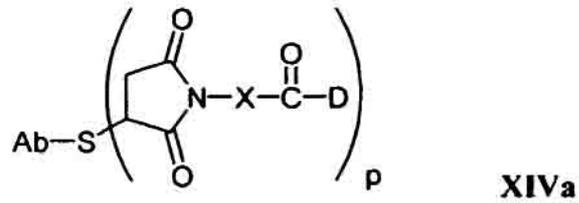
que comprende una unidad dendrímica de 2-(4-aminobenciliden)propano-1,3-diol (documento WO 2004/043493; de Groot y col. (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 4490-4494) en la que Q es -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que oscila de 0-4; n es 0 o 1; y p oscila de 1 a 4.

25

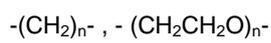
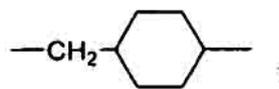
[0426] Realizaciones a modo de ejemplo de la fórmula I de compuestos del conjugado anticuerpo-fármaco incluyen **XIIIa** (MC), **XIIIb** (val-cit), **XIIIc** (MC-val-cit) y **XIIId** (MC-val-cit-PAB):

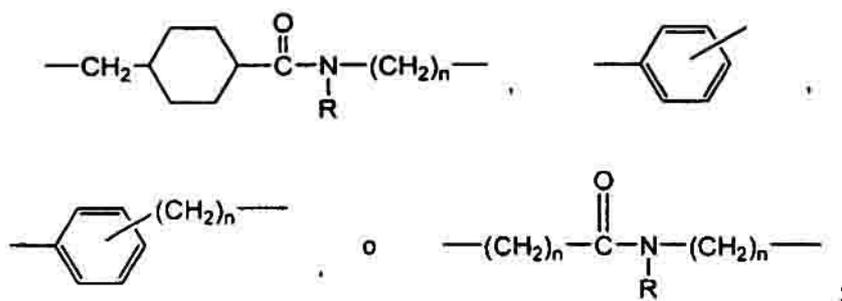


5 [0427] Otras realizaciones a modo de ejemplo de los compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco de fórmula Ia incluyen **XIVa-e**:

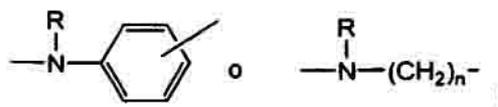


en las que X es:





Y es:



5

y R es independientemente H o alquilo C₁-C₆; y n es 1 a 12.

[0428] En otra realización, un ligador tiene un grupo funcional reactivo que tiene un grupo nucleófilo que es reactivo con un grupo electrófilo presente en un anticuerpo. Grupos electrófilos útiles en un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, grupos carbonilo de aldehído y cetona. El heteroátomo de un grupo nucleófilo de un ligador puede reaccionar con un grupo electrófilo en un anticuerpo y formar un enlace covalente con una unidad de anticuerpo. Grupos nucleófilos útiles en un ligador incluyen, pero no se limitan a, hidrazida, oxima, amino, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida. El grupo electrófilo en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión con un ligador.

[0429] Normalmente, los ligadores de tipo péptido pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptido. Tales enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, según el procedimiento de síntesis en fase líquida (E. Schröder y K. Lübke (1965) "The Peptides", volumen 1, pág. 76-136, Academic Press) que es muy conocido en el campo de la química de los péptidos. Los productos intermedios de ligador pueden ensamblarse con cualquier combinación o secuencia de reacciones que incluyen unidades de espaciador, estirador y de aminoácido. Las unidades de espaciador, estirador y de aminoácido pueden emplear grupos funcionales reactivos que son de naturaleza electrófila, nucleófila o de radicales libres. Grupos funcionales reactivos incluyen, pero no se limitan a, carboxilos, hidroxilos, para-nitrofenilcarbonato, isotiocianato y grupos salientes, tales como O-mesilo, O-tosilo, -Cl, -Br, -I; o maleimida.

[0430] En otra realización, el ligador puede estar sustituido con grupos que modulan la solubilidad o reactividad. Por ejemplo, un sustituyente cargado tal como sulfonato (-SO₃⁻) o amonio puede aumentar la solubilidad en agua del reactivo y facilitar la reacción de acoplamiento del reactivo de ligador con el anticuerpo o el resto de fármaco, o facilitar la reacción de acoplamiento de Ab-L (producto intermedio de anticuerpo-ligador) con D, o D-L (producto intermedio de fármaco-ligador) con Ab, dependiendo de la ruta de síntesis empleada para preparar el ADC.

Restos de fármaco a modo de ejemplo

35

Maitansina y maitansinoides

[0431] En algunas realizaciones, un inmunocombinado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con una o más moléculas maitansinoides. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. N° 3896111). Posteriormente se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de EE.UU. N° 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428;

4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

[0432] Los restos de fármacos maitansinoides son restos de fármaco atractivos en conjugados de anticuerpo-fármaco debido a que son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química o derivatización de productos de fermentación, (ii) favorecen la derivatización con grupos funcionales adecuados para la conjugación mediante ligadores de no disulfuro con anticuerpos, (iii) estables en plasma, y (iv) eficaces contra una variedad de líneas celulares tumorales.

10 [0433] Los compuestos de maitansina adecuados para su uso como restos de fármacos maitansinoides son muy conocidos en la técnica y pueden aislarse de fuentes naturales según procedimientos conocidos o producirse usando técnicas de manipulación genética (véase Yu y col. (2002) PNAS 99: 7968-7973). El maitansinol y análogos de maitansinol también pueden prepararse sintéticamente según procedimientos conocidos.

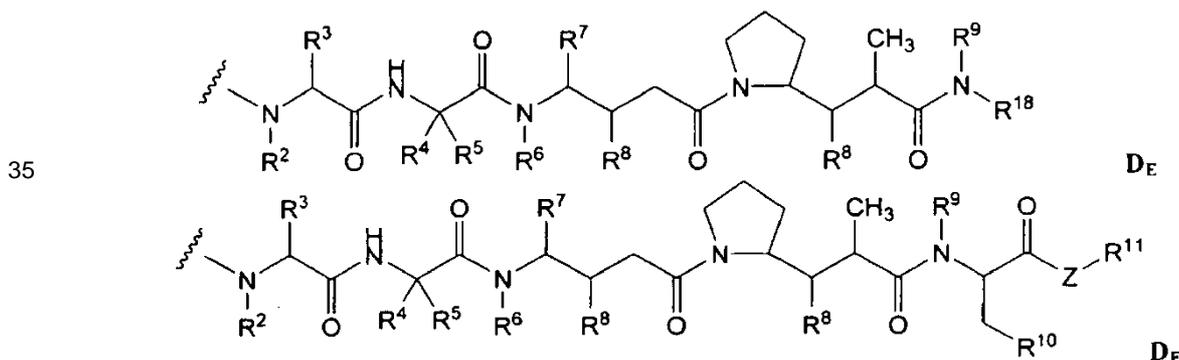
15 [0434] Realizaciones a modo de ejemplo de restos de fármacos maitansinoides incluyen: DM1; DM3; y DM4, como se desvela en este documento.

Auristatinas y dolastatinas

20 [0435] En algunas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con dolastatina o un análogo o derivado peptídico de dolastatina, por ejemplo, una auristatina (patentes de EE.UU. N° 5635483; 5780588). Se ha mostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, hidrólisis de GTP y división nuclear y celular (Woyke y col. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (patente de EE.UU. N° 5663149) y antifúngica (Pettit y col. **25** (1998) Antimicrob. Agents and Chemother. 42: 2961-2965). El resto del fármaco dolastatina o auristatina puede unirse al anticuerpo mediante el extremo N (amino) o el extremo C (carboxilo) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172).

[0436] Realizaciones de auristatina a modo de ejemplo incluyen el extremo N ligado a restos del fármaco **30** monometilauristatina D_E y D_F, desvelado en Senter y col., Proceedings of the American Association for Cancer Research, volumen 45, resumen número 623, presentado el 28 de marzo de 2004.

[0437] Un resto de fármaco peptídico puede seleccionarse de las fórmulas D_E y D_F a continuación:



en las que la línea ondulada de D_E y D_F indica el sitio de unión covalente a un anticuerpo o anticuerpo-componente de ligador, e independientemente en cada localización:

40 R² se selecciona de H y alquilo C₁-C₈;

R³ se selecciona de H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquil C₁-C₈-arilo, alquil C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ y alquil C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);

45 R⁴ se selecciona de H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquil C₁-C₈-arilo, alquil C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ y alquil C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);

R⁵ se selecciona de H y etilo;

o R⁴ y R⁵ forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula $-(CR^aR^b)_n-$ en la que R^a y R^b se seleccionan independientemente de H, alquilo C₁-C₈ y carbociclo C₃-C₈ y n se selecciona de 2, 3, 4, 5 y 6;

5

R⁶ se selecciona de H y alquilo C₁-C₈;

R⁷ se selecciona de H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquil C₁-C₈-arilo, alquil C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ y alquil C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);

10

cada R⁸ se selecciona independientemente de H, OH, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈ y O-(alquilo C₁-C₈);

R⁹ se selecciona de H y alquilo C₁-C₈;

15 R¹⁰ se selecciona de arilo o heterociclo C₃-C₈;

Z es O, S, NH, o NR¹² en la que R¹² es alquilo C₁-C₈;

R¹¹ se selecciona de H, alquilo C₁-C₂₀, arilo, heterociclo C₃-C₈, $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ o $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$;

20

m es un número entero que oscila de 1-1000;

R¹³ es alquilo C₂-C₈;

25 R¹⁴ es H o alquilo C₁-C₈;

cada manifestación de R¹⁵ es independientemente H, COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$ o $-(CH_2)_n-SO_3$ -alquilo C₁-C₈;

30 cada manifestación de R¹⁶ es independientemente H, alquilo C₁-C₈ o $-(CH_2)_n-COOH$;

R¹⁸ se selecciona de $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -arilo, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(heterociclo C₃-C₈) y $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(carbociclo C₃-C₈); y

n es un número entero que oscila de 0 a 6.

35

[0438] En una realización, R³, R⁴ y R⁷ son independientemente isopropilo o sec-butilo y R⁵ es -H o metilo. En una realización a modo de ejemplo, R³ y R⁴ son cada uno isopropilo, R⁵ es -H y R⁷ es sec-butilo.

[0439] En otra realización más, R² y R⁶ son cada uno metilo y R⁹ es -H.

40

[0440] En todavía otra realización, cada manifestación de R⁸ es -OCH₃.

[0441] En una realización a modo de ejemplo, R³ y R⁴ son cada uno isopropilo, R² y R⁶ son cada uno metilo, R⁵ es -H, R⁷ es sec-butilo, cada manifestación de R⁸ es -OCH₃ y R⁹ es -H.

45

[0442] En una realización, Z es -O- o -NH-.

[0443] En una realización, R¹⁰ es arilo.

50 **[0444]** En una realización a modo de ejemplo, R¹⁰ es -fenilo.

[0445] En una realización a modo de ejemplo, si Z es -O-, R¹¹ es -H, metilo o t-butilo.

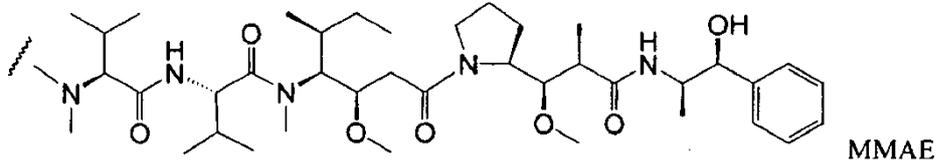
[0446] En una realización, si Z es -NH, R¹¹ es $-CH(R^{15})_2$ en la que R¹⁵ es $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ y R¹⁶ es -alquilo C₁-C₈ o $-(CH_2)_n-COOH$.

55

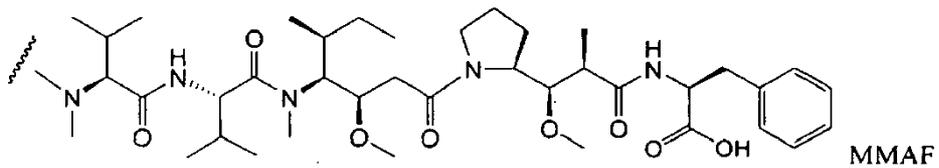
[0447] En otra realización, si Z es -NH, R¹¹ es $-CH(R^{15})_2$ en la que R¹⁵ es $-(CH_2)_n-SO_3H$.

[0448] Una realización de auristatina a modo de ejemplo de fórmula D_E es MMAE, en la que la línea ondulada

indica la unión covalente con un ligador (L) de un conjugado de anticuerpo-fármaco:

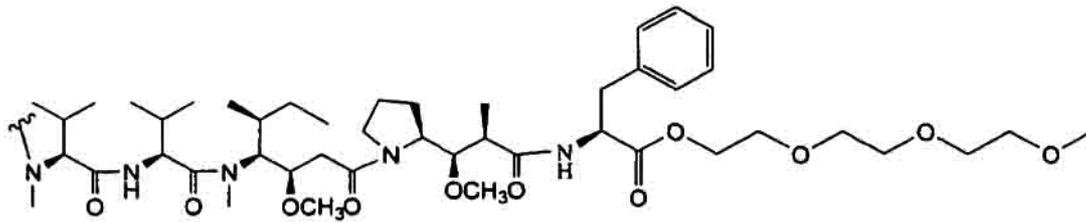


- 5 **[0449]** Una realización de auristatina a modo de ejemplo de fórmula D_F es MMAF, en la que la línea ondulada indica la unión covalente con un ligador (L) de un conjugado de anticuerpo-fármaco (véase el documento US 2005/0238649 y Doronina y col. (2006) Bioconjugate Chem. 17: 114-124):

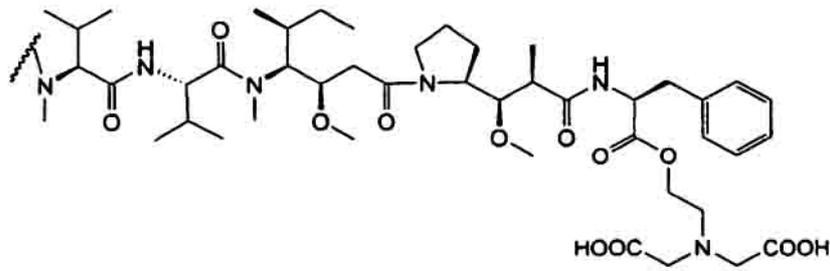
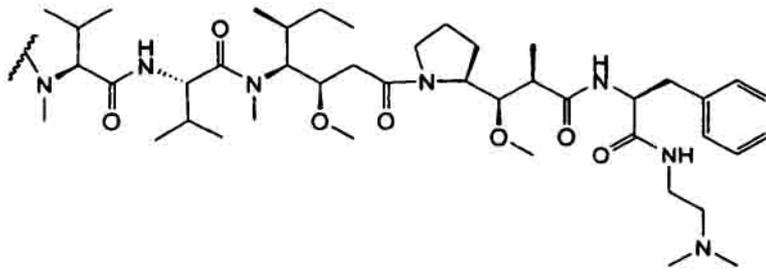
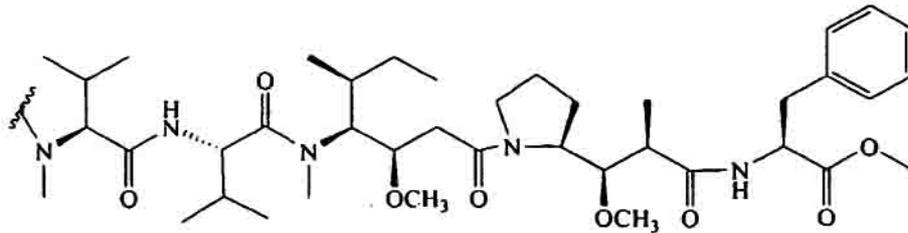
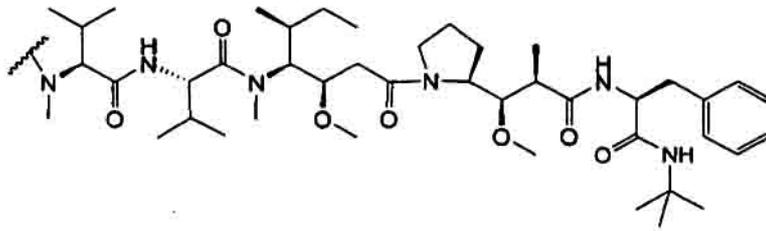
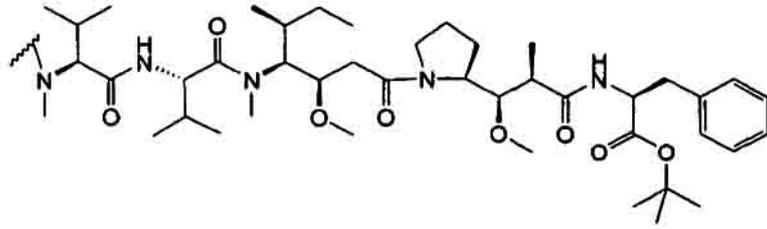


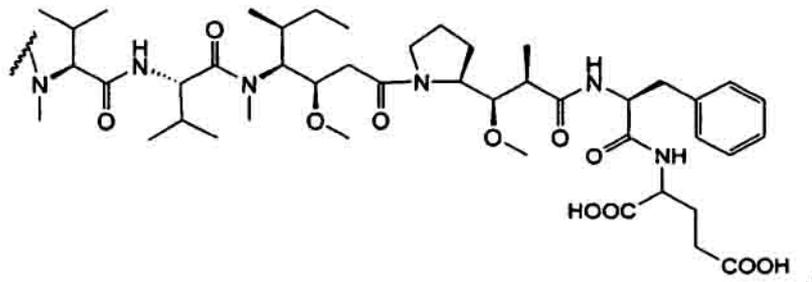
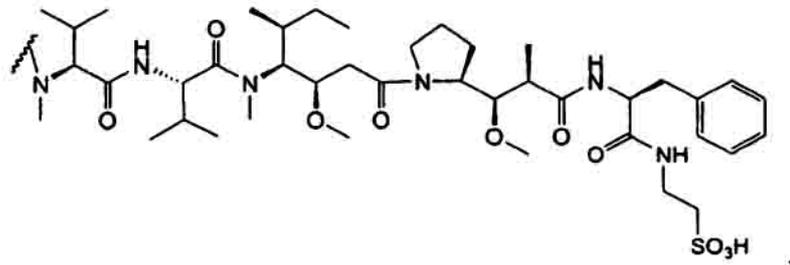
10

- [0450]** Otros restos de fármaco incluyen los siguientes derivados de MMAF, en los que la línea ondulada indica la unión covalente con un ligador (L) de un conjugado de anticuerpo-fármaco:

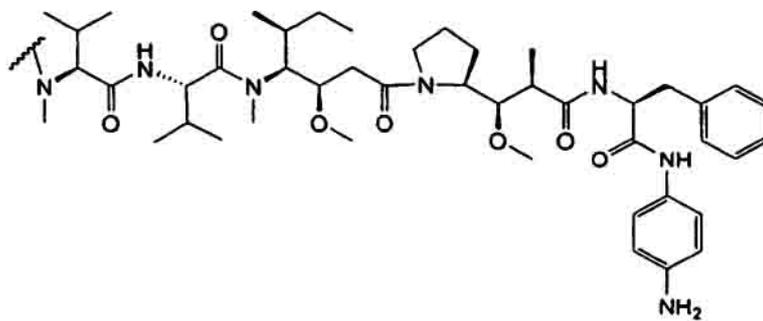


15





y



5

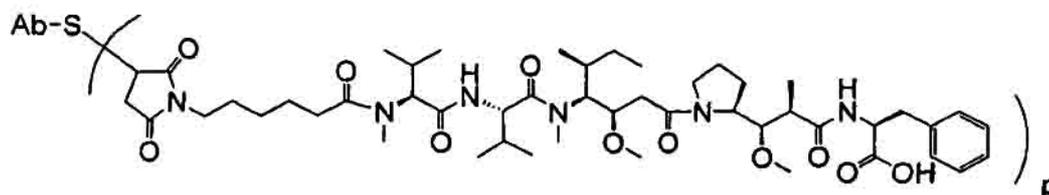
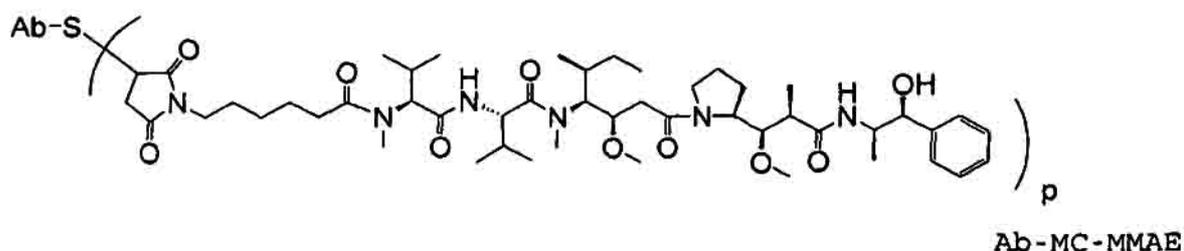
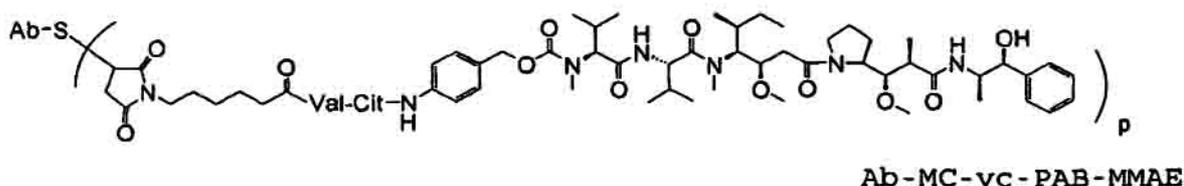
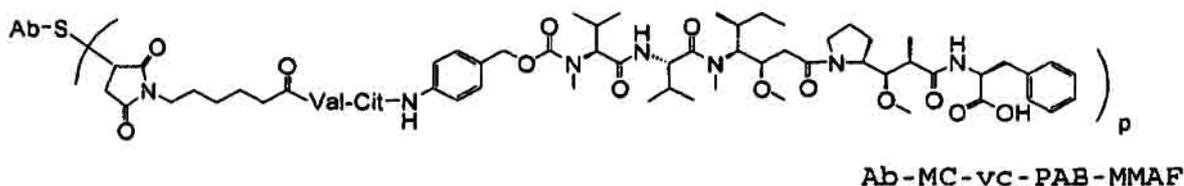
[0451] En un aspecto, grupos hidrófilos que incluyen, pero no se limitan a, ésteres de trietilenglicol (TEG), como se muestra anteriormente, pueden unirse con el resto de fármaco en R¹¹. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, los grupos hidrófilos ayudan en la internalización y no aglomeración del resto de fármaco.

10

[0452] Algunas realizaciones a modo de ejemplo de ADC de fórmula I que comprenden una auristatina/dolastatina o derivado de los mismos se describen en los documentos US 2005-0238649 A1 y Doronina y col. (2006) Bioconjugate Chem. 17: 114-124.

15

Realizaciones a modo de ejemplo de ADC de fórmula I que comprenden MMAE o MMAF y diversos componentes de ligador tienen las siguiente estructuras y abreviaturas (en las que "Ab" es un anticuerpo; p es 1 a aproximadamente 8, "Val-Cit" es un dipéptido de valina-citrulina; y "S" es un átomo de azufre:



5 **[0453]** Algunas realizaciones a modo de ejemplo de ADC de fórmula I que comprenden MMAF y diversos componentes de ligador incluyen adicionalmente Ab-MC-PAB-MMAF y Ab-PAB-MMAF. De forma interesante, se ha mostrado que inmunocombinados que comprenden MMAF unido a un anticuerpo por un ligador que no es proteolíticamente escindible poseen actividad comparable a inmunocombinados que comprenden MMAF unido a un anticuerpo por un ligador que es proteolíticamente escindible. Véase, Doronina y col. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17: 10 114-124. En tales casos se cree que la liberación de fármaco se efectúa por degradación del anticuerpo en la célula. Lo mismo de arriba.

[0454] Normalmente, los restos de fármaco basados en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptido. Tales enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, según el procedimiento de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 15 1, pág. 76-136, 1965, Academic Press) que es muy conocido en el campo de la química de los péptidos. Los restos del fármaco auristatina/dolastatina pueden prepararse según los procedimientos de: documento US 2005-0238649 A1; patente de EE.UU. N° 5635483; patente de EE.UU. N° 5780588; Pettit y col. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111: 5463-5465; Pettit y col. (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13: 243-277; Pettit, G.R., y col. *Synthesis*, 1996, 719-725; 20 Pettit y col. (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5: 859-863; y Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21 (7): 778-784.

[0455] En particular, los restos del fármaco auristatina/dolastatina de fórmula D_F, tal como MMAF y derivados de los mismos, pueden prepararse usando procedimientos descritos en el documento US 2005-0238649 A1 y Doronina y col. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17: 114-124. Los restos del fármaco auristatina/dolastatina de fórmula 25 D_E, tal como MMAE y derivados de los mismos, pueden prepararse usando procedimientos descritos en Doronina y col. (2003) *Nat. Biotech.* 21: 778-784. Los restos de fármaco-ligador MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF y

MC-vc-PAB-MMAE pueden sintetizarse convenientemente por procedimientos rutinarios, por ejemplo, como se describen en Doronina y col. (2003) Nat. Biotech. 21: 778-784, y la publicación de solicitud de patente N° US 2005/0238649 A1, y luego conjugarse con un anticuerpo de interés.

5 Carga de fármaco

[0456] La carga de fármaco se representa por p y es el número promedio de restos de fármaco por anticuerpo en una molécula de fórmula I. La carga de fármaco puede oscilar de 1 a 20 restos de fármaco (D) por anticuerpo. Los ADC de fórmula I incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con un intervalo de restos de fármaco de 1 a 20. El número promedio de restos de fármaco por anticuerpo en preparaciones de ADC de reacciones de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayo de ELISA y HPLC. También puede determinarse la distribución cuantitativa de ADC en términos de p . En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de ADC homogéneo en el que p es un cierto valor de ADC con otras cargas de fármaco puede lograrse por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis.

[0457] Para algunos conjugados de anticuerpo-fármaco, p puede estar limitada por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, si la unión es un tiol de la cisteína, como en las realizaciones a modo de ejemplo anteriores, un anticuerpo puede tener sólo uno o varios grupos tiol de la cisteína, o puede tener sólo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales pueda unirse un ligador. En ciertas realizaciones, carga de fármaco superior, por ejemplo $p > 5$, puede producir agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de permeabilidad celular de ciertos conjugados de anticuerpo-fármaco. En ciertas realizaciones, la carga de fármaco para un ADC de la invención oscila de 1 a aproximadamente 8; de aproximadamente 2 a aproximadamente 6; de aproximadamente 3 a aproximadamente 5; de aproximadamente 3 a aproximadamente 4; de aproximadamente 3,1 a aproximadamente 3,9; de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,8; de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,7; de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,6; de aproximadamente 3,3 a aproximadamente 3,8; o de aproximadamente 3,3 a aproximadamente 3,7. De hecho, se ha mostrado que para ciertos ADC, la relación óptima de restos de fármaco por anticuerpo puede ser inferior a 8, y puede ser aproximadamente 2 a aproximadamente 5. Véase el documento US 2005-0238649 A1.

[0458] En ciertas realizaciones, menos del máximo teórico de restos de fármaco se conjugan con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, residuos de lisina que no reaccionan con el producto intermedio de fármaco-ligador o reactivo de ligador, como se trata más adelante. Generalmente, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de la cisteína libres y reactivos que puedan ligarse a un resto de fármaco; de hecho, la mayoría de los residuos de tiol de la cisteína en anticuerpos existen como puentes disulfuro. En ciertas realizaciones, un anticuerpo puede reducirse con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o tricarbonyltilfosfina (TCEP), bajo condiciones reductoras parciales o totales, para generar grupos tiol de la cisteína reactivos. En ciertas realizaciones, un anticuerpo se somete a condiciones desnaturalizantes para revelar grupos nucleófilos reactivos tales como lisina o cisteína.

[0459] La carga (relación de fármaco/anticuerpo) de un ADC puede controlarse de diferentes formas, por ejemplo: (i) limitando el exceso molar de producto intermedio de fármaco-ligador o reactivo de ligador con respecto a anticuerpo, (ii) limitando el tiempo de reacción de la conjugación o la temperatura, (iii) condiciones reductoras parciales o limitantes para la modificación del tiol de la cisteína, (iv) manipulando por técnicas recombinantes la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de forma que el número y la posición de residuos de cisteína se modifique para controlar el número y/o posición de uniones de ligador-fármaco (tal como tio-Mab o tioFab preparados como se desvela en este documento y en el documento WO2006/034488).

[0460] Debe entenderse que si más de un grupo nucleófilo reacciona con un producto intermedio de fármaco-ligador o reactivo de ligador seguido de resto de fármaco reactivo, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de uno o más restos de fármaco unidos a un anticuerpo. El número promedio de fármacos por anticuerpo puede calcularse a partir de la mezcla por un ensayo de anticuerpos de ELISA dual que es específico para anticuerpo y específico para el fármaco. Las moléculas de ADC individuales pueden identificarse en la mezcla por espectroscopía de masas y separarse por HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrófoba (véase, por ejemplo, Hamblett, K.J., y col. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", resumen N° 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 27-31 de marzo de 2004, Proceedings of the AACR, volumen 45, marzo de 2004; Alley, S.C., y col. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates", resumen N° 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 27-31 de marzo de 2004, Proceedings of the AACR, volumen 45, marzo de 2004). En ciertas realizaciones, un ADC homogéneo con un único valor de carga

puede aislarse de la mezcla de conjugación por electroforesis o cromatografía.

Ciertos procedimientos de preparación de inmunoconjugados

5 **[0461]** Un ADC de fórmula I puede prepararse por varias rutas empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos para aquellos expertos en la materia que incluyen: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo de ligador bivalente, para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo de ligador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo
10 nucleófilo de un anticuerpo. Procedimientos a modo de ejemplo para preparar un ADC de fórmula I por la última ruta se describen en el documento US 20050238649 A1.

[0462] Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amina del extremo N, (ii) grupos amina de la cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv)
15 grupos hidroxilo o amino de azúcar en los que el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de ligador y reactivos de ligador que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros entre cadenas reducibles, es decir, puentes de cisteína.
20 Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos de ligador mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitolo) o tricarboniletilfosfina (TCEP), de forma que el anticuerpo se reduzca completamente o parcialmente. Por tanto, cada puente de cisteína formará teóricamente dos nucleófilos de tiol reactivos. Grupos nucleófilos adicionales pueden introducirse en anticuerpos mediante la modificación de residuos lisina, por ejemplo, haciendo reaccionar residuos lisina con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) produciendo la
25 conversión de una amina en un tiol. Grupos de tiol reactivos pueden introducirse en un anticuerpo introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos de variante que comprenden uno o más residuos de aminoácidos de cisteína no nativos).

[0463] Los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención también puede producirse por reacción entre un
30 grupo electrófilo en un anticuerpo, tal como un grupo carbonilo de aldehído o cetona, con un grupo nucleófilo en un reactivo de ligador o fármaco. Grupos nucleófilos útiles en un reactivo de ligador incluyen, pero no se limitan a, hidrazida, oxima, amino, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida. En una realización, un anticuerpo se modifica para introducir restos electrófilos que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo de ligador o fármaco. En otra realización, los azúcares de anticuerpos glicosilados pueden oxidarse, por
35 ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos de ligador o restos de fármaco. Los grupos de base de Schiff de iminas resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, por reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la porción de hidrato de carbono de un anticuerpo glicosilado con tanto galactosa oxidasa como meta-peryodato de sodio pueden dar grupos carbonilo (aldehído y cetona) en el
40 anticuerpo que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, los anticuerpos que contienen residuos de serina o treonina del extremo N pueden reaccionar con meta-peryodato de sodio, produciendo la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3: 138-146; documento US 5362852). Un aldehído tal puede hacerse reaccionar con un resto de fármaco o nucleófilo ligador.

45 **[0464]** Los grupos nucleófilos en un resto de fármaco incluyen, pero no se limitan a: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida que pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de ligador y reactivos de ligador que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros de ácido; (ii)
50 haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida.

[0465] Los compuestos de la invención contemplan expresamente, pero no se limitan a, ADC preparado con los siguientes reactivos de ligadores cruzados: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-
55 SMPB y SVSB ((4-vinilsulfona)benzoato de succinimidilo) que están comercialmente disponibles (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU.; véanse las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

[0466] Los inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo y un agente citotóxico también pueden

prepararse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis-(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col. (1987) Science, 238: 1098. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

[0467] Alternativamente, una proteína de fusión que comprende un anticuerpo y un agente citotóxico puede prepararse, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. Una molécula de ADN recombinante puede comprender regiones que codifican el anticuerpo y porciones citotóxicas del conjugado tanto adyacentes entre sí como separadas por una región que codifica un péptido ligador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

[0468] En otra realización más, un anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en la elección previa como diana de tumores en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de limpieza y luego administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Preparación de anticuerpos anti-STEAP-1 manipulados con cisteína

[0469] Los procedimientos de diseño, selección y preparación de la invención permiten adicionalmente anticuerpos anti-STEAP-1 manipulados con cisteína que son reactivos con funcionalidad electrófila. Estos procedimientos permiten adicionalmente compuestos de conjugados de anticuerpo tales como compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) con moléculas de fármaco en sitios designados, diseñados, selectivos. Residuos de cisteína reactivos en una superficie de anticuerpo permiten conjugar específicamente un resto de fármaco mediante un grupo reactivo de tiol tal como maleimida o haloacetilo. La reactividad nucleófila de la funcionalidad tiol de un residuo de Cys debido a un grupo maleimida es aproximadamente 1000 veces superior en comparación con cualquier otra funcionalidad de aminoácido en una proteína, tal como el grupo amino de residuos de lisina o el grupo amino del extremo N. La funcionalidad específica para tiol en reactivos de yodoacetilo y maleimida puede reaccionar con grupos amina, pero se requieren pH mayores (>9,0) y tiempos de reacción prolongados (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, Londres). La cantidad de tiol libre en una proteína puede estimarse por el ensayo de Ellman convencional. La inmunoglobulina M es un ejemplo de un pentámero unido por disulfuro, mientras que la inmunoglobulina G es un ejemplo de una proteína con puentes disulfuro internos que unen juntas las subunidades. En proteínas tales como ésta, la reducción de los enlaces disulfuro con un reactivo tal como ditioneitol (DTT) o selenol (Singh y col. (2002) Anal. Biochem. 304: 147-156) se requiere para generar el tiol libre reactivo. Este enfoque puede producir pérdida de la estructura terciaria del anticuerpo y especificidad de unión a antígeno.

[0470] El ensayo Pheselector (ELISA en fago para la selección de tioles reactivos) permite la detección de grupos cisteína reactivos en anticuerpos en un formato de fago por ELISA ayudando así en el diseño de anticuerpos manipulados con cisteína (documento WO 2006/034488). El anticuerpo manipulado con cisteína se recubre sobre superficies de pocillos, seguido de incubación con partículas de fago, adición de anticuerpo secundario marcado con HRP y detección de la absorbancia. Proteínas mutantes expresadas en fago pueden cribarse de un modo rápido, robusto y con alto rendimiento. Pueden producirse bibliotecas de anticuerpos manipulados con cisteína y someterse a selección por unión usando el mismo enfoque para identificar apropiadamente sitios reactivos de la incorporación de Cys libre de bibliotecas de fagos de proteínas al azar de anticuerpos u otras proteínas. Esta técnica incluye hacer reaccionar proteínas mutantes de cisteína expresadas en fago con un reactivo de afinidad o grupo indicador que también es reactivo con tiol.

[0471] El ensayo PHESELECTOR permite cribar grupos tiol reactivos en anticuerpos. La identificación de la variante A121C por este procedimiento es a modo de ejemplo. La molécula Fab entera puede buscarse eficazmente para identificar más variantes de tioFab con grupos tiol reactivos. Un parámetro, la accesibilidad superficial fraccionada, se empleó para identificar y cuantificar la accesibilidad de disolvente a los residuos de aminoácidos en un polipéptido. La accesibilidad superficial puede expresarse como el área superficial (\AA^2) que puede ponerse en

contacto por una molécula de disolvente, por ejemplo, agua. El espacio de agua ocupado es aproximadamente como una esfera de 1,4 Å de radio. El software está libremente disponible o susceptible a licencia (Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, Reino Unido, Fax: (+44) 1925 603825, o por internet: www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html) como juego de CCP4 de programas de cristalografía que emplean algoritmos para calcular la accesibilidad superficial de cada aminoácido de una proteína con coordenadas derivadas de cristalografía de rayos X ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50: 760-763). Dos módulos de software a modo de ejemplo que realizan los cálculos de accesibilidad superficial son "AREAIMOL" y "SURFACE", basados en los algoritmos de B. Lee y F.M. Richards (1971) J. Mol. Biol. 55: 379-400. AREAIMOL define la superficie accesible al disolvente de una proteína en el sitio del centro de una esfera de sonda (que representa una molécula de disolvente) ya que rueda sobre la superficie de van der Waals de la proteína. AREAIMOL calcula el área superficial accesible al disolvente generando puntos de superficie sobre una esfera extensa alrededor de cada átomo (a una distancia del centro del átomo igual a la suma del radio del átomo y la sonda), y eliminando aquellos que se encuentran dentro de esferas equivalentes asociadas a átomos vecinos. AREAIMOL encuentra el área accesible al disolvente de átomos en un archivo de coordenadas PDB y resume el área accesible por residuo, por cadena y para la molécula completa. Áreas accesibles (o diferencias de áreas) para átomos individuales pueden escribirse a un archivo de salida pseudo-PDB. AREAIMOL supone un único radio para cada elemento y sólo reconoce un número limitado de elementos diferentes.

[0472] AREAIMOL y SURFACE informan accesibilidades absolutas, es decir, el número de Angstroms (Å) cuadrados. La accesibilidad superficial fraccionada se calcula por referencia a un estado patrón relevante para un aminoácido dentro de un polipéptido. El estado de referencia es el tripéptido Gly-X-Gly en la que X es el aminoácido de interés, y el estado de referencia debería ser una conformación 'extendida', es decir, como aquellas en cadenas beta. La conformación extendida maximiza la accesibilidad de X. Un área accesible calculada se divide entre el área accesible en un estado de referencia del tripéptido Gly-X-Gly e informa el cociente, que es la accesibilidad fraccionada. El porcentaje de accesibilidad es la accesibilidad fraccionada multiplicada por 100. Otro algoritmo a modo de ejemplo para calcular la accesibilidad superficial se basa en el módulo SOLV del programa xsa (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basilea) que calcula la accesibilidad fraccionada de un residuo de aminoácido con respecto a una esfera de agua basada en las coordenadas de rayos X del polipéptido. La accesibilidad superficial fraccionada para cada aminoácido en un anticuerpo puede calcularse usando información de la estructura cristalina disponible (Eigenbrot y col. (1993) J Mol Biol. 229: 969-995).

[0473] El ADN que codifica los anticuerpos manipulados con cisteína se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven de fuente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) u otras células huésped de mamífero, tal como células de mieloma (documentos US 5807715; US 2005/0048572; US 2004/0229310) que de otro modo no producen la proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes.

[0474] Después del diseño y la selección, los anticuerpos manipulados con cisteína, por ejemplo, tioFab, con los residuos de Cys manipulados, desapareados altamente reactivos, pueden producirse por: (i) expresión en un sistema bacteriano, por ejemplo, *E. coli*, (Skerra y col. (1993) Curr. Opin. Immunol. 5: 256-262; Plückthun (1992) Immunol. Revs. 130: 151-188) o un sistema de cultivo celular de mamífero (documento WO 01/00245), por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO); y (ii) purificación usando técnicas de purificación de proteínas comunes (Lowman y col. (1991) J. Biol. Chem. 266(17): 10982-10988).

[0475] Los grupos de tiol de Cys manipulados reaccionan con reactivos de ligador electrófilos y productos intermedios de fármaco-ligador para formar conjugados de anticuerpo manipulados con cisteína-fármaco y otros anticuerpos marcados manipulados con cisteína. Los residuos de Cys de anticuerpos manipulados con cisteína, y presentes en los anticuerpos parentales, que están emparejados y forman enlaces disulfuro entre cadenas y dentro de las cadenas no tienen ningún grupo tiol reactivo (a menos que se traten con un agente reductor) y no reaccionan con reactivos de ligador electrófilos o productos intermedios de fármaco-ligador. El residuo de Cys recientemente manipulado puede seguir sin emparejar, y puede reaccionar con, es decir, conjugarse con, un reactivo de ligador electrófilo o producto intermedio de fármaco-ligador, tal como un fármaco-maleimida. Productos intermedios de fármaco-ligador a modo de ejemplo incluyen: MC-MMAE, MC-MMAF, MC-vc-PAB-MMAE y MC-vc-PAB-MMAF. Las posiciones de estructura de los residuos de Cys manipulados de las cadenas pesadas y ligeras están numeradas según un sistema de numeración secuencial. Este sistema de numeración secuencial guarda relación con el sistema de numeración de Kabat (Kabat y col., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health

Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) empezando en el extremo N, se diferencia del esquema de numeración de Kabat (fila inferior) por inserciones anotadas por a,b,c. Usando el sistema de numeración de Kabat, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Los sitios variantes de la cadena pesada manipulados con cisteína se identifican por los esquemas de numeración secuencial y de numeración de Kabat.

5 **[0476]** En una realización, el anticuerpo anti-STEAP-1 manipulado con cisteína se prepara mediante un procedimiento que comprende:

10

(a) sustituir uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti-STEAP-1 parental por cisteína; y

(b) determinar la reactividad del tiol del anticuerpo anti-STEAP-1 manipulado con cisteína haciendo reaccionar el anticuerpo manipulado con cisteína con un reactivo reactivo con tiol.

15

[0477] El anticuerpo manipulado con cisteína puede ser más reactivo que el anticuerpo parental con el reactivo reactivo con tiol.

20 **[0478]** Los residuos de aminoácidos de cisteína libre pueden localizarse en las cadenas pesadas o ligeras, o en los dominios constantes o variables. Los fragmentos de anticuerpos, por ejemplo Fab, también pueden estar manipulados con uno o más aminoácidos de cisteína que sustituyen aminoácidos del fragmento de anticuerpo para formar fragmentos de anticuerpos manipulados con cisteína.

25 **[0479]** La divulgación también proporciona un procedimiento de preparación (producción) de un anticuerpo anti-STEAP-1 manipulado con cisteína que comprende:

(a) introducir uno o más aminoácidos de cisteína en un anticuerpo anti-STEAP-1 parental con el fin de generar el anticuerpo anti-STEAP-1 manipulado con cisteína; y

30 (b) determinar la reactividad del tiol del anticuerpo manipulado con cisteína con un reactivo reactivo con tiol;

en el que el anticuerpo manipulado con cisteína es más reactivo que el anticuerpo parental con el reactivo reactivo con tiol.

35 **[0480]** La etapa (a) del procedimiento de preparación de un anticuerpo manipulado con cisteína puede comprender:

(i) mutagenizar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo manipulado con cisteína;

40 (ii) expresar el anticuerpo manipulado con cisteína; y

(iii) aislar y purificar el anticuerpo manipulado con cisteína.

45 **[0481]** La etapa (b) del procedimiento de preparación de un anticuerpo manipulado con cisteína puede comprender expresar el anticuerpo manipulado con cisteína en una partícula vírica seleccionada de un fago o una partícula de fagémido.

50 **[0482]** La etapa (b) del procedimiento de preparación de un anticuerpo manipulado con cisteína también puede comprender:

(i) hacer reaccionar el anticuerpo manipulado con cisteína con un reactivo de afinidad reactivo con tiol para generar un anticuerpo manipulado con cisteína marcado por afinidad; y

55 (ii) medir la unión del anticuerpo manipulado con cisteína marcado por afinidad a un medio de captura.

[0483] También se proporciona un procedimiento de cribado de anticuerpos manipulados con cisteína con aminoácidos de cisteína no emparejados altamente reactivos para la reactividad del tiol que comprende:

(a) introducir uno o más aminoácidos de cisteína en un anticuerpo parental con el fin de generar un anticuerpo

manipulado con cisteína;

(b) hacer reaccionar el anticuerpo manipulado con cisteína con un reactivo de afinidad reactivo con tiol para generar un anticuerpo manipulado con cisteína marcado por afinidad; y

5

(c) medir la unión del anticuerpo manipulado con cisteína marcado por afinidad a un medio de captura; y

(d) determinar la reactividad del tiol del anticuerpo manipulado con cisteína con el reactivo reactivo con tiol.

10 **[0484]** La etapa (a) del procedimiento de cribado de anticuerpos manipulados con cisteína puede comprender:

(i) mutagenizar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo manipulado con cisteína;

(ii) expresar el anticuerpo manipulado con cisteína; y

15

(iii) aislar y purificar el anticuerpo manipulado con cisteína.

[0485] La etapa (b) del procedimiento de cribado de anticuerpos manipulados con cisteína puede comprender expresar el anticuerpo manipulado con cisteína en una partícula vírica seleccionada de un fago o una partícula de fagémido.

20

[0486] La etapa (b) del procedimiento de cribado de anticuerpos manipulados con cisteína también puede comprender:

25 (i) hacer reaccionar el anticuerpo manipulado con cisteína con un reactivo de afinidad reactivo con tiol para generar un anticuerpo manipulado con cisteína marcado por afinidad; y

(ii) medir la unión del anticuerpo manipulado con cisteína marcado por afinidad a un medio de captura.

30 Anticuerpos anti-STEAP-1 manipulados con cisteína marcados

[0487] Los anticuerpos anti-STEAP-1 manipulados con cisteína pueden acoplarse específicamente para sitio y eficientemente con un reactivo reactivo con tiol. El reactivo reactivo con tiol puede ser un reactivo de ligador multifuncional, un reactivo de marca de captura, es decir, por afinidad (por ejemplo, un reactivo de biotina-ligador), una marca de detección (por ejemplo, un reactivo fluoróforo), un reactivo de inmovilización en fase sólida (por ejemplo, SEPHAROSE™, poliestireno o vidrio) o un producto intermedio de fármaco-ligador. Un ejemplo de un reactivo reactivo con tiol es N-etilmaleimida (NEM). En una realización a modo de ejemplo, la reacción de un tioFab con un reactivo de biotina-ligador proporciona un tioFab biotinilado por el que puede detectarse y medirse la presencia y reactividad del residuo de cisteína manipulado. La reacción de un tioFab con un reactivo de ligador multifuncional proporciona un tioFab con un ligador funcionalizado que puede hacerse reaccionar adicionalmente con un reactivo de resto de fármaco u otra marca. La reacción de un tioFab con un producto intermedio de fármaco-ligador proporciona un conjugado de tioFab-fármaco.

35

40

[0488] Los procedimientos a modo de ejemplo aquí descritos pueden aplicarse generalmente a la identificación y producción de anticuerpos, y más generalmente a otras proteínas mediante la aplicación de las etapas de diseño y cribado descritas en este documento.

45

[0489] Un enfoque tal puede aplicarse a la conjugación de otros reactivos reactivos con tiol en los que el grupo reactivo es, por ejemplo, una maleimida, una yodoacetamida, un disulfuro de piridilo u otro componente de conjugación reactivo con tiol (Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3: 2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, Londres; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1: 2; Hermanson, G. En Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pág. 40-55, 643-671). El reactivo reactivo con tiol puede ser un resto de fármaco, un fluoróforo tal como un colorante fluorescente como fluoresceína o rodamina, un agente quelante para una obtención de imágenes o metal radioterapéutico, una marca de peptidilo o no peptidilo o marca de detección, o un agente modificador de la eliminación tal como diversos isómeros de polietilenglicol, un péptido que se une a un tercer componente, u otro hidrato de carbono o agente lipófilo.

50

Usos de anticuerpos anti-STEAP-1 manipulados con cisteína

55

[0490] Los anticuerpos anti-STEAP-1 manipulados con cisteína, y conjugados de los mismos, pueden usarse como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico. La presente divulgación proporciona además procedimientos para prevenir, gestionar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados a un trastorno relacionado con STEAP-1. En particular, la presente divulgación proporciona procedimientos para prevenir, gestionar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados a un trastorno proliferativo de células, tal como cáncer, por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer de ovario y sarcoma de Ewing. La presente divulgación todavía proporciona además procedimientos para diagnosticar un trastorno relacionado con STEAP-1 o predisposición a desarrollar un trastorno tal, además de procedimientos para identificar anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, que preferencialmente unen polipéptidos de STEAP-1 asociados a células.

[0491] También se proporciona el uso de un anticuerpo anti-STEAP-1 manipulado con cisteína para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una afección que es sensible a un trastorno relacionado con STEAP-1.

15

Preparación de conjugados de anticuerpo anti-STEAP-1 manipulado con cisteína-fármaco

[0492] El ADC de fórmula I puede prepararse por varias rutas empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos para aquellos expertos en la materia, que incluyen: (1) reacción de un grupo cisteína de un anticuerpo manipulado con cisteína con un reactivo de ligador, para formar el producto intermedio de anticuerpo-ligador Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de la reacción con un resto de fármaco D activado; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo de ligador, para formar el producto intermedio de fármaco-ligador D-L, mediante un enlace covalente, seguido de la reacción con un grupo cisteína de un anticuerpo manipulado con cisteína. Los procedimientos de conjugación (1) y (2) pueden emplearse con una variedad de anticuerpos manipulados con cisteína, restos de fármaco y ligadores para preparar los conjugados de anticuerpo-fármaco de fórmula I.

[0493] Los grupos tiol de la cisteína del anticuerpo son nucleófilos y pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en los reactivos de ligador y productos intermedios de fármaco-ligador que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida; y (iv) disulfuros, que incluyen disulfuros de piridilo, por intercambio de sulfuro. Grupo nucleófilos en un resto de fármaco incluyen, pero no se limitan a: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida que pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de ligador y reactivos de ligador.

[0494] Los anticuerpos manipulados con cisteína pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos de ligador mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (reactivo de Cleland, ditiotreitól) o TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina; Getz y col. (1999) Anal. Biochem. Vol 273: 73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA), seguido de reoxidación para volver a formar disulfuros entre cadenas y dentro de las cadenas. Por ejemplo, anticuerpos manipulados con cisteína monoclonales (tioMab) de longitud completa expresados en células CHO se reducen con aproximadamente un exceso de 50 veces de TCEP durante 3 h a 37 °C para reducir enlaces disulfuro en aductos de cisteína que pueden formarse entre los residuos de cisteína recientemente introducidos y la cisteína presente en los medios de cultivo. El tioMab reducido se diluye y se carga sobre una columna HiTrap S en acetato sódico 10 mM, pH 5, y se eluye con PBS que contiene cloruro sódico 0,3 M. Los enlaces disulfuro se restablecieron entre residuos de cisteína presentes en el Mab parental con sulfato de cobre (CuSO₄) acuoso diluido (200 nM) a temperatura ambiente, durante la noche. Alternativamente, el ácido deshidroascórbico (DHAA) es un oxidante eficaz para restablecer los grupos disulfuro dentro de las cadenas del anticuerpo manipulado con cisteína después de la escisión reductora de los aductos de cisteína. Pueden usarse otros oxidantes, es decir, agentes de oxidación, y condiciones de oxidación, que se conocen en la técnica. También es eficaz la oxidación con aire ambiente. Esta etapa de reoxidación parcial suave forma eficientemente disulfuros dentro de las cadenas con alta fidelidad y preserva los grupos tiol de los residuos de cisteína recientemente introducidos. Un exceso de aproximadamente 10 veces de producto intermedio de fármaco-ligador, por ejemplo MC-vc-PAB-MMAE, se añadió, se mezcló y se dejó reposar durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente para efectuar la conjugación y formar el conjugado de anticuerpo-fármaco. La mezcla de conjugación se filtró en gel y se cargó y se eluyó mediante una columna HiTrap S para eliminar el producto intermedio de fármaco-ligador en exceso y otras impurezas.

[0495] La Figura 16 muestra el procedimiento general para preparar un anticuerpo manipulado con cisteína expresado a partir de cultivo celular para la conjugación. Si el medio de cultivo celular contiene cisteína, pueden

formarse aductos de disulfuro entre el aminoácido de cisteína recientemente introducido y la cisteína del medio. Estos aductos de cisteína, representados como un círculo en el tioMab a modo de ejemplo (izquierda) en la Figura 12, deben reducirse para generar anticuerpos manipulados con cisteína reactivos para la conjugación. Los aductos de cisteína, supuestamente junto con diversos enlaces disulfuro entre cadenas, se escinden reductoramente para dar una forma reducida del anticuerpo con agentes reductores tales como TCEP. Los enlaces disulfuro entre cadenas entre residuos de cisteína emparejados se vuelven a formar bajo condiciones de oxidación parcial con sulfato de cobre, DHAA o exposición a oxígeno ambiental. Los residuos de cisteína recientemente introducidos, manipulados y desemparejados siguen estando disponibles para la reacción con reactivos de ligador o productos intermedios de fármaco-ligador para formar los conjugados de anticuerpo de la invención. Los tioMab expresados en líneas celulares de mamífero producen aducto de Cys externamente conjugado con una Cys manipulada mediante la formación de enlaces -S-S-. De ahí que los tioMab purificados se traten con los procedimientos de reducción y reoxidación como se describen en el Ejemplo 5 para producir tioMab reactivos. Estos tioMab se usan para conjugarse con fármacos citotóxicos que contienen maleimida, fluoróforos y otras marcas.

15 **[0496]** La Figura 15 muestra realizaciones de conjugados de anticuerpo anti-STEAP-1 manipulados con cisteína-fármaco (ADC) en los que un resto de fármaco auristatina está unido a un grupo cisteína manipulado en: la cadena ligera (LC-ADC); la cadena pesada (HC-ADC); y la región Fc (Fc-ADC).

Formulaciones farmacéuticas

20

Administración de conjugados de anticuerpo-fármaco

[0497] Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención pueden administrarse por cualquier vía apropiada para la afección que va a tratarse. El ADC se administrará normalmente parenteralmente, es decir, infusión, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural.

[0498] Para tratar cánceres de, por ejemplo, próstata, pulmón y/o colon, en una realización, el conjugado de anticuerpo-fármaco se administra por infusión intravenosa. La dosificación administrada por infusión está en el intervalo de aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $10.000 \mu\text{g}/\text{m}^2$ por dosis, generalmente una dosis por semana durante un total de una, dos, tres o cuatro dosis. Alternativamente, el intervalo de dosificación es de aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $1000 \mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $800 \mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $600 \mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $400 \mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $500 \mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $300 \mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$, y aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$. La dosis puede administrarse una vez por día, una vez por semana, múltiples veces por semana, pero menos de una vez por día, múltiples veces por mes pero menos de una vez por día, múltiples veces por mes pero menos de una vez por semana, una vez por mes o intermitentemente para calmar o aliviar los síntomas de la enfermedad. La administración puede continuar en cualquiera de los intervalos desvelados hasta la remisión del tumor o síntomas del linfoma, leucemia que está tratándose. La administración puede continuar después de lograrse la remisión o alivio de síntomas si tal remisión o alivio se prolonga por tal administración continuada.

[0499] La divulgación también proporciona un procedimiento para tratar un cáncer de próstata, pulmón y/o colon, y/o una metástasis de tal cáncer, que comprende administrar a un paciente que padece un cáncer de próstata, pulmón o colon una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo 120v.24 humanizado de una cualquiera de las realizaciones precedentes, anticuerpo que no está conjugado con una molécula citotóxica o una molécula detectable. El anticuerpo se administrará normalmente en un intervalo de dosificación de aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $1000 \text{mg}/\text{m}^2$.

50 **[0500]** La divulgación también proporciona un procedimiento para tratar un cáncer de próstata, pulmón y/o colon, y/o una metástasis de tal cáncer, que comprende administrar a un paciente que padece un cáncer de próstata, pulmón o colon una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo 120v.24 humanizado de una cualquiera de las realizaciones precedentes, anticuerpo que está conjugado con una molécula citotóxica o una molécula detectable. El anticuerpo se administrará normalmente en un intervalo de dosificación de aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $1000 \text{mg}/\text{m}^2$.

[0501] En un aspecto, la invención proporciona además formulaciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo anti-STEAP-1 de la invención y/o al menos un inmunoconjugado del mismo y/o al menos un conjugado de anticuerpo anti-STEAP-1-fármaco de la invención. En algunas realizaciones, una formulación

farmacéutica comprende 1) un anticuerpo anti-STEAP-1 y/o un conjugado de anticuerpo anti-STEAP-1-fármaco y/o un inmunocombinado de los mismos, y 2) un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende 1) un anticuerpo anti-STEAP-1 y/o un inmunocombinado del mismo y opcionalmente, 2) al menos un agente terapéutico adicional.

5

[0502] Las formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o inmunocombinado de la invención o el combinado de anticuerpo-fármaco de la invención se preparan para almacenamiento mezclando el anticuerpo o combinado de anticuerpo-fármaco que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de disoluciones acuosas o liofilizadas u otras formulaciones secas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio); cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones farmacéuticas que van a usarse para administración *in vivo* son generalmente estériles. Esto se realiza fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0503] Los principios activos también pueden estar atrapados en una microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsula de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

[0504] Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo o inmunocombinado de la invención, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsula. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ -etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Si los anticuerpos o inmunocombinados encapsulados siguen en el cuerpo durante un tiempo largo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, produciendo una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares mediante intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse modificando residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de disoluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz de polímero específicas.

50 Tratamientos con combinados de anticuerpo-fármaco

[0505] Se contempla que los combinados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención puedan usarse para tratar diversas enfermedades o trastornos, por ejemplo, caracterizados por la expresión en exceso de un antígeno de tumor. Afecciones o trastornos hiperproliferativos a modo de ejemplo incluyen tumores benignos o malignos; leucemia y tumores malignos linfoides. Otros incluyen trastornos neuronales, de la glía, astrocíticos, hipotalámicos, glandulares, macrofágicos, epiteliales, del estroma, blastocélulas; inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, que incluyen autoinmunitarios. Todavía otros incluyen cánceres de próstata, pulmón y colon.

[0506] Los compuestos de ADC que se identifican en los modelos animales y ensayos basados en células

pueden probarse adicionalmente en primates superiores que tienen un tumor y ensayos clínicos humanos. Los ensayos clínicos humanos pueden diseñarse para probar la eficacia del anticuerpo monoclonal anti-STEAP-1 o inmunoconjugado de la invención en pacientes que experimentan un trastorno proliferativo de células de la próstata, pulmón o colon que incluyen, sin limitación, cánceres de próstata, pulmón y colon y metástasis de tales cánceres. El ensayo clínico puede diseñarse para evaluar la eficacia de un ADC en combinaciones con pautas terapéuticas conocidas tales como radiación y/o quimioterapia que implican agentes quimioterapéuticos y/o citotóxicos conocidos.

[0507] El cáncer puede comprender células que expresan STEAP-1, de forma que un ADC de la presente invención puede unirse a las células cancerosas. Para determinar la expresión de STEAP-1 en el cáncer están disponibles diversos ensayos de diagnóstico/pronóstico. En una realización, la expresión en exceso de STEAP-1 puede analizarse por IHC. Las secciones de tejido incorporadas en parafina de una biopsia de tumor pueden someterse al ensayo de IHC y examinarse los criterios de la intensidad de tinción de la proteína STEAP-1 con respecto al grado de tinción y en qué proporción de las células tumorales.

[0508] Para la prevención o el tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de un ADC dependerá del tipo de enfermedad que vaya a tratarse, como se define anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si la molécula se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico adjunto. La molécula se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1-20 mg/kg) de molécula es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, tanto si es, por ejemplo, por una o por más administraciones separadas como por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Una dosificación a modo de ejemplo de ADC que va a administrarse a un paciente está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso del paciente.

[0509] Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento es sostenido hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una pauta de dosificación a modo de ejemplo comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg de un anticuerpo anti-STEAP-1. Pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Terapia de combinación

[0510] Un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención puede combinarse en una formulación de combinación farmacéutica, o pauta de dosificación, como terapia de combinación, con al menos un compuesto adicional que tiene propiedades anticancerígenas. El al menos un compuesto adicional de la formulación de combinación farmacéutica o pauta de dosificación tiene preferentemente actividades complementarias a las del ADC de la combinación de forma que no se afectan adversamente entre sí.

[0511] El al menos un compuesto adicional puede ser un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal y/o cardioprotector. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto. Una composición farmacéutica que contiene un ADC de la invención también puede tener una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico tal como un inhibidor de la formación de tubulina, un inhibidor de topoisomerasa o un aglutinante de ADN.

[0512] En un aspecto, el primer compuesto es un ADC de anti-STEAP-1 de la invención y el al menos un compuesto adicional es un anticuerpo terapéutico distinto de un anti-STEAP-1 (anticuerpo desnudo o un ADC). En una realización, el al menos un compuesto adicional es un anticuerpo anti-PSCA. En una realización, el al menos un compuesto adicional es un anticuerpo anti-HER2, trastuzumab (por ejemplo, Herceptin®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA). En una realización, el al menos un compuesto adicional es un anticuerpo anti-HER2, pertuzumab (Omnitarg™, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, véase el documento US6949245). En una realización, el al menos un compuesto adicional es un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, Avastin®, Genentech, Inc.). En cada caso, el al menos un compuesto es tanto un anticuerpo desnudo como un ADC. En una realización, el al menos un compuesto adicional es un anticuerpo (tanto un anticuerpo desnudo como un ADC) y el anticuerpo adicional es un segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto anticuerpo o más, de forma que una combinación de tal segundo, tercer, cuarto, quinto, sexto o más anticuerpos (tanto desnudo como un ADC) es eficaz en el tratamiento

de una enfermedad proliferativa de células en un tejido que expresa STEAP-1.

[0513] Pueden combinarse otras pautas terapéuticas con la administración de un agente anticancerígeno identificado según la presente invención que incluye, sin limitación, radioterapia y/o trasplantes de médula ósea y sangre periférica, y/o un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento. En una de tales realizaciones, un agente quimioterapéutico es un agente o una combinación de agentes tales como, por ejemplo, ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina, adriamicina, doxorubicina, vincristina (Oncovin™), prednisolona, CHOP, CVP o COP, o agentes inmunoterapéuticos tales como anti-PSCA, anti-HER2 (por ejemplo, Herceptin®, Omnitarg™) o anti-VEGF (por ejemplo, Avastin®). La terapia de combinación puede administrarse como una pauta simultánea o secuencial. Si se administra secuencialmente, la combinación puede administrarse en dos o más administraciones. La administración combinada incluye coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en el que preferentemente hay un periodo de tiempo mientras que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

[0514] En una realización, el tratamiento con un ADC implica la administración combinada de un agente anticancerígeno identificado en este documento y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, que incluyen coadministración de mezclas de diferentes agentes quimioterapéuticos. Agentes quimioterapéuticos incluyen taxanos (tales como paclitaxel y docetaxel) y/o antibióticos de antraciclina. La preparación y los programas de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse según instrucciones del fabricante o como se determina empíricamente por el médico experto. La preparación y programas de dosificación para tal quimioterapia también se describen en "Chemotherapy Service", (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

[0515] Dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes anteriormente coadministrados son aquellas presentemente usadas y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente recientemente identificado y otros agentes o tratamientos quimioterapéuticos.

[0516] La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y demuestra ser "sinérgica", es decir, el efecto conseguido cuando los principios activos se usan juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan del uso de los compuestos por separado. Puede obtenerse un efecto sinérgico cuando los principios activos: (1) se co-formulan y se administran simultáneamente en una formulación de dosificación unitaria combinada; (2) administración por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por alguna otra pauta. Si se administra en terapia de alternancia, un efecto sinérgico puede obtenerse cuando los compuestos se administran secuencialmente, por ejemplo, por diferentes inyecciones en jeringuillas separadas. En general, durante la terapia de alternancia, una dosificación eficaz de cada principio activo se administra secuencialmente, es decir, seriadamente, mientras que en terapia de combinación, las dosificaciones eficaces de dos o más principios activos se administran juntas.

40 Metabolitos de los conjugados de anticuerpo-fármaco

[0517] Dentro del alcance de esta divulgación también se encuentran los productos metabólicos *in vivo* de los compuestos de ADC descritos en este documento, hasta el punto que tales productos sean novedosos y no obvios con respecto a la técnica anterior. Tales productos pueden resultar, por ejemplo, de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, esterificación o escisión enzimática del compuesto administrado. Por consiguiente, la invención incluye compuestos novedosos y no obvios producidos mediante un procedimiento que comprende poner en contacto un compuesto de la presente invención con un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para dar un producto metabólico del mismo.

[0518] Los productos de metabolitos normalmente se identifican preparando un ADC radiomarcado (por ejemplo, ¹⁴C o ³H), administrándolo parenteralmente en una dosis detectable (por ejemplo, superior a aproximadamente 0,5 mg/kg) a un animal tal como rata, ratón, cobaya, mono, o al hombre, dejando tiempo suficiente para que se produzca el metabolismo (normalmente aproximadamente 30 segundos a 30 horas) y aislando sus productos de conversión de la orina, sangre u otras muestras biológicas. Estos productos se aíslan fácilmente ya que están marcados (otros se aíslan por el uso de anticuerpos que pueden unirse a epítopes que sobreviven en el metabolito). Las estructuras de metabolito se determinan de forma convencional, por ejemplo, por análisis de EM, EM/CL o RMN. En general, el análisis de metabolitos se hace de la misma forma que los estudios de metabolismo de fármacos convencionales muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Los productos de conversión, mientras que no se encuentren de otro modo *in vivo*, son útiles en ensayos de diagnóstico para la dosificación

terapéutica de los compuestos de ADC de la invención.

Otros procedimientos de uso de anticuerpos anti-STEAP-1 e inmunoconjugados *Procedimientos de diagnóstico y procedimientos de detección*

5

[0519] Los anticuerpos anti-STEAP-1 e inmunoconjugados de la invención son útiles para detectar la presencia de STEAP-1 en una muestra biológica. El término “detectar” como se usa en este documento engloba detección cuantitativa o cualitativa. Una muestra biológica puede comprender una célula o tejido. En ciertas realizaciones, tales tejidos incluyen tejidos normales y/o cancerosos que expresan STEAP-1 a niveles superiores con respecto a otros tejidos, por ejemplo, próstata, pulmón y colon.

10

[0520] La divulgación proporciona un procedimiento de detección de la presencia de STEAP-1 en una muestra biológica. El procedimiento puede comprender poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-STEAP-1 en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-STEAP-1 a STEAP-1 y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-STEAP-1 y STEAP-1.

15

[0521] La divulgación proporciona un procedimiento de diagnóstico de un trastorno asociado al aumento de la expresión de STEAP-1. El procedimiento puede comprender poner en contacto una célula de prueba con un anticuerpo anti-STEAP-1; determinar el nivel de expresión (tanto cuantitativamente como cualitativamente) de STEAP-1 por la célula de prueba detectando la unión del anticuerpo anti-STEAP-1 a STEAP-1; y comparar el nivel de expresión de STEAP-1 por la célula de prueba con el nivel de expresión de STEAP-1 por una célula de control (por ejemplo, una célula normal del mismo origen de tejido que la célula de prueba o una célula que expresa STEAP-1 a niveles comparables a una célula normal tal), en el que un mayor nivel de expresión de STEAP-1 por la célula de prueba con respecto a la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado al aumento de la expresión de STEAP-1. La célula de prueba puede obtenerse de un individuo del que se sospecha que tiene un trastorno asociado al aumento de la expresión de STEAP-1.

20

25

El trastorno puede ser un trastorno proliferativo de células, tal como un cáncer o un tumor.

30

[0522] Trastornos proliferativos de células a modo de ejemplo que pueden diagnosticarse usando un anticuerpo de la invención incluyen cánceres de próstata, pulmón y colon o metástasis de tales cánceres.

35

[0523] Un procedimiento de diagnóstico o detección, tal como aquellos descritos anteriormente, puede comprender detectar la unión de un anticuerpo anti-STEAP-1 a STEAP-1 expresada sobre la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida de una célula que expresa STEAP-1 sobre su superficie. El procedimiento puede comprender poner en contacto una célula con un anticuerpo anti-STEAP-1 en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-STEAP-1 a STEAP-1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-STEAP-1 y STEAP-1 sobre la superficie celular. Un ensayo a modo de ejemplo para detectar la unión de un anticuerpo anti-STEAP-1 a STEAP-1 expresada sobre la superficie de una célula es un ensayo de “FACS”.

40

[0524] Pueden usarse ciertos otros procedimientos para detectar la unión de anticuerpos anti-STEAP-1 a STEAP-1. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión a antígeno que son muy conocidos en la técnica, tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos de tipo “sándwich”, ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A e inmunohistoquímica (IHC).

45

[0525] En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-STEAP-1 se marcan. Las marcas incluyen, pero no se limitan a, marcas o restos que se detectan directamente (tal como marcas fluorescentes, cromofóricas, densas en electrones, quimioluminiscentes y radiactivas), además de restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, mediante una reacción enzimática o interacción molecular. Marcas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de EE.UU. N° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasas, galactosa oxidasas y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasas, acopladas a una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, espín o marcas, marcas de bacteriófago o radicales libres estables.

50

55

[0526] En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-STEAP-1 se inmovilizan sobre una matriz insoluble. La inmovilización implica separar el anticuerpo anti-STEAP-1 de cualquier STEAP-1 que permanezca libre en disolución. Esto se lleva a cabo convencionalmente tanto insolubilizando el anticuerpo anti-STEAP-1 antes del procedimiento de ensayo por adsorción a una matriz insoluble en agua o superficie (Bennich y col., documento U.S. 3.720.760), o por acoplamiento covalente (por ejemplo, usando reticulación con glutaraldehído) como insolubilizando el anticuerpo anti-STEAP-1 después de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-STEAP-1 y STEAP-1, por ejemplo, por inmunoprecipitación.

[0527] Cualquiera de las realizaciones de diagnóstico o detección anteriores puede llevarse a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-STEAP-1.

Procedimientos terapéuticos

[0528] Un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención puede usarse en, por ejemplo, procedimientos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. La divulgación proporciona procedimientos para inhibir el crecimiento o proliferación celular, tanto *in vivo* como *in vitro*, comprendiendo el procedimiento exponer una célula a un anticuerpo anti-STEAP-1 o inmunoconjugado del mismo en condiciones permisivas para la unión del inmunoconjugado a STEAP-1. "Inhibir el crecimiento o proliferación celular" significa disminuir el crecimiento o la proliferación de una célula al menos el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 % o el 100 %, e incluye inducir muerte celular. La célula puede ser una célula tumoral. La célula puede ser una célula de próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario, o célula de sarcoma de Ewing. La célula puede ser un xenoinjerto, por ejemplo, como se ejemplifica en este documento.

[0529] En un aspecto, un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención se usa para tratar o prevenir un trastorno proliferativo de células de la próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario o células de sarcoma de Ewing. En ciertas realizaciones, el trastorno proliferativo de células está asociado al aumento de la expresión y/o actividad de STEAP-1. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el trastorno proliferativo de células de la próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario o de células de sarcoma de Ewing está asociado al aumento de la expresión de STEAP-1 sobre la superficie de una célula de próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario o célula de sarcoma de Ewing. En ciertas realizaciones, el trastorno proliferativo de células de la próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario o de células de sarcoma de Ewing es un tumor o un cáncer o metástasis de tal cáncer.

[0530] La divulgación proporciona procedimientos para tratar un trastorno proliferativo de células de la próstata, pulmón o colon que comprende administrar a un individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-STEAP-1 o inmunoconjugado del mismo. Un procedimiento para tratar un trastorno proliferativo de células de la próstata, pulmón o colon puede comprender administrar a un individuo una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-STEAP-1 o inmunoconjugado anti-STEAP-1 y, opcionalmente, al menos un agente terapéutico adicional, tal como aquellos proporcionados en este documento.

[0531] En un aspecto, al menos algunos de los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención pueden unirse a STEAP-1 de especies distintas de ser humano. Por consiguiente, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención pueden usarse para unirse a STEAP-1, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene STEAP-1, en seres humanos, o en otros mamíferos que tienen una STEAP-1 con la que un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención reacciona de forma cruzada (por ejemplo, chimpancé, babuino, tití, monos cinomolgos y rhesus, perro, cerdo, rata o ratón). En una realización, un anticuerpo anti-STEAP-1 o inmunoconjugado puede usarse para elegir como diana STEAP-1 en células de la próstata, pulmón o colon poniendo en contacto el anticuerpo o inmunoconjugado con STEAP-1 para formar un anticuerpo o complejo de inmunoconjugado-antígeno de forma que una citotoxina conjugada del inmunoconjugado acceda al interior de la célula. En una realización, la STEAP-1 a la que el anticuerpo anti-STEAP-1 se une es STEAP-1 humana. En una realización, la STEAP-1 a la que el anticuerpo anti-STEAP-1 se une es STEAP-1 de mono cinomolgo. En una realización, el anticuerpo anti-STEAP-1 humanizado se une a STEAP-1 humana y/o de mono cinomolgo.

[0532] En una realización, un anticuerpo anti-STEAP-1 o inmunoconjugado puede usarse en un procedimiento para la unión de STEAP-1 en un individuo que padece un trastorno asociado a expresión y/o actividad de STEAP-1 elevadas, comprendiendo el procedimiento administrar al individuo el anticuerpo o inmunoconjugado de forma que STEAP-1 se una en el individuo. En una realización, el anticuerpo o inmunoconjugado unido se internaliza en la célula de próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario o célula de sarcoma de Ewing que expresa STEAP-1. En una realización, la STEAP-1 es STEAP-1 humana, y el individuo es un individuo humano. Alternativamente, el individuo puede ser un mamífero que expresa STEAP-1 a la que se une un anticuerpo anti-STEAP-1. Todavía adicionalmente,

el individuo puede ser un mamífero en el que STEAP-1 se ha introducido (por ejemplo, por administración de STEAP-1 o por expresión de un transgén que codifica STEAP-1).

[0533] Un anticuerpo anti-STEAP-1 o inmunoconjugado puede administrarse a un ser humano para fines terapéuticos. Además, un anticuerpo anti-STEAP-1 o inmunoconjugado puede administrarse a un mamífero no humano que expresa STEAP-1 con el que el anticuerpo reacciona de forma cruzada (por ejemplo, un primate, perro, cerdo, rata o ratón) para fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a lo último, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos o inmunoconjugados de la invención (por ejemplo, prueba de dosificaciones y transcurros de tiempo de administración).

[0534] Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención pueden usarse tanto solos como en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención puede co-administrarse con al menos un agente terapéutico y/o adyuvante adicional. En ciertas realizaciones, un agente terapéutico adicional es un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento. En una de tales realizaciones, un agente quimioterapéutico es un agente o una combinación de agentes tales como, por ejemplo, ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina, adriamicina, doxorubicina, vincristina (Oncovin™), prednisolona, CHOP, CVP o COP, o agentes inmunoterapéuticos tales como anti-PSCA (véase, por ejemplo, el documento US6824780), anti-VEGF (por ejemplo, Avastin®, Genentech, Inc.), anti-HER2 (por ejemplo, Herceptin®, Omnitarg™ Genentech, Inc.) o anti-HER2 en combinación con Taxol® (véase, por ejemplo, BioWorld Today, 17 de noviembre de 1999, página 1), en el que la terapia de combinación es útil en el tratamiento de trastornos proliferativos de células, cánceres y/o metástasis de cánceres de próstata, pulmón y/o colon.

[0535] Tales terapias de combinación observadas anteriormente engloban administración combinada (cuando dos o más agentes terapéuticos están incluidos en la misma formulación o formulaciones separadas) y administración separada, en cuyo caso la administración del anticuerpo o inmunoconjugado de la invención puede producirse antes de, simultáneamente y/o tras la administración del agente terapéutico y/o adyuvante adicional. Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención también pueden usarse en combinación con radioterapia.

[0536] Un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención (y cualquier agente terapéutico o adyuvante adicional) puede administrarse por cualquier medio adecuado que incluye administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo o inmunoconjugado se administra adecuadamente por infusión por impulsos, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo o inmunoconjugado. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

[0537] Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se formularían, dosificarían y administrarían en un modo de acuerdo con la buena práctica médica. Factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que está tratándose, el mamífero particular que está tratándose, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, el programa de administración y otros factores conocidos para los médicos generales. El anticuerpo o inmunoconjugado no necesita formularse, pero opcionalmente se formula, con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo o inmunoconjugado presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores tratados anteriormente. Éstos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se describen en este documento, o aproximadamente del 1 al 99 % de las dosificaciones descritas en este documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se haya determinado empíricamente/clínicamente que es apropiada.

[0538] Para la prevención o el tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o varios agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes quimioterapéuticos) dependerá del tipo de enfermedad que vaya a tratarse, el tipo de anticuerpo o inmunoconjugado, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo o inmunoconjugado se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo o inmunoconjugado, y el criterio del médico adjunto. El anticuerpo o inmunoconjugado se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (por ejemplo 0,1 mg/kg-20 mg/kg) de anticuerpo o

inmunoconjugado pueden ser una dosificación candidata inicial para administración al paciente, tanto si es, por ejemplo, por una o por más administraciones separadas como por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento sería generalmente sostenido hasta que se produjera una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación a modo de ejemplo del anticuerpo o inmunoconjugado estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) de anticuerpo o inmunoconjugado puede administrarse al paciente. Tales dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de forma que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo o inmunoconjugado). Puede administrarse una dosis de carga superior inicial, seguida de una o más dosis inferiores. Una pauta de dosificación a modo de ejemplo comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Ensayos

[0539] Los anticuerpos anti-STEAP-1 e inmunoconjugados de la invención pueden caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

Ensayos de actividad

[0540] En un aspecto se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-STEAP-1 o inmunoconjugados de los mismos que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la capacidad para inhibir el crecimiento o proliferación celular (por ejemplo, actividad "destructora de células"), o la capacidad para inducir muerte celular, que incluye muerte celular programada (apoptosis). También se proporcionan anticuerpos o inmunoconjugados que tienen tal actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

[0541] En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-STEAP-1 o inmunoconjugado del mismo se prueba para su capacidad para inhibir el crecimiento o proliferación celular *in vitro*. Los ensayos para la inhibición del crecimiento o proliferación celular son muy conocidos en la técnica. Ciertos ensayos para la proliferación celular, ejemplificados por los ensayos "deconstructores de células" descritos en este documento, miden la viabilidad celular. Un ensayo tal es el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo™, que está comercialmente disponible de Promega (Madison, WI). Este ensayo determina el número de células viables en cultivo basándose en la cuantificación de ATP presente, que es una indicación de células metabólicamente activas. Véanse Crouch y col. (1993) *J. Immunol. Meth.* 160: 81-88, patente de EE.UU. Nº 6602677. El ensayo puede realizarse en formato de 96 o 384 pocillos, haciendo que sea aceptable para cribado de alto rendimiento automatizado (HTS). Véase Cree y col. (1995) *AntiCancer Drugs* 6: 398-404. El procedimiento de ensayo implica añadir un único reactivo (reactivo CellTiter-Glo®) directamente a las células cultivadas. Éste produce la lisis de células y la generación de una señal luminiscente producida por una reacción de luciferasa. La señal luminiscente es proporcional a la cantidad de ATP presente, que es directamente proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. Los datos pueden registrarse por luminómetro o dispositivo de obtención de imágenes de cámara CCD. La salida de luminiscencia se expresa como unidades relativas de luz (URL).

[0542] Otro ensayo para la proliferación celular es el ensayo "MTT", un ensayo colorimétrico que mide la oxidación de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio a formazán por reductasa mitocondrial. Al igual que el ensayo de CellTiter-Glo™, este ensayo indica el número de células metabólicamente activas presentes en un cultivo celular. Véanse, por ejemplo, Mosmann (1983) *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63, y Zhang y col. (2005) *Cancer Res.* 65: 3877-3882.

[0543] En un aspecto, un anticuerpo anti-STEAP-1 se prueba para su capacidad para inducir muerte celular *in vitro*. Los ensayos para la inducción de muerte celular son muy conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, tales ensayos miden, por ejemplo, la pérdida de la integridad de membranas como se indica por la captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano (véase Moore y col. (1995) *Cytotechnology*, 17: 1-11) o 7AAD. En un ensayo de captación de PI a modo de ejemplo, las células se cultivan en medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM): Ham's F-12 (50: 50) complementado con 10 % de SBF inactivado por calor (Hyclone) y L-glutamina 2 mM. Por tanto, el ensayo se realiza en ausencia de complemento y células efectoras inmunitarias. Las células se siembran a una densidad de 3×10^6 por placa en placas de 100 x 20 mm y se deja que se unan durante la noche. El medio se

elimina y se sustituye con medio fresco solo o medio que contiene diversas concentraciones del anticuerpo o inmunoc conjugado. Las células se incuban durante un periodo de tiempo de 3 días. Tras el tratamiento, las monocapas se lavan con PBS y se desprenden por tripsinación. Entonces, las células se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C, el sedimento se resuspende en 3 ml de tampón de unión de Ca²⁺ frío (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM) y se separa en alícuotas en tubos de 12 x 75 mm tapados con filtro de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de grupos de células. Entonces, los tubos reciben PI (10 µg/ml). Las muestras se analizan usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y el software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Por tanto, se identifican anticuerpos o inmunoc conjugados que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular como se ha determinado por captación de PI.

10

[0544] En un aspecto, un anticuerpo anti-STEAP-1 o inmunoc conjugado se prueba para su capacidad para inducir apoptosis (muerte celular programada) *in vitro*. Un ensayo a modo de ejemplo para anticuerpos o inmunoc conjugados que inducen apoptosis es un ensayo de unión a anexina. En un ensayo de unión a anexina a modo de ejemplo, las células se cultivan y se siembran en placas como se ha tratado en el párrafo precedente. El medio se elimina y se sustituye con medio fresco solo o medio que contiene 0,001 a 10 µg/ml del anticuerpo o inmunoc conjugado. Tras un periodo de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se desprenden por tripsinación. Entonces, las células se centrifugan, se resuspenden en tampón de unión de Ca²⁺ y se separan en alícuotas en tubos como se ha tratado en el párrafo precedente. Entonces, los tubos reciben la anexina marcada (por ejemplo, anexina V-FITC) (1 µg/ml). Las muestras se analizan usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y el software FACSCONVERT™ CellQuest (BD Biosciences). Por tanto, se identifican anticuerpos o inmunoc conjugados que inducen niveles estadísticamente significativos de unión a anexina con respecto al control. Otro ensayo a modo de ejemplo para anticuerpos o inmunoc conjugados que inducen apoptosis es un ensayo colorimétrico de ELISA con ADN de histona para detectar degradación internucleosómica de ADN genómico. Un ensayo tal puede realizarse usando, por ejemplo, el kit de ELISA de detección de muerte celular (Roche, Palo Alto, CA).

25

[0545] Células para su uso en cualquiera de los ensayos anteriores *in vitro* incluyen células o líneas celulares que expresan naturalmente STEAP-1 o que se han manipulado para expresar STEAP-1. Tales células incluyen células tumorales que expresan en exceso STEAP-1 con respecto a células normales del mismo origen de tejido. Tales células también incluyen líneas celulares (incluyendo líneas celulares tumorales) que expresan STEAP-1 y líneas celulares que normalmente no expresan STEAP-1, pero que han sido transfectadas con ácido nucleico que codifica STEAP-1.

30

[0546] En un aspecto, un anticuerpo anti-STEAP-1 o inmunoc conjugado del mismo se prueba para su capacidad para inhibir el crecimiento o proliferación celular *in vivo*. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-STEAP-1 o inmunoc conjugado del mismo se prueba para su capacidad para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*. Para tal prueba pueden usarse sistemas de modelo *in vivo*, tales como modelos de xenoinjerto. En un sistema de xenoinjerto a modo de ejemplo, células tumorales humanas se introducen en animal no humano inadecuadamente inmunodeprimido, por ejemplo, un ratón SCID. Un anticuerpo o inmunoc conjugado de la invención se administra al animal. Se mide la capacidad del anticuerpo o inmunoc conjugado para inhibir o disminuir el crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones del sistema de xenoinjerto anterior, las células tumorales humanas son células tumorales de un paciente humano. Tales células útiles para preparar modelos de xenoinjerto incluyen líneas celulares de tumor de próstata, pulmón o colon humano que incluyen, sin limitación, células PC3 que expresan STEAP-1 exógena y células que expresan naturalmente STEAP-1 que incluyen, sin limitación, células LnCAP (Southern Research Institute, Birmingham, AL), células LuCAP 77 y células LuCAP35V (Universidad de Washington, Seattle, WA). En ciertas realizaciones, las células tumorales humanas se introducen en un animal no humano adecuadamente inmunodeprimido por inyección subcutánea o por trasplante en un sitio adecuado, tal como un pániculo adiposo mamario.

45

Ensayos de unión y otros ensayos

50

[0547] En un aspecto, un anticuerpo anti-STEAP-1 se prueba para su actividad de unión a antígeno. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-STEAP-1 se prueba para su capacidad para unirse a STEAP-1 exógena o endógena expresada sobre la superficie de una célula. Para tal prueba puede usarse un ensayo de FACS.

55

[0548] En un aspecto pueden usarse ensayos de competencia para identificar un anticuerpo monoclonal que compite con 120 injertos o las variantes humanizadas del mismo que incluyen, sin limitación, anticuerpo 120v.24 para unirse a STEAP-1. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de competencia tal se une al mismo epítipo (por ejemplo, un péptido de epítipo lineal o un epítipo conformacional formado por la expresión de STEAP1 sobre una

superficie celular) que está unido por el anticuerpo 120 injerto, o anticuerpo 120 injerto humanizado, que incluye el anticuerpo anti-STEAP-1 humanizado variante 120v.24. Ensayos de competencia a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, ensayos rutinarios tales como aquellos proporcionados en Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* Cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Procedimientos detallados a modo de ejemplo para el mapeo de un epítipo con el que se une un anticuerpo se proporcionan en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols" en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Se dice que dos anticuerpos se unen al mismo epítipo si cada uno bloquea la unión del otro el 50 % o más.

[0549] En un ensayo de competencia a modo de ejemplo, STEAP-1 inmovilizada se incuba en una disolución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a STEAP-1 (por ejemplo, anticuerpo 120.545 murino, anticuerpo 120 injerto o anticuerpo 120v.24 humanizado) y un segundo anticuerpo marcado que se está probando para su capacidad para competir con el primer anticuerpo para unirse a STEAP-1. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, STEAP-1 inmovilizada se incuba en una disolución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo sin marcar. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo a STEAP-1, el anticuerpo sin unir en exceso se elimina y se mide la cantidad de marca asociada a STEAP-1 inmovilizada. Si la cantidad de marca asociada a STEAP-1 inmovilizada es sustancialmente reducida en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo para unirse a STEAP-1. En ciertas realizaciones, STEAP-1 inmovilizada está presente sobre la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida de una célula que expresa STEAP-1 sobre su superficie.

[0550] En un aspecto, anticuerpos anti-STEAP-1 purificados pueden caracterizarse adicionalmente por una serie de ensayos que incluyen, pero no se limitan a, secuenciación del extremo N, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) por exclusión de tamaño no desnaturalizante, espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

[0551] En una realización, la invención contempla un anticuerpo alterado que posee algunas funciones efectoras, pero no todas, que hace que sea un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, aún ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En ciertas realizaciones, las actividades de Fc del anticuerpo se miden para garantizar que sólo se mantengan las propiedades deseadas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión a Fc γ R (de ahí que probablemente carezca de actividad de ADCC), pero retiene capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en ADCC, los linfocitos NK, sólo expresan Fc γ R1, Fc γ R2 y Fc γ R3. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar actividad de ADCC de una molécula de interés se describe en las patentes de EE.UU. Nº 5.500.362 o 5.821.337. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citotóxicos espontáneos (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes y col. *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998). Los ensayos de unión a C1q también pueden llevarse a cabo para confirmar que el anticuerpo no puede unirse a C1q y de ahí que carezca de actividad de CDC. Para evaluar la activación del complemento puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro y col., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996). Las determinaciones de la unión de FcRn y la eliminación/semivida *in vivo* también pueden realizarse usando procedimientos conocidos en la técnica.

EJEMPLOS

[0552] Lo siguiente son ejemplos de procedimientos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica diversas otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplo 1: Preparación de anticuerpos anti-STEAP-1 humanizados

[0553] Se preparan moléculas de ácidos nucleicos que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio VL o dominio VH mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que se producen naturalmente) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete de una variante

anteriormente preparada o una versión no variante del anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio VL o dominio VH. Por ejemplo, pueden crearse bibliotecas eligiendo como diana posiciones de aminoácidos accesibles de VL en VH, y opcionalmente en una o más CDR, para sustitución de aminoácidos con aminoácidos de variantes usando el procedimiento de Kunkel. Véase, por ejemplo, Kunkel y col., *Methods Enzymol.* (1987), 154: 367-382 y los ejemplos en este documento. La generación de secuencias al azar también se describe más adelante en los ejemplos.

[0554] La secuencia de oligonucleótidos incluye uno o más de los conjuntos de codones diseñados para una posición particular en una región CDR (HVR) o FR de un polipéptido de la invención. Un conjunto de codones es un conjunto de diferentes secuencias de triplete de nucleótidos usadas para codificar aminoácidos de variantes deseados. Los conjuntos de codones pueden representarse usando símbolos para designar nucleótidos particulares o mezclas equimolares de nucleótidos como se muestra a continuación según el código IUB.

[0555] CODIGOS IUB

15 G Guanina
 A Adenina
 T Timina
 C Citosina
 R (A o G)
 20 Y (C o T)
 M (A o C)
 K (G o T)
 S (C o G)
 W (A o T)
 25 H (A o C o T)
 B (C o G o T)
 V (A o C o G)
 D (A o G o T)
 N (A o C o G o T)

30 **[0556]** Por ejemplo, en el conjunto de codones DVK, D puede ser los nucleótidos A o G o T; V puede ser A o G o C; y K puede ser G o T. Este conjunto de codones puede presentar 18 codones diferentes y puede codificar los aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly y Cys.

35 **[0557]** Los conjuntos de oligonucleótidos o cebadores pueden sintetizarse usando procedimientos convencionales. Un conjunto de oligonucleótidos puede sintetizarse, por ejemplo, por síntesis en fase sólida, que contiene secuencias que representan todas las posibles combinaciones de los tripletes de nucleótidos proporcionados por el conjunto de codones y que codificarán el grupo de aminoácidos deseado. La síntesis de oligonucleótidos con "degeneración" de nucleótidos seleccionada en ciertas posiciones es muy conocida en esa técnica. Tales conjuntos de nucleótidos que tienen ciertos conjuntos de codones pueden sintetizarse usando sintetizadores de ácidos nucleicos comerciales (disponibles de, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA), o pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por tanto, un conjunto de oligonucleótidos sintetizado que tiene un conjunto de codones particular incluirá normalmente una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las diferencias establecidas por el conjunto de codones dentro de la secuencia global. Los oligonucleótidos, como se usa según la invención, tienen secuencias que permiten la hibridación con un molde de ácido nucleico de dominio variable y también pueden incluir sitios de enzimas de restricción para fines de clonación.

50 **[0558]** En un procedimiento, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican aminoácidos de variantes pueden crearse por mutagénesis mediada por oligonucleótidos. Esta técnica es muy conocida en la técnica como se describe por Zoller y col., 1987, *Nucleic Acids Res.* 10: 6487-6504. Brevemente, secuencias de ácidos nucleicos que codifican aminoácidos de variantes se crean hibridando un conjunto de oligonucleótidos que codifica los conjuntos de codones deseados con un molde de ADN, en el que el molde es la forma monocatenaria del plásmido que contiene una secuencia del molde de ácido nucleico de la región variable. Después de la hibridación se usa ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena complementaria entera del molde que, por tanto, incorporará el cebador de oligonucleótidos y contendrá los conjuntos de codones como se proporciona por el conjunto de oligonucleótidos.

[0559] Generalmente se usan oligonucleótidos de al menos 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido

óptimo tendrá 12 a 15 nucleótidos que son completamente complementarios al molde en cualquier lado del (de los) nucleótido(s) que codifican la(s) mutación (mutaciones). Esto garantiza que el oligonucleótido se hibridará apropiadamente con la molécula de molde del ADN monocatenario. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente usando técnicas conocidas en la técnica tales como las descritas por Crea y col., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 75: 5 5765 (1978).

[0560] El molde de ADN se genera por aquellos vectores que tanto se derivan de vectores del bacteriófago M13 (los vectores M13mp18 y M13mp19 comercialmente disponibles son adecuados) como aquellos vectores que contienen un origen de replicación de fago monocatenario como se describe por Viera y col., Meth. Enzymol., 153: 3 10 (1987). Por tanto, el ADN que va a mutarse puede insertarse en uno de estos vectores con el fin de generar molde monocatenario. La producción del molde monocatenario se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook y col., anteriormente.

[0561] Para alterar la secuencia de ADN nativa, el oligonucleótido se hibrida con el molde monocatenario bajo 15 condiciones de hibridación adecuadas. Luego se añade una enzima polimerizante de ADN, normalmente T7 ADN polimerasa o el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I, para sintetizar la cadena complementaria del molde usando el oligonucleótido como cebador para la síntesis. Por tanto, se forma una molécula de heterodúplex de forma que una cadena de ADN codifica la forma mutada del gen 1 y la otra cadena (el molde original) codifica la secuencia sin alterar nativa del gen 1. Entonces, esta molécula de heterodúplex se transforma en una célula huésped 20 adecuada, normalmente una procarionta tal como JM101 de *E. coli*. Después de cultivar las células, se siembran sobre placa de agarosa y se criban usando el cebador de oligonucleótidos radiomarcado con un 32-fosfato para identificar las colonias bacterianas que contienen el ADN mutado.

[0562] El procedimiento descrito inmediatamente antes puede modificarse de forma que se cree una molécula 25 de homodúplex en la que ambas cadenas del plásmido contengan la(s) mutación (mutaciones). Las modificaciones son del siguiente modo: el oligonucleótido monocatenario se hibrida con el molde monocatenario como se ha descrito anteriormente. Una mezcla de los tres desoxirribonucleótidos, desoxirriboadenosina (dATP), desoxirriboguanosina (dGTP) y desoxirribotimidina (dTTP), se combina con una tiodesoxirribocitosina modificada llamada dCTP-(aS) (que puede obtenerse de Amersham). Esta mezcla se añade al complejo de molde- 30 oligonucleótido. Tras la adición de ADN polimerasa a esta mezcla se genera una cadena de ADN idéntica al molde, excepto por la bases mutadas. Además, esta nueva cadena de ADN contendrá dCTP-(aS) en lugar de dCTP, que sirve para protegerlo de la digestión por endonucleasa de restricción. Después de doblarse la cadena del molde del heterodúplex bicatenario con una enzima de restricción apropiada, la cadena del molde puede digerirse con la nucleasa ExoIII u otra nucleasa apropiada pasada la región que contiene el (los) sitio(s) que va(n) a mutagenizarse. 35 Entonces, la reacción se detiene para dejar una molécula que sólo es parcialmente monocatenaria. Entonces se forma un homodúplex de ADN bicatenario completo usando ADN polimerasa en presencia de los cuatro trifosfatos de desoxirribonucleótido, ATP y ADN ligasa. Esta molécula de homodúplex puede entonces transformarse en una célula huésped adecuada.

[0563] Como se indica previamente, la secuencia del conjunto de oligonucleótidos es de longitud suficiente 40 para hibridarse con el ácido nucleico molde y, por tanto, puede contener, pero no necesariamente, sitios de restricción. El molde de ADN puede generarse por aquellos vectores que se derivan tanto de los vectores del bacteriófago M13 como de vectores que contienen un origen de replicación de fago monocatenario como se describe por Viera y col. ((1987) Meth. Enzymol., 153: 3). Por tanto, el ADN que va a mutarse debe insertarse en uno 45 de estos vectores con el fin de generar molde monocatenario. La producción del molde monocatenario se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook y col., arriba.

[0564] Según otro procedimiento, una biblioteca puede generarse proporcionando conjuntos de 50 oligonucleótidos en la dirección 5' y en la dirección 3', teniendo cada conjunto una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las diferentes secuencias establecidas por los conjuntos de codones proporcionados dentro de la secuencia de los oligonucleótidos. Los conjuntos de oligonucleótidos en la dirección 5' y en la dirección 3', junto con un secuencia de ácidos nucleicos de molde del dominio variable, pueden usarse en una reacción en cadena de la polimerasa para generar una "biblioteca" de productos de PCR. Los productos de PCR pueden denominarse en lo sucesivo "casetes de ácidos nucleicos" y pueden fusionarse con otras secuencias de ácidos nucleicos relacionadas 55 o sin relacionar, por ejemplo, proteínas de la envoltura vírica y dominios de dimerización, usando técnicas de biología molecular establecidas.

[0565] Los conjuntos de oligonucleótidos pueden usarse en una reacción en cadena de la polimerasa usando una secuencia molde de ácidos nucleicos del dominio variable como molde para crear casetes de ácidos nucleicos.

La secuencia molde de ácidos nucleicos del dominio variable puede ser cualquier porción de las cadenas de inmunoglobulina pesadas que contienen las secuencias de ácidos nucleicos diana (es decir, secuencias de ácidos nucleicos que codifican aminoácidos elegidos como diana para la sustitución). La secuencia molde de ácidos nucleicos de la región variable es una parte de una molécula de ADN bicatenaria que tiene una primera cadena de ácido nucleico y segunda secuencia molde de ácidos nucleicos complementaria. La secuencia molde de ácidos nucleicos del dominio variable contiene al menos una parte de un dominio variable y tiene al menos una CDR. En algunos casos, la secuencia molde de ácidos nucleicos del dominio variable contiene más de una CDR. Una porción en la dirección 5' y una porción en la dirección 3' de la secuencia molde de ácidos nucleicos del dominio variable puede elegirse como diana para la hibridación con miembros de un conjunto de oligonucleótidos en la dirección 5' y un conjunto de oligonucleótidos en la dirección 3'.

[0566] Un primer oligonucleótido del conjunto de cebadores en la dirección 5' puede hibridarse con la primera cadena del ácido nucleico y un segundo oligonucleótido del conjunto de cebadores en la dirección 3' puede hibridarse con la segunda cadena de ácido nucleico. Los cebadores de oligonucleótidos pueden incluir uno o más conjuntos de codones y diseñarse para hibridarse con una parte de la secuencia molde de ácidos nucleicos de la región variable. El uso de estos oligonucleótidos puede introducir dos o más conjuntos de codones en el producto de PCR (es decir, el casete de ácidos nucleicos) tras la PCR. El cebador de oligonucleótidos que se hibrida con regiones de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio variable del anticuerpo incluye porciones que codifican residuos de CDR que son elegidos como diana para la sustitución de aminoácidos.

[0567] Los conjuntos de oligonucleótidos en la dirección 5' y en la dirección 3' también pueden sintetizarse para incluir sitios de restricción dentro de la secuencia de oligonucleótidos. Estos sitios de restricción pueden facilitar la inserción de los casetes de ácidos nucleicos (es decir, reacción de productos de PCR) en un vector de expresión que tiene la secuencia del anticuerpo adicional. En una realización, los sitios de restricción se diseñan para facilitar la clonación de los casetes de ácidos nucleicos sin introducir secuencias de ácidos nucleicos extrañas o eliminar secuencias de ácidos nucleicos de CDR o regiones estructurales originales.

[0568] Los casetes de ácidos nucleicos pueden clonarse en cualquier vector adecuado para la expresión de una parte o la secuencia de cadena ligera o pesada entera que contiene las sustituciones de aminoácidos elegidas como diana generadas por la reacción de PCR. Según procedimientos detallados en la invención, el casete de ácidos nucleicos se clona en un vector que permite la producción de una parte o la secuencia de cadena ligera o pesada entera fusionada con toda o una parte de una proteína de la envoltura vírica (es decir, creando una proteína de fusión) y expresada sobre la superficie de una partícula o célula. Aunque están disponibles varios tipos de vectores y pueden usarse para poner en práctica la presente invención, los vectores de fagémido son los vectores preferidos para su uso en este documento, ya que pueden construirse con relativa facilidad y pueden amplificarse fácilmente. Los vectores de fagémido generalmente contienen una variedad de componentes que incluyen promotores, secuencias señal, genes de selección fenotípica, sitios de origen de replicación y otros componentes necesarios como son conocidos para aquellos expertos en la materia.

[0569] Si va a expresarse una combinación de aminoácidos de variantes particular, el casete de ácidos nucleicos contiene una secuencia que puede codificar toda o una parte del dominio variable de la cadena pesada o ligera, y puede codificar las combinaciones de aminoácidos de variantes. Para la producción de anticuerpos que contienen estos aminoácidos de variantes o combinaciones de aminoácidos de variantes, como en una biblioteca, los casetes de ácidos nucleicos pueden insertarse en un vector de expresión que contiene la secuencia del anticuerpo adicional, por ejemplo, toda o porciones de los dominios variables o constantes de las regiones variables de la cadena ligera y pesada. Estas secuencias de anticuerpos adicionales también pueden fusionarse con otras secuencias de ácidos nucleicos, tales como secuencias que codifican proteínas de la envoltura vírica y, por tanto, permitir la producción de una proteína de fusión.

[0570] En este documento se describe la humanización del anticuerpo murino anti-STEAP-1 humana.

Materiales y procedimientos

[0571] Los números de residuos son según Kabat (Kabat y col., Sequences of Proteins of immunological interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Se usan abreviaturas de aminoácidos de una sola letra. Las degeneraciones de ADN se representan usando el código IUB (N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B = C/G/T, H = A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W = A/T, Y = C/T).

[0572] *Clonación de dominios variables de murino 120 y generación de un anticuerpo 120 quimérico -*

Se extrajo ARN total de células de hibridoma que produjeron M2-120.545 (designado "murino 120" o "mu120" en este documento) usando procedimientos convencionales. Los dominios ligeros variables (VL) y pesados variables (VH) se amplificaron usando RT-PCR con cebadores degenerados para las cadenas pesadas y ligeras. Los cebadores directos fueron específicos para la secuencia de aminoácidos del extremo N de las regiones VL y VH. Respectivamente, los cebadores inversos LC y HC se diseñaron para hibridarse con una región en el dominio ligero constante (CL) y pesado constante 1 (CH1), que están altamente conservados a través de especies. VL y VH amplificados se clonaron en vectores de expresión de mamífero. La secuencia de polinucleótidos de los insertos se determinó usando procedimientos de secuenciación rutinarios. Las secuencias de aminoácidos de VL y VH de M2-120.545 ("mu 120") se muestran en las Figuras 2A y 2B, respectivamente.

10 **[0573]** *Generación de murino 120 quimera* - Se preparó un anticuerpo anti-STEAP-1 quimérico fusionando las regiones pesadas variables (VH) y ligeras variables (VL) de murino 120 en los dominios constantes de una IgG humana. El anticuerpo resultante se designa "120 quimera", "quimera 120", "IgG 120 quimérica" o "quimera de Fc" en este documento.

15 **[0574]** *Injertos de región hipervariable directos sobre la región estructural consenso humana del aceptor* - Se evaluaron variantes construidas durante la humanización de murino 120 tanto como proteína en forma de una IgG como un Fab expresado en fago.

20 **[0575]** El fagémido usado para este trabajo es un vector de expresión Fab-g3 monovalente y consiste en dos marcos de lectura abiertos bajo el control del promotor phoA. El primer marco de lectura abierto consiste en la secuencia señal stII fusionada con los dominios VL y CH1 de la cadena ligera del aceptor y el segundo consiste en la secuencia señal stII fusionada con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada del aceptor, seguido de la proteína de la envoltura del fago menor P3.

25 **[0576]** Los dominios VL y VH de murino 120 se alinearon con las secuencias consenso de VL kappa I humana (huKI) y del subgrupo III de VH humana (huIII). Para preparar los injertos de CDR, regiones hipervariables del anticuerpo murino 120 se injertaron en las regiones estructurales del aceptor huKI y huIII.

30 **[0577]** Las regiones hipervariables del anticuerpo murino 120 (mu120) se manipularon en la región estructural consenso humana del aceptor para generar el injerto de CDR directo (designado "120 injerto" o "injerto 120" en este documento). En el dominio VL se injertaron las siguientes regiones al aceptor consenso humano: posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3). En el dominio VH se injertaron las posiciones 26-35a (H1), 49-65 (H2) y 95-102 (H3). Las secuencias de las regiones variables de la cadena ligera y pesada de 120 injerto se muestran en las Figuras 2A-2B. Las CDR (también designadas aquí HVR) se muestran en recuadros (Figuras 2A-2B). Estas definiciones de CDR incluyen posiciones definidas por su hipervariabilidad de secuencias (ref a Kabat), su localización estructural (ref a Chotia) y su implicación en los contactos antígeno-anticuerpo (MacCallum y col. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)).

40 **[0578]** Las variantes de injerto directo expresadas como un Fab expresado en fago o como una IgG se generaron por mutagénesis de Kunkel usando un oligonucleótido separado para cada región hipervariable. Los clones correctos se evaluaron por secuenciación de ADN.

45 **[0579]** *Generación de variantes de fago 120 humanizadas* - Se generaron variantes 120 humanizadas como Fab expresado en fago por mutagénesis de Kunkle. Un oligonucleótido fosforilado se añadió a 300 ng de molde de Kunkel en Tris 50 mM a pH 7,5, MgCl₂ 10 mM en un volumen final de 10 µl. La mezcla se hibridó 90 °C durante 2 min, 50 °C durante 5 min y luego se enfrió sobre hielo. Entonces, el molde hibridado se cargó añadiendo 0,5 µl de ATP 10 mM, 0,5 µl de dNTP 10 mM (10 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl de DTT 100 mM, 1 µl 10X tampón TM (Tris 0,5 M a pH 7,5, MgCl₂ 0,1 M), 80 U de T4 ligasa y 4 U de T7 polimerasa en un volumen total de 20 µl durante 2 h a temperatura ambiente. Entonces, el producto cargado y ligado se transformó en células XL1-blue (Stratagene). Los clones correctos se evaluaron por secuenciación de ADN.

50 **[0580]** Los clones de fago correctos se cultivaron en 25 ml de 2YT que contenía 50 µg/ml de carbenicilina y fago auxiliar M 13/KO7 (MOI 10) durante la noche a 37 °C.

55 **[0581]** *Evaluación de variantes de 120 humanizadas* - Las variantes humanizadas expresadas como IgG se evaluaron por análisis de FACS usando líneas celulares positivas para STEAP-1 (293 Steap1 NT LB50) y negativas (vector S408 de 293).

[0582] Las variantes humanizadas expresadas como un Fab expresado en fago también se evaluaron por análisis de FACS. El fago que expresa variantes de Fab se evaluó primero para su nivel de expresión de Fab usando un ELISA en fago usado para detectar una marca flag fusionada con la cadena ligera de Fab. Placas de microtitulación MaxiSorp se recubrieron con anti-gD 1766 a 10 µg/ml en PBS durante la noche y luego se bloquearon con caseína bloqueante. El fago de sobrenadantes de cultivo se diluyó seriadamente en PBST que contenía 0,5 % de BSA en una placa de microtitulación de cultivo de tejido y se transfirió a los pocillos recubiertos durante 1 h para capturar el fago que expresaba Fab. La placa se lavó con PBST y se añadió anti-M13 conjugado con HRP (Amersham Pharmacia Biotech) (1: 5000 en PBST que contenía 0,5 % de BSA) durante 40 min. La placa se lavó con PBST y se reveló añadiendo sustrato de tetrametilbencidina (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD).
 5
 10 La absorbancia a 405 nm se usó como un cálculo estimado del nivel de expresión de Fab sobre la superficie del fago. Las preparaciones de fago se normalizaron para la expresión por dilución. El fago de baja expresión (por ejemplo, la quimera) se usó puro para análisis de FACS.

[0583] Para el análisis de FACS de unión a fago, las células se eliminaron de la placa usando EDTA 2 mM, se recogieron en un tubo de fondo cónico de 15 ml y se sedimentaron por centrifugación. Las células (5×10^5 células por muestra) se resuspendieron en 100 µl de fago (normalizado por nivel de expresión) en tampón FACS (1 % de FBS, PBS con EDTA 2 mM) y se incubaron durante 1-2 horas sobre hielo. Las muestras se lavaron dos veces con tampón FACS por centrifugación. Se añadió anticuerpo de control anti-M 13 5G7 (Genentech, Inc. South San Francisco, CA) a 2 µg/ml y se incubó sobre hielo durante al menos 45 minutos. Las muestras se lavaron dos veces con tampón FACS por centrifugación. Se añadió una dilución 1: 200 de anti-PE de ratón (fragmento Fc γ de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugada con R-ficoeritrina, Jackson ImmunoResearch) y se incubó sobre hielo durante 30 minutos. Las muestras se lavaron de nuevo dos veces con tampón FACS por centrifugación y se analizaron por FACS.

[0584] Para el análisis de IgG por FACS, las células se prepararon como en FACS en fago. Cada IgG se añadió a 5 µg/ml sobre hielo durante 1 hora. Las muestras se lavaron dos veces con tampón FACS por centrifugación y una dilución 1: 200 de conjugado de anti-PE humana (fragmento Fc γ de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugada con R-ficoeritrina, Jackson ImmunoResearch) se añadió durante 30 minutos. Las muestras se lavaron de nuevo dos veces con tampón FACS por centrifugación y las muestras se analizaron por FACS.

[0585] *Producción de IgG y determinación por afinidad* - Se purificó IgG con cromatografía de afinidad por proteína G. Las determinaciones de afinidad se realizaron por análisis de Scatchard en células 293 STEAP-1 NT LB50.

35 Resultados y discusión

[0586] *Secuencias de dominio variable murino 120 y diseño de injerto de asignación a CDR* - La región estructural del aceptor humana usada para la humanización de M2-120.545 se basa en el dominio VL kappa I humano consenso y el dominio VH consenso del subgrupo III humano. Los dominios VL y VH de M2-120.545 murino se alinearon cada uno con los dominios kappa I y del subgrupo III humanos; cada región de complementariedad (CDR) se identificó y se injertó en la región estructural del aceptor humana para generar un injerto de CDR que podría expresarse como un Fab en fago y expresarse como una IgG. Las secuencias de las regiones variables versión 24 del anticuerpo anti-STEAP-1 humanizado se muestran en las Figuras 2A y 2B. El Fab 120 injerto expresado en fago y la IgG 120 injerto se probaron para unirse a STEAP-1 exógena que expresaba células (293 STEAP-1 NT LB50) por análisis de FACS. Aunque la IgG 120 injerto se unió específicamente a la STEAP-1 que expresa células, la señal de FACS observada para la IgG 120 injerto fue más pequeña que la observada para la IgG 120 quimérica, indicando una pérdida en afinidad de unión. La expresión en fago del Fab 120 injerto también generó una señal de FACS que sólo se observó en STEAP-1 que expresa células. Este desplazamiento fue inferior al observado para la IgG 120 quimérica. El análisis de Scatchard de la IgG 120 injerto también indicó una pérdida significativa (aproximadamente 50 veces) en la afinidad de unión ($KD = 36$ nM para 120v.78; $KD = 260$ nM para 120 injerto).

[0587] *Humanización de M2-120.545* - Se han identificado aproximadamente 30 posiciones de vernier que influyen en la conformación de CDR y encapsidación del dominio VL: VH y deberían considerarse cambios en estas posiciones entre las regiones estructurales donantes y humanas cuando se humanizan anticuerpos (Foote, J. y Winter, G., J. Mol. Biol. 224(2): 487-499 (1992)). Una evaluación del alineamiento de M2-120.545 murino con el dominio VL kappa I humano consenso y el dominio VH consenso del subgrupo III humano revelaron diferencias de secuencias en 6 posiciones de vernier claves en el dominio VH: 24, 37, 48, 67, 73, 78 (véase Figura 2B). Para evaluar la influencia de estas posiciones, residuos murinos se introdujeron individualmente en el dominio VH del

subgrupo III consenso humano del Fab en fago. Esto implicó hacer las siguientes mutaciones al Fab 120 injerto expresado en fago individualmente: A24V (120.v24), V37I (120.v37), V48M (120.v48), F67I (120.v67) y L78F (120.v78). No se probó N73T. Cada variante de fago se normalizó por dilución a un nivel de expresión de Fab equivalente determinado por valoración de una marca de epítope fusionada con la cadena ligera expresada en el fago y luego se evaluó para la unión a STEAP-1 por análisis de FACS en células que expresan (293 STEAP-1 NT LB50) y células que no expresa (vector S408 de 293) STEAP-1. El término "2^o" se refiere al anticuerpo secundario en el análisis de FACS. El término "α-120" se refiere al anticuerpo anti-STEAP-1 murino 120. El término "α-10H1" se refiere a un anticuerpo de control. Los términos "24 fago" y "37 fago" se refieren a variantes de anti-STEAP-1 humanizadas como se desvela en este documento expresadas en fago. "Q 120 fago" se refiere a la 120 quimera expresada en fago y "120 injerto fago" se refiere al 120 injerto expresado en fago. (Figura 6). La importancia de normalizar los clones de fago por su nivel de expresión de Fab se ilustra por un análisis de FACS de 120 injerto a diferentes títulos de fago: 7×10^{12} fago/ml en la Figura 6 y 2×10^{11} fago/ml en la Figura 6. Una vez diluido a la menor concentración de fago, el 120 injerto fago ya no produjo un desplazamiento de FACS observable. Por tanto, la normalización de los diferentes clones de fago para su nivel de expresión fue una etapa importante para evaluar sus diferencias de afinidad para Steap1.

[0588] Tras la normalización para niveles de expresión de Fab, la variante de 120 injerto que contiene la mutación adicional A24V (120.v24) produjo un desplazamiento de FACS superior a otras variantes (Figura 6). Cuando se expresó como una IgG, 120.v24 produjo un desplazamiento de FACS similar al anticuerpo 120 quimérico a todas las concentraciones probadas. El posterior análisis de Scatchard de 120.v24 indicó una Kd de 2,2 nM para la unión a células 293 STEAP-1 NT LB50, una mejora de dos veces con respecto a la 120 quimera y el M2-120.545 murino original (Tabla 2).

Tabla 2: Afinidad de unión de anticuerpo anti-STEAP-1 por superficie celular STEAP-1 (Kd (nM))

Línea celular	MAB anti-STEAP-1 murino 120.545 nM	120 quimera	Anti-STEAP-1 humanizado 120v.24
PC3-PS5.4 (STEAP-1 exógena)	17,5 nM 187.256 sitios por célula	9,9 nM 103.204 sitios por célula	---
293.LB50 (STEAP-1 exógena)	4,7 nM 301.100 sitios por célula	4,9 nM 252.892 sitios por célula	2,2 nM 264.172 sitios por célula
LNCaP-BR (STEAP-1 endógena)	1,5 nM 37.207 sitios por célula	0,9 nM 22.021 sitios por célula	-

[0589] La actividad de unión de anticuerpos desnudos anti-STEAP-1, murino 120 y quimera 120 también se probó usando análisis de FACS. La unión se comparó para STEAP-1 exógena en STEAP-1 NT LB50 estables en 293, STEAP-1 PS5.4 estables en PC3 y STEAP-1 endógena en células LNCaP. Los resultados también se muestran en las Fig. 7D-7F. Células NT LB50 que expresan STEAP-1 exógena humana sobre la superficie celular se prepararon transformando establemente células 293 (ATCC CRL-1573) con ADN de STEAP-1 humana. Células PS5.4 que expresan STEAP-1 exógena humana sobre la superficie celular se prepararon transformando establemente PC3 (ATCC CLL-1435) con ADN de STEAP-1 humana. Células LNCaP (ATCC CRL-1740) expresan STEAP-1 endógenamente.

Ejemplo 2: Caracterización de anticuerpos anti-STEAP-1

[0590] Los anticuerpos anti-STEAP-1 (anticuerpos desnudos y conjugados de anticuerpo-fármaco desvelados en este documento) se caracterizaron o pueden caracterizarse según procedimientos convencionales.

[0591] Ensayos basados en ELISA: El cribado de anticuerpos anti-STEAP-1 por ELISA se realiza del siguiente modo, con todas las incubaciones hechas a temperatura ambiente. Se recubrieron placas de prueba (Nunc Immunoplate) durante 2 horas con STEAP-1 purificada en tampón carbonato sódico 50 mM, pH 9,6, luego se bloquearon con 0,5 % de albúmina de suero bovino en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 30 minutos, luego se lavaron cuatro veces con PBS que contenía 0,05 % de Tween 20 (PBST). Se añaden sobrenadantes del anticuerpo de prueba y se incuban dos horas con agitación, luego se lavan cuatro veces con PBST. Las placas se revelan añadiendo 100 µl/pocillo de una disolución que contiene 10 mg de diclorhidrato de o-fenilendiamina (Sigma, N° P8287) y 10 µl de una disolución al 30 % de peróxido de hidrógeno en 25 ml de tampón fosfato-citrato, pH 5,0, e incubando durante 15 minutos. La reacción se detiene añadiendo 100 µl/pocillo de ácido sulfúrico 2,5 M. Los datos se obtienen leyendo las placas en un lector de placas de ELISA automatizado a una absorbancia de 490 nm.

Caracterización de la unión de anti-STEAP-1 por análisis de Scatchard:

[0592] La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por los análisis de Scatchard descritos en Munson y col., Anal. Biochem., 107: 220 (1980) usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica relevante. Véase también Scatchard, G., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660 (1947).

Ejemplo 3: Producción de Conjugados de anticuerpo anti-STEAP-1-fármaco

[0593] *Producción de ADC de anti-STEAP-1-auristatina* - Se produjeron ADC de anti-STEAP-1 conjugando anticuerpos anti-STEAP-1, variantes de la región estructural de 120.545 murino, 120 quimera, 120 injerto y humanizado 120 con los siguientes restos de fármaco-ligador: spp-DM1, smcc-DM1, MC-vc-PAB-MMAE; MC-vc-PAB-MMAF; MC-MMAE, MC-MMAF, vc-MMAE y vc-MMAF, cuyos restos de fármaco y ligador y procedimientos de unión se desvelan en este documento, además de en el documento WO 2004/010957 publicado el 5 de febrero de 2004, documento WO2006/034488 publicado el 9 de septiembre de 2005 y en Doronina, S.O. y col., Nature Biotechnol. 21: 778-784 (2003).

Antes de la conjugación, los anticuerpos se redujeron parcialmente con TCEP usando procedimientos convencionales según la metodología descrita en el documento WO 2004/010957. Los anticuerpos parcialmente reducidos se conjugaron con los restos de fármaco-ligador anteriores usando procedimientos convencionales según la metodología descrita en Doronina y col. (2003) Nat. Biotechnol. 21: 778-784 y el documento US 2005/0238649 A1. Brevemente, los anticuerpos parcialmente reducidos se combinaron con los restos de fármaco-ligador para permitir la conjugación de los restos a residuos de cisteína. Las reacciones de conjugación se extinguieron y los ADC se purificaron. La carga de fármaco (número promedio de restos de fármaco por anticuerpo) para cada ADC se determinó por HPLC. Como se usa en este documento, el componente de ligador-fármaco de un ADC, "-MC-vc-PAB-MMAE" o "-MC-vc-PAB-MMAF" se abrevia algunas veces "-vcMMAE" o "-vcMMAF" y el componente "-MC-MMAF" se abrevia algunas veces "MCMMAF" o "mcMMAF."

[0594] *Producción de ADC de anti-STEAP-1-maitansinoide* - Se produjeron ADC de anti-STEAP-1 conjugando anticuerpos anti-STEAP-1, variantes de la región estructural de 120.545 murino, 120 quimera, 120 injerto y humanizado 120 con el ligador-resto de fármaco -smcc-DM1. Tal conjugación puede realizarse según el procedimiento desvelado en el documento WO 2005/037992 para la conjugación del anticuerpo anti-HER2 Herceptin®.

Ejemplo 4: Ensayo de reducción del volumen de tumor *in vivo*

[0595] El siguiente protocolo se empleó para probar la eficacia de anticuerpos anti-STEAP-1 monoclonales conjugados con toxina o sin conjugar para la capacidad para reducir el volumen de tumor *in vivo* e *in vitro*.

[0596] Líneas celulares de mamífero y xenoinjertos de tumor humano: 293 es línea celular de riñón embrionario inmortalizado humano (referencia ATCC CRL1573), PC-3 es una línea celular de adenocarcinoma de próstata humano (referencia ATCC CRL1435) y LNCaP es una línea celular de carcinoma de próstata (ATCC CRL1740). Todas las células se cultivaron en 50/50 de medio Eagle con alto contenido de glucosa modificado por Dulbecco, Ham's F12 complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS), glutamina 2 mM, 1 % de penicilina-estreptomicina y se cultivaron a 37 °C en 5 % de CO₂. Las líneas celulares estables 293 y PC-3 se generaron por transfección (Fugene, Roche) con un vector accionado por citomegalovirus que codifica tanto STEAP-1 de longitud completa (LB50 y PS5.4 respectivamente) como un vector vacío y se seleccionan en 400 µg/ml de G418 (geneticina, Life Technologies). Los modelos de explantes de próstata humana, LuCAP 77 y LuCAP 35V, se obtuvieron de la Universidad de Seattle.

[0597] La expresión de STEAP-1 exógena y endógena sobre la superficie celular se demostró por análisis de inmunohistoquímica (IHC) y de FACS del siguiente modo. Se generaron anticuerpos anti-STEAP-1 de oveja y ratón (Agensys, Inc., Santa Monica, CA) contra un péptido del extremo amino intracelular de STEAP-1 (véase Hubert, R.S., Vivanco, I. y col., PNAS 25: 14523-14528 (1999)). Los anticuerpos monoclonales contra los dominios extracelulares de STEAP-1 (Agensys, Inc.) se generaron por inmunización de ratones con células 293T transitoriamente transfectadas con STEAP-1. Para el análisis de IHC, el anticuerpo anti-STEAP-1 de oveja primario se usó para la detección. Para análisis de FACS, las células se cultivaron al 90 % de confluencia y se extrajeron de las placas usando EDTA 2 mM en PBS. Las células se lavaron y se resuspendieron en tampón FACS (PBS con 1 % de BSA) y se incubaron durante 60 minutos con anticuerpos anti-STEAP-1 a temperatura ambiente, seguido de 60

minutos con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con ficoeritrina. El análisis se realizó en FACSscan (BD Biosciences). Para inmunofluorescencia, las células se cultivaron en portaobjetos de cámara durante la noche y luego se incubaron con anticuerpo primario a 37 °C durante 60 minutos. Las células se fijaron en paraformaldehído, se bloquearon en 1 % de BSA y se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con fluoresceína.

5

[0598] Los modelos de xenoinjerto de cáncer de próstata *in vivo* se usaron para probar la eficacia de ADC de anti-STEAP-1. Estos modelos incluyeron una línea celular humana LNCaP (ATCC CRL-1740 o Southern Research Institute, Birmingham, AL). Los modelos de explantes de próstata incluyeron LuCaP 77 y LuCaP35V (Universidad de Washington, Seattle, WA). Cada modelo de explantes de próstata se mantuvo por trasplante seriado en ratones beis SCID macho castrados (modelo independiente de andrógenos, LuCAP 35V) o sin castrar (modelo dependiente de andrógenos, LuCAP 77), de Charles River Lab. Los ratones sin castrar recibieron una pella de testosterona antes de la implantación, mientras que la castración se hizo al menos dos semanas antes de la implantación del tumor para permitir niveles de testosterona al punto más bajo. Cuando los ratones donantes tuvieron tumores de entre 800-1000 mm³, el tejido tumoral se extirpó asépticamente y se diseccionó en trozos de pequeño tamaño implantables (aproximadamente 20 mm³) para los animales en estudio. El tumor se coloca en una bolsa en el sitio de implantación y la piel se cierra usando grapas para heridas. Para el modelo de línea celular LNCaP, células LNCaP cultivadas *in vitro* se inyectaron subcutáneamente a 8-10 millones de células por ratón en 50 % de Matrigel en ratones beis SCID macho que habían recibido una pella de testosterona. Cuando el tamaño medio del tumor alcanzó 100-200 mm³, los animales se agruparon al azar en diez grupos de diez ratones cada uno y se les administró una única administración IV del ADC de anticuerpo de prueba o anticuerpo de control (desnudo o control). En algunos experimentos se administraron múltiples dosis de anticuerpo de prueba o de control (véanse las Figuras 8A, 9 y 10). En algunos experimentos se administraron una única dosis de anticuerpo de prueba o de control como se observa en las Figuras 8B y 11. Cuando el modelo de explantes de próstata fue LuCap 77, una pella de testosterona se implantó en los ratones aproximadamente 3-7 días antes del trasplante de tumor exógeno. Los tumores se midieron dos veces por semana durante 4 semanas, luego una vez o dos veces por semana durante el resto del estudio o una vez por semana durante el resto del estudio. Se consideró un volumen de tumor significativamente menor en animales de prueba con el tiempo para una indicación de eficacia. En algunos casos, el volumen de tumor disminuyó significativamente del volumen inicial y permaneció bajo durante el resto del estudio. Los resultados se representan en las Figuras 8-11.

30

Los conjugados de anti-STEAP-1-fármaco auristatina reducen el volumen de tumor de próstata *in vivo*

[0599] La administración de anti-STEAP-1 murino 120-MC-vc-PAB-MMAE a 3 mg/kg fue eficaz en un modelo de xenoinjerto de tumor de próstata (células LNCaP-Ner). Se usaron PBS y anti-gp120-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) como controles. Las dosis se administraron en los días 0, 7 y 14. Véase la Figura 8A.

35

[0600] Se mostró que fue eficaz la administración de anticuerpo anti-STEAP-1 humanizado 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg), 120v.24-MC-MMAF (6 mg/kg), 120v.24-MC-MMAF (12 mg/kg) y anti-STEAP-1 120 quimera-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) a ratones beis SCID trasplantados con tumor LNCaP-Ner (tratados con una pella de testosterona como se describe en este documento). Como controles se usaron vehículo, anti-ragweed-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) y anti-ragweed-MC-MMAF (12 mg/kg). Las dosis se administraron en los días indicados en la Figura 8. Los resultados se representan en la Figura 8B.

40

[0601] Se mostró que la administración de anticuerpo anti-STEAP-1 120 quimera-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) y anti-STEAP-1 120 quimera-MC-MMAF (6 mg/kg) fue eficaz en un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata de ratones beis SCID trasplantados con células LNCaP. Se administraron tres dosis en aproximadamente los días 15, 25 y 30 a 3 mg/kg (anti-STEAP-vcMMAE) o 6 mg/kg (anti-STEAP-mcMMAF) a los ratones. Se usaron anti-ragweed-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) y anti-ragweed-MC-MMAF (6 mg/kg) de control. Véase la Figura 9.

45

[0602] Se mostró que la administración de anticuerpo anti-STEAP-1 humanizado 120 quimera-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) fue eficaz en un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata de ratones macho beis SCID (dependientes de andrógenos) trasplantados con células LuCap 77. Los controles fueron vehículo y anti-ragweed-MC-vc-PAB-MMAE. Se administraron tres dosis a 3 mg/kg de anticuerpos de prueba y de control. Véase la Figura 10.

50

55

[0603] Se mostró que la administración de anticuerpo anti-STEAP-1 humanizado 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE a 3 mg/kg, anticuerpo anti-STEAP-1 120v.24-MC-MMAF a 6 mg/kg y 12 mg/kg a ratones beis SCID castrados trasplantados con tumor de próstata LuCap35V fue eficaz con respecto a los controles. La carga de fármaco fue 3,1 por anticuerpo. Los anticuerpos de control fueron anti-ragweed-MC-MMAF administrado a 12 mg/kg y anti-gp 120-

MC-vc-PAB-MMAE administrado a 6 mg/kg. Véase la Figura 11.

Los conjugados de anti-STEAP-1-fármaco auristatina reducen el volumen de tumor de próstata in vitro

- 5 **[0604]** Se realizaron ensayos de destrucción de células in vitro para evaluar la eficacia de conjugados de anti-STEAP-1-fármaco para inhibir el crecimiento y/o la destrucción de células que expresan STEAP-1. Brevemente, células que expresan STEAP-1 se sembraron a aproximadamente 2.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se trataron 24 horas después por duplicado con conjugado de anticuerpo-fármaco. La placas se incubaron durante 5-7 días a 37 °C y se revelaron con el kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Las células de prueba incluyeron PS5.4 (células PC3 que expresan STEAP-1 exógena), LB50 (células 293 que expresan STEAP-1 exógena), células PC3 transfectadas con vector solo, células 293 transfectadas con vector solo y células LNCaP que expresan STEAP-1 endógena. Los conjugados de anticuerpo-fármaco probados incluyeron anticuerpo-MC-MMAF de control, anticuerpo-vc-MMAE de control, anticuerpo anti-STEAP-1 120 quimera-vc-MMAE, anticuerpo anti-STEAP-1 120 quimera-MC-MMAF (dos lotes diferentes de material) y anticuerpo anti-STEAP-1 quimera-vc-MMAF. Los resultados se muestran en la Figura 14A-E.

Ejemplo 5: Preparación de anticuerpos anti-STEAP-1 manipulados con cisteína para la conjugación mediante reducción y reoxidación

- 20 **[0605]** Anticuerpos monoclonales anti-STEAP-1 manipulados con cisteína (tioMab) de longitud completa expresados en células CHO se disuelven en borato de sodio 500 mM y cloruro sódico 500 mM a aproximadamente pH 8,0 y se reducen con un exceso de aproximadamente 50-100 veces de TCEP 1 mM (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina) (Getz y col. (1999) Anal. Biochem. Vol 273: 73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) durante aproximadamente 1-2 h a 37 °C. El tioMab reducido se diluye y se carga sobre una columna HiTrap S en acetato sódico 10 mM, pH 5, y se eluye con PBS que contienen cloruro sódico 0,3 M. El tioMab reducido eluido se trata con ácido deshidroascórbico 2 mM (dhAA) a pH 7 durante 3 horas, o sulfato de cobre (CuSO₄) acuoso 2 mM a temperatura ambiente durante la noche. También puede ser eficaz oxidación con aire ambiente. El tampón se intercambia por elución sobre resina Sephadex G25 y se eluye con PBS con DTPA 1 mM. El valor de tio/Ab se comprueba determinando la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la disolución y la concentración de tiol mediante reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm.

Ejemplo 6: Preparación de conjugados de anticuerpo anti-STEAP-1 manipulado con cisteína-fármaco por conjugación de anticuerpos anti-STEAP-1 manipulados con cisteína y productos intermedios de fármaco-ligador

- 35 **[0606]** Después de los procedimientos de reducción y reoxidación del Ejemplo 5, el anticuerpo anti-STEAP-1 manipulado con cisteína se disuelve en tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se extingue sobre hielo. Aproximadamente 1,5 equivalentes molares con respecto a cisteínas manipuladas por anticuerpo de un producto intermedio de fármaco auristatina-ligador, tal como MC-MMAE (maleimidocaproil-monometil auristatina E), MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE o MC-val-cit-PAB-MMAF, con un grupo funcional reactivo con tiol tal como maleimido, se disuelven en DMSO, se diluyen en acetonitrilo y agua y se añaden al anticuerpo reoxidado extinguido en PBS. Después de aproximadamente una hora se añade un exceso de maleimida para extinguir la reacción y tapar cualquier grupo tiol del anticuerpo sin reaccionar. La mezcla de reacción se concentra por ultrafiltración centrífuga y el conjugado de anticuerpo anti-STEAP-1 manipulado con cisteína-fármaco se purifica y se desala por elución a través de resina G25 en PBS, se filtra mediante filtros de 0,2 µm bajo condiciones estériles y se congela para el almacenamiento.

- 50 **[0607]** Mediante el procedimiento anterior se prepararon los siguientes conjugados de anticuerpo anti-STEAP-1 manipulados con cisteína-fármaco (en los que la numeración para las variantes está normalizada (la numeración de Kabat para la cadena ligera y la numeración EU para la cadena pesada), como se proporciona en este documento y en la Figura 17):

55 tio-120-MC-MMAF humano por conjugación de cadena ligera V205C tio hu 120 y MC-MMAF;

tio-MC-MMAF humano por conjugación de cadena pesada A118C tio hu 120 y MC-MMAF;

tio-120-MC-val-cit-PAB-MMAE humano por conjugación de cadena ligera V205C tio hu 120 y MC-val-cit-PAB-MMAE;
y

tio-120-MC-val-cit-PAB-MMAE humano por conjugación de cadena pesada A118C tio hu 120 y MC-val-cit-PAB-MMAE.

5 **Ejemplo 7: Caracterización de anticuerpos anti-STEAP-1 manipulados con cisteína**

[0608] Los conjugados de anticuerpo anti-STEAP-1 manipulados con cisteína-fármaco (TDC) preparados como se ha descrito anteriormente se ensayaron para confirmar que retuvieron la actividad del anticuerpo parental *in vitro*. Los TDC anti-STEAP-1 tio-120-vc-PAB-MMAE humano (LCV205C) (abreviado huSteap1 TDC (L205C) vcE) y 10 tio-120-vc-PAB-MMAE humano (HCA 118C) (abreviado huSteap1 TDC (HCA118C) vcE) se evaluaron para la unión a STEAP-1 por análisis de FACS en células que expresan (293 STEAP-1 NT LB50) y células que no expresan (vector S408 de 293) STEAP-1. El término "2º sólo" se refiere al anticuerpo secundario en el análisis de FACS. El control de TDC (vcE) y el control estándar de ADC (vcE) son los conjugados de anticuerpo de control tio y no tio vc-PAB-MMAE-fármaco, respectivamente. El ADC de huSteap1 (std) es un conjugado de fármaco vc-PAB-MMAE 15 derivado del anticuerpo anti-STEAP-1 humano parental. Como se muestra, los TDC produjeron desplazamientos de FACS similares a los del ADC de huSteap1 parental.

[0609] También se realizaron ensayos de destrucción de células *in vitro* para evaluar la eficacia de los conjugados de anticuerpo anti-STEAP-1 manipulados con cisteína-fármaco para inhibir el crecimiento y/o destruir 20 células que expresan STEAP-1. Brevemente, células que expresan STEAP-1 se sembraron a aproximadamente 2.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se trataron 24 horas después por duplicado con conjugado de anticuerpo-fármaco. La placas se incubaron durante 5-7 días a 37 °C y se revelaron con el kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Las células de prueba incluyeron PS5.4 (células PC3 que expresan STEAP-1 exógena), LB50 (células 293 que expresan STEAP-1 exógena) y células 25 LNCaP que expresan STEAK-1 endógena. Los conjugados de anticuerpo-fármaco probados incluyeron anticuerpo-vc-MMAE de control (ADC std control (vcE)), tio-anticuerpo-vc-MMAE de control (TDC control (vcE)), el TDC anti-STEAP-1 tio-120-vc-PAB-MMAE humano (LCV205C) (abreviado huSteap1 TDC (L205C) vcE) y tio-120-vc-PAB-MMAE humano (HCA1 18C) (abreviado huSteap1 TDC (HCA118C) vcE) y huSteap1 ADC (std), un conjugado de fármaco de vc-PAB-MMAE derivado del anticuerpo anti-STEAP-1 humano parental. Como se muestra en las Figuras 30 19A-C, los TCD anti-STEAP-1 retienen la actividad del ADC parental *in vitro*.

Ejemplo 8: Ensayos de reducción del volumen de tumor *in vivo* para conjugados de anticuerpo anti-STEAP-1 manipulado con cisteína-fármaco

35 **[0610]** Se usaron modelos de xenoinjerto de cáncer de próstata *in vivo* para probar la eficacia de ADC de anti-STEAP-1 manipulado con cisteína. Estos modelos y los protocolos de prueba empleados se corresponden con aquellos descritos en el Ejemplo 4.

[0611] Se mostró que fue eficaz la administración de TDC anti-STEAP-1 tio-120-vc-PAB-MMAE humano 40 (HCA118C) (abreviado huSteap1 HC TDC vcE) (3 mg/kg) a ratones beis SCID trasplantados con tumor LNCap-Ner (tratados con una pella de testosterona como se describe en este documento). Como controles se usaron vehículo (PBS), anticuerpo-vc-MMAE de control (ADC std ctrl vcE) y tio-anticuerpo-vc-MMAE de control (TDC HC ctrl vcE). El efecto del TDC anti-STEAP-1 también se comparó con el anticuerpo anti-STEAP humano 120-MC-vc-PAB-MMAE (hu Steap1 std ADC vcE) como control positivo. Una dosis única se administró en el día 0. Todos los anticuerpos se 45 administraron a 3 mg/kg. Los resultados se representan en la Figura 20.

[0612] La Figura 21 muestra que la administración del TDC anti-STEAP-1 tio-120-vc-PAB-MMAE humano (HCA 118C) (abreviado huSteap 1 HC TDC vcE) a 3 mg/kg y TDC anti-STEAP-1 tio-120-MC-MMAF humano (HCA 118C) (abreviado huSteap1 HC TDC mcF) a 1, 3 o 6 mg/kg fue eficaz en un modelo de xenoinjerto de cáncer de 50 próstata de ratones beis SCID trasplantados con células LNCaP. Se administraron dosis únicas en el día 0 a 0,3, 1 o 3 mg/kg (huSteap1 HC TDC vcE) o 1, 3 o 6 mg/kg (huSteap1 HC TDC mcF) a los ratones. Como controles se usaron vehículo (PBS), anticuerpo-vc-MMAE de control (ADC std ctrl vcE) y tio-anticuerpo-vc-MMAE de control (TDC HC ctrl vcE).

55 **[0613]** La Figura 22 muestra que la administración del TDC anti-STEAP-1 tio-120-vc-PAB-MMAE humano (HCA118C) (abreviado huSteap1 HC TDC vcE) a 3 mg/kg y TDC anti-STEAP-1 tio-120-MC-MMAF humano (HCA1 18C) (abreviado huSteap1 HC TDC mcF) a 3 o 6 mg/kg mostró ser eficaz en un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata de ratones macho beis SCID (dependiente de andrógenos) trasplantados con células LuCap 35V. Se administraron dosis únicas en el día 0 a 0,3, 1 o 3 mg/kg (huSteap1 HC TDC vcE) o 1, 3 o 6 mg/kg (huSteap 1 HC

TDC mcF) a los ratones. Como controles se usaron vehículo (PBS), anticuerpo-vc-MMAE de control (ADC std ctrl vcE) y tio-anticuerpo-vc-MMAE de control (TDC HC ctrl vcE).

Ejemplo 9: Preparación y caracterización del anticuerpo anti-STEAP-1 SGIV a partir de la variante 24 del anticuerpo 120

[0614] Se preparó otra variante del anticuerpo anti-STEAP-1 LC en el que las regiones de la cadena ligera y estructural se modificaron adicionalmente para obtener niveles de expresión del anticuerpo mejoradas.

10 **Materiales y procedimientos**

[0615] Los números de residuos son según Kabat (Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Se usan abreviaturas de aminoácidos de una sola letra. Las degeneraciones de ADN se representan usando el código IUB (N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B = C/G/T, H = A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W = A/T, Y = C/T).

[0616] *Preparación de una variante de la cadena ligera revisada:* Se generó y se caracterizó una variante del anticuerpo 120.v24, designada "Simmons IV" o simplemente "SGIV". La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SGIV se proporciona en SEQ ID NO: 90. Esta secuencia, alineada con las regiones correspondientes del anticuerpo mu 120 (SEQ ID NO: 5) y el anticuerpo 120.v24 (SEQ ID NO: 91), se muestra en la Figura 23.

[0617] *Evaluación de la variante SGIV en comparación con la variante 120.v24* – Los anticuerpos SGIV y 120.v24, expresados como IgG, se evaluaron por análisis de FACS usando las líneas celulares positivas para Steap 1 establemente transformadas 293 Steap1 NT LB48, 293 Steap1 NT LB50 y 293 Steap1 NT LB53, además de en células LNCaP, que expresan STEAP-1 endógena (Figura 28). Las células se prepararon como se describe en el Ejemplo 1. Cada IgG se añadió a 5 µg/ml sobre hielo durante 1 hora. Las muestras se lavaron dos veces con tampón FACS por centrifugación y se añadió una dilución 1: 200 de conjugado anti-PE humana (fragmento Fcγ de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugada con R-ficoeritrina, Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos. Las muestras se lavaron de nuevo dos veces con tampón FACS por centrifugación y las muestras se analizaron por FACS.

[0618] *Determinación por afinidad basada en Scatchard de la unión de SGIV y 120.v24 a STEAP-1* - Las afinidades de unión de los anticuerpos 120.v24 y Simmons IV ("SGIV") por STEAP-1 se determinaron usando análisis de Scatchard según procedimientos convencionales. Se purificó IgG con cromatografía de afinidad por proteína G. Las determinaciones de afinidad se realizaron por análisis de Scatchard en células PC-3-PS5.4, 293-LB50 y LNCaP-BR por duplicado. Las representaciones de Scatchard de 120.v24 y SGIV en células LNCaP BR y células 293.LB50 se muestran en las Figuras 25 y 26, respectivamente. En la Figura 27 se muestra una tabla que compara las afinidades de unión promedio para mu 1789, mu 120, quimera de Fc, 120.v24 humanizado, tio-120.v24 y tio-SGIV en células PC-3-PS5.4, 293-LB50 y LNCaP-BR, además de en células 293 que expresan transitoriamente STEAP-1.

[0619] *Mutagénesis dirigida a sitio de SGIV y 120.v24:* Las variantes de los anticuerpos SGIV y 120.v24 se prepararon usando protocolos de mutagénesis convencionales como se ha descrito anteriormente. La primera clase de variantes resultó de mutagénesis dirigida a sitio por la cual residuos particulares de Simmons IV ("SGIV") se sustituyeron con el residuo correspondiente de 120.v24 para mejorar adicionalmente la afinidad de unión. Las variantes específicas producidas, como se muestra en la Figura 24, fueron del siguiente modo:

(1) LS.VLVH1 en la que los residuos 42 ("Q") y 43 ("P") se modificaron a "K" y "A" respectivamente (SEQ ID NO: 92)

50 (2) LS.VLVH2 en la que el residuo 3 ("V") se modificaron a "Q", los residuos 42 ("Q") y 43 ("P") se modificaron a "K" y "A" respectivamente y el residuo 85 ("V") se modificó a "T" (SEQ ID NO: 93)

(3) LS.Q en la que el residuo 3 ("V") se modificó a "Q" (SEQ ID NO: 94)

55 (4) LS.CH1 en la que el residuo 15 ("L") se modificó a "V" y el residuo 83 ("V") se modificó a "F" (SEQ ID NO: 95)

[0620] Se generó una segunda clase de variantes mediante mutagénesis dirigida a sitio en la que los residuos particulares de 120.v24 se sustituyeron con el residuo correspondiente de Simmons IV (SGIV) en un intento por mejorar los niveles de expresión del anticuerpo. Las variantes específicas, como se muestra en la Figura 24, fueron

del siguiente modo:

- (1) ED.FW1 en la que el residuo 3 ("Q") se modificó a "V"; el residuo 9 ("S") se modificó a "D"; el residuo 12 ("S") se modificó a "A"; el residuo 13 ("A") se modificó a "V"; el residuo 15 ("V") se modificó a "L"; el residuo 17 ("D") se modificó a "E"; el residuo 19 ("V") se modificó a "A"; y el residuo 22 ("T") se modificó a "N" (SEQ ID NO: 96)
- (2) ED.FW2 en la que los residuos 42 ("K") y 43 ("A") de 120.v24 se modificaron a "Q" y "P" respectivamente (SEQ ID NO: 97)
- 10 (3) ED.FW3 en la que el residuo 60 ("S") se modificó a "D"; el residuo 80 ("P") se modificó a "A"; el residuo 83 ("F") se modificó a "V"; y el residuo 85 ("T") se modificó a "V" (SEQ ID NO: 98)
- (4) ED.all en la que en el que residuo 3 ("Q") se modificó a "V"; el residuo 9 ("S") se modificó a "D"; el residuo 12 ("S") se modificó a "A"; el residuo 13 ("A") se modificó a "V"; el residuo 15 ("V") se modificó a "L"; el residuo 17 ("D") se modificó a "E"; el residuo 19 ("V") se modificó a "A"; el residuo 22 ("T") se modificó a "N"; los residuos 42 ("K") y 43 ("A") de 120.v24 se modificaron a "Q" y "P"; el residuo 60 ("S") se modificó a "D"; el residuo 80 ("P") se modificó a "A"; el residuo 83 ("F") se modificó a "V"; y el residuo 85 ("T") se modificó a "V" (SEQ ID NO: 99)
- 15 (5) ED.Pro en la que el residuo 43 ("A") se modificó a "P" y el residuo 80 ("P") se modificó a "A" (SEQ ID NO: 100)
- 20 (6) ED.pl en la que el residuo 9 ("S") se modificó a "D"; el residuo 42 ("K") se modificó a "Q" y el residuo 60 ("S") se modificó a "D" (SEQ ID NO: 101)

Resultados y discusión

- 25 **[0621]** *Preparación del anticuerpo SGIV* - Las secuencias de la región variable del anticuerpo anti-STEAP-1 versión 24 (120.v24) se muestran en las Figuras 23 y 24 (SEQ ID NO: 91). Usando mutagénesis dirigida a sitio, otra variante llamada "Simmons IV" o simplemente "SGIV" se preparó usando protocolos de mutagénesis convencionales como se ha descrito anteriormente. Las Figuras 23 y 24 muestran la secuencia de la cadena ligera de SGIV en
- 30 alineamiento con la del anticuerpo mu 120 y 120.v24. Los títulos de diversas recogidas de anticuerpo SGIV se muestran en la Figura 29.
- [0622]** *Comparación de la unión de SGIV y 120.v24 a STEAP-1 usando FACs* - La capacidad de ambos anticuerpos, 120.v24 y SGIV, para unirse a STEAP-1 expresada sobre la superficie celular se midió usando FACs.
- 35 La unión del anticuerpo a líneas celulares que expresan tanto STEAP-1 exógena (293 STEAP-1 LB48, 293 STEAP-1 LB50 y 293 STEAP-1 LB53) como STEAP-1 endógena (LNCaP.Br) se midió por duplicado; los resultados se resumen en la Figura 28. Como se muestra en la Figura 28, ambos anticuerpos pudieron unirse a STEAP-1 en las cuatro líneas celulares.
- 40 **[0623]** *Afinidad de unión del anticuerpo SGIV a STEAP-1 y comparación con 120.v24* - Las afinidades de unión de SGIV y 120.v24 a STEAP-1 se examinaron usando análisis de Scatchard. Las representaciones de Scatchard de 120.v24 y SGIV en células LNCaP BR y células 293.LB 50 se muestran en las Figuras 25 y 26 respectivamente. Una tabla que compara las afinidades de unión promedio para anticuerpos mu 1789, mu 120, quimera de Fc, 120.v24 humanizado, tio-120.v24 y tio-SGIV en células PC-3-PS5.4, 293-LB50 y LNCaP-BR, además
- 45 de en células 293 que expresan transitoriamente STEAP-1, se muestra en la Figura 27. Los resultados indican que la afinidad de unión del anticuerpo 120.v24 en células 293-LB50 y LNCaP.BR es aproximadamente 1,5 veces la de la variante SGIV.

LISTA DE SECUENCIAS

50

[0624]

> 110> Genentech, Inc.
DENNIS, Mark S.
55 RUBINFELD, Bonnee
POLAKIS, Paul
JAKOBOVITS, Aya

> 120> ANTICUERPOS E INMUNOCONJUGADOS Y USOS PARA LOS MISMOS

> 130> 39766-0160-R4.PCT

> 140> Todavía sin asignar

5 > 141> Ajunto

> 150> 60/863.295

> 151> 27/10/2006

10 > 150> 60/868.707

> 151> 02/12/2006

> 150> 60/921.300

> 151> 30/03/2007

15 > 150> 60/937.857

> 151> 29/06/2007

> 160> 89

20 > 170> FastSEQ for Windows versión 4.0

> 210> 1

> 211> 340

25 > 212> PRT

> 213> Homo sapiens

> 400> 1

Met	Glu	Ser	Arg	Lys	Asp	Ile	Thr	Asn	Gln	Glu	Glu	Leu	Trp	Lys	Met
1				5					10					15	
Lys	Pro	Arg	Arg	Asn	Leu	Glu	Glu	Asp	Asp	Tyr	Leu	His	Lys	Asp	Thr
			20					25					30		
Gly	Glu	Thr	Ser	Met	Leu	Lys	Arg	Pro	Val	Leu	Leu	His	Leu	His	Gln
		35					40					45			
Thr	Ala	His	Ala	Asp	Glu	Phe	Asp	Cys	Pro	Ser	Glu	Leu	Gln	His	Thr
	50					55					60				
Gln	Glu	Leu	Phe	Pro	Gln	Trp	His	Leu	Pro	Ile	Lys	Ile	Ala	Ala	Ile
65					70					75					80
Ile	Ala	Ser	Leu	Thr	Phe	Leu	Tyr	Thr	Leu	Leu	Arg	Glu	Val	Ile	His
				85					90					95	
Pro	Leu	Ala	Thr	Ser	His	Gln	Gln	Tyr	Phe	Tyr	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu
			100					105					110		
Val	Ile	Asn	Lys	Val	Leu	Pro	Met	Val	Ser	Ile	Thr	Leu	Leu	Ala	Leu
		115					120					125			
Val	Tyr	Leu	Pro	Gly	Val	Ile	Ala	Ala	Ile	Val	Gln	Leu	His	Asn	Gly
	130					135					140				
r	Lys	Tyr	Lys	Lys	Phe	Pro	His	Trp	Leu	Asp	Lys	Trp	Met	Leu	Thr

145						150					155				160
Arg	Lys	Gln	Phe	Gly	Leu	Leu	Ser	Phe	Phe	Phe	Ala	Val	Leu	His	Ala
				165					170					175	
Ile	Tyr	Ser	Leu	Ser	Tyr	Pro	Met	Arg	Arg	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Lys	Leu
			180					185					190		
Leu	Asn	Trp	Ala	Tyr	Gln	Gln	Val	Gln	Gln	Asn	Lys	Glu	Asp	Ala	Trp
		195					200					205			
Ile	Glu	His	Asp	Val	Trp	Arg	Met	Glu	Ile	Tyr	Val	Ser	Leu	Gly	Ile
	210					215					220				
Val	Gly	Leu	Ala	Ile	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Val	Thr	Ser	Ile	Pro	Ser
225					230					235					240
Val	Ser	Asp	Ser	Leu	Thr	Trp	Arg	Glu	Phe	His	Tyr	Ile	Gln	Ser	Lys
				245					250					255	
Leu	Gly	Ile	Val	Ser	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Ile	His	Ala	Leu	Ile	Phe
			260					265					270		
Ala	Trp	Asn	Lys	Trp	Ile	Asp	Ile	Lys	Gln	Phe	Val	Trp	Tyr	Thr	Pro
		275				280						285			
Pro	Thr	Phe	Met	Ile	Ala	Val	Phe	Leu	Pro	Ile	Val	Val	Leu	Ile	Phe
	290					295					300				
Lys	Ser	Ile	Leu	Phe	Leu	Pro	Cys	Leu	Arg	Lys	Lys	Ile	Leu	Lys	Ile
305					310					315					320
Arg	His	Gly	Trp	Glu	Asp	Val	Thr	Lys	Ile	Asn	Lys	Thr	Glu	Ile	Cys
				325					330					335	
Ser	Gln	Leu	Asn												
			340												

> 210> 2

> 211> 340
 > 212> PRT
 > 213> Mus musculus

5 > 400> 2

Met	Glu	Ile	Ser	Asp	Asp	Val	Thr	Asn	Pro	Glu	Gln	Leu	Trp	Lys	Met
1				5					10					15	
Lys	Pro	Lys	Gly	Asn	Leu	Glu	Asp	Asp	Ser	Tyr	Ser	Thr	Lys	Asp	Ser
			20					25					30		
Gly	Glu	Thr	Ser	Met	Leu	Lys	Arg	Pro	Gly	Leu	Ser	His	Leu	Gln	His
		35					40					45			
Ala	Val	His	Val	Asp	Ala	Phe	Asp	Cys	Pro	Ser	Glu	Leu	Gln	His	Thr
	50					55					60				
Gln	Glu	Phe	Phe	Pro	Asn	Trp	Arg	Leu	Pro	Val	Lys	Val	Ala	Ala	Ile
65					70					75					80
Ile	Ser	Ser	Leu	Thr	Phe	Leu	Tyr	Thr	Leu	Leu	Arg	Glu	Ile	Ile	Tyr
				85					90					95	
Pro	Leu	Val	Thr	Ser	Arg	Glu	Gln	Tyr	Phe	Tyr	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu
			100					105						110	
Val	Ile	Asn	Lys	Val	Leu	Pro	Met	Val	Ala	Ile	Thr	Leu	Leu	Ala	Leu
		115					120					125			
Val	Tyr	Leu	Pro	Gly	Glu	Leu	Ala	Ala	Val	Val	Gln	Leu	Arg	Asn	Gly
	130					135					140				
Thr	Lys	Tyr	Lys	Lys	Phe	Pro	Pro	Trp	Leu	Asp	Arg	Trp	Met	Leu	Ala
145					150					155					160
Lys	Lys	Gln	Phe	Gly	Leu	Leu	Ser	Phe	Phe	Phe	Ala	Val	Leu	His	Ala
				165					170					175	
Val	Tyr	Ser	Leu	Ser	Tyr	Pro	Met	Arg	Arg	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Lys	Leu
			180					185					190		
Leu	Asn	Trp	Ala	Tyr	Lys	Gln	Val	Gln	Gln	Asn	Lys	Glu	Asp	Ala	Trp
		195					200					205			
1	Glu	His	Asp	Val	Trp	Arg	Met	Glu	Ile	Tyr	Val	Ser	Leu	Gly	Ile

	210						215							220	
Val	Gly	Leu	Ala	Ile	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Val	Thr	Ser	Ile	Pro	Ser
225					230					235					240
Val	Ser	Asp	Ser	Leu	Thr	Trp	Arg	Glu	Phe	His	Tyr	Ile	Gln	Ser	Lys
				245					250					255	
Leu	Gly	Ile	Val	Ser	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Val	His	Ala	Leu	Val	Phe
			260					265					270		
Ala	Trp	Asn	Lys	Trp	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Phe	Val	Trp	Tyr	Met	Pro
		275					280					285			
Pro	Thr	Phe	Met	Ile	Ala	Val	Phe	Leu	Pro	Thr	Leu	Val	Leu	Ile	Cys
	290					295					300				
Lys	Ile	Ala	Leu	Cys	Leu	Pro	Cys	Leu	Arg	Lys	Lys	Ile	Leu	Lys	Ile
305					310					315					320
Arg	Cys	Gly	Trp	Glu	Asp	Val	Ser	Lys	Ile	Asn	Arg	Thr	Glu	Met	Ala
				325					330					335	
Ser	Arg	Leu	Asn												
			340												

- > 210> 3
- > 211> 340
- > 212> PRT
- 5 > 213> Macaca fascicularis
- > 400> 3

```

Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Glu Glu Glu Leu Trp Lys Met
 1      5      10
Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
      20      25      30
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
      35      40      45
Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
      50      55      60
Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65      70      75      80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
      85      90      95
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
      100      105      110
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
      115      120      125
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
130      135      140
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
145      150      155      160
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
      165      170      175
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
      180      185      190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
      195      200      205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
210      215      220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225      230      235      240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys
      245      250      255
Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Ile His Ala Leu Ile Phe
      260      265      270
a Trp Asn Lys Trp Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp Tyr Thr Pro
      275      280      285
Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Val Val Val Leu Ile Phe
290      295      300
Lys Ser Ile Leu Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile
305      310      315      320
Arg His Gly Trp Glu Asp Ile Thr Lys Ile Asn Lys Met Glu Ile Ser
      325      330      335
Ser Gln Leu Asn
      340

```

> 210> 4
 > 211> 108
 > 212> PRT
 5 > 213> Homo sapiens
 > 400> 4

```

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

10 > 210> 5
 > 211> 114
 > 212> PRT
 > 213> Mus musculus
 15 > 400> 5

```

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
  1          5          10          15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
  20          25          30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
  35          40          45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
  50          55          60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
  65          70          75          80
Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
  85          90          95
Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
  100          105          110
Lys Arg
    
```

20 > 210> 6
 > 211> 114
 > 212> PRT
 > 213> Homo sapiens
 25 > 400> 6

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
 20           25           30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35           40           45
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50           55           60
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65           70           75           80
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85           90           95
Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100          105          110
Lys Arg

```

- > 210> 7
- > 211> 113
- 5 > 212> PRT
- > 213> Homo sapiens
- > 400> 7

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20           25           30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35           40           45
Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85           90           95
Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100          105          110
Ser

```

- 10 > 210> 8
- > 211> 125
- > 212> PRT
- 15 > 213> Mus musculus
- > 400> 8

```

Asp Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1          5          10          15
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
      20          25          30
Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
      35          40          45
Met Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50          55          60
s Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe

65          70          75          80
Leu Gln Leu Ile Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
      85          90          95
Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
      100          105          110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ala Ser Ala
      115          120          125

```

- > 210> 9
- > 211> 124
- 5 > 212> PRT
- > 213> Homo sapiens

- > 400> 9

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
      20          25          30
Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
      35          40          45
Val Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50          55          60
Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85          90          95
Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
      100          105          110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115          120

```

- 10 > 210> 10
- > 211> 124
- > 212> PRT
- 15 > 213> Homo sapiens

- > 400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

> 210> 11
 > 211> 17
 5 > 212> PRT
 > 213> Homo sapiens

> 400> 11

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 10 Ala

> 210> 12
 > 211> 7
 > 212> PRT
 15 > 213> Homo sapiens

> 400> 12

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

20 > 210> 13
 > 211> 9
 > 212> PRT
 > 213> Homo sapiens

25 > 400> 13

Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr
 1 5

30 > 210> 14
 > 211> 11
 > 212> PRT
 > 213> Homo sapiens

35 > 400> 14

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
 1 5 10

> 210> 15
 > 211> 17
 > 212> PRT
 > 213> Homo sapiens

5

> 400> 15

Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15
Ser

10 > 210> 16
 > 211> 15
 > 212> PRT
 > 213> Homo sapiens

15 > 400> 16

Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

20 > 210> 17
 > 211> 23
 > 212> PRT
 > 213> Homo sapiens

> 400> 17

25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

30 > 210> 18
 > 211> 15
 > 212> PRT
 > 213> Homo sapiens

> 400> 18

35

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

40 > 210> 19
 > 211> 32
 > 212> PRT
 > 213> Homo sapiens

> 400> 19

45

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

> 210> 20
 > 211> 11
 > 212> PRT

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser
20 25

- > 210> 26
- > 211> 30
- > 212> PRT
- 5 > 213> Homo Sapiens
- > 400> 26

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

- 10 > 210> 27
- > 211> 14
- > 212> PRT
- > 213> Homo Sapiens
- 15 > 400> 27

Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

- 20 > 210> 28
- > 211> 32
- > 212> PRT
- > 213> Homo Sapiens
- 25 > 400> 28

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

- 30 > 210> 29
- > 211> 11
- > 212> PRT
- > 213> Homo Sapiens
- 35 > 400> 29

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

- 40 > 210> 30
- > 211> 25
- > 212> PRT
- > 213> Homo Sapiens
- 45 > 400> 30

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25

> 210> 31
 > 211> 14
 5 > 212> PRT
 > 213> Homo Sapiens

> 400> 31

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

> 210> 32
 > 211> 31
 > 212> PRT
 15 > 213> Homo Sapiens

> 400> 32

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 20 25 30

> 210> 33
 > 211> 30
 > 212> PRT
 20 > 213> Homo Sapiens

> 400> 33

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

30 > 210> 34
 > 211> 30
 > 212> PRT
 > 213> Homo Sapiens

35 > 400> 34

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
 20 25 30

> 210> 35
 40 > 211> 14
 > 212> PRT
 > 213> Homo Sapiens

> 400> 35

45

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

- > 210> 36
- > 211> 32
- 5 > 212> PRT
- > 213> Homo Sapiens

> 400> 36

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

10

- > 210> 37
- > 211> 25
- > 212> PRT
- 15 > 213> Homo Sapiens

> 400> 37

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

20

- > 210> 38
- > 211> 13
- > 212> PRT
- > 213> Homo Sapiens

25

> 400> 38

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10

- 30 > 210> 39
- > 211> 31
- > 212> PRT
- > 213> Homo Sapiens

35 > 400> 39

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

- 40 > 210> 40
- > 211> 30
- > 212> PRT
- > 213> Homo Sapiens

45 > 400> 40

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

> 210> 41
 > 211> 30
 5 > 212> PRT
 > 213> Homo Sapiens

> 400> 41

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

> 210> 42
 > 211> 14
 > 212> PRT
 15 > 213> Homo Sapiens

> 400> 42

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

20 > 210> 43
 > 211> 32
 > 212> PRT
 > 213> Homo Sapiens

25 > 400> 43

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

30 > 210> 44
 > 211> 25
 > 212> PRT
 > 213> Homo Sapiens

35 > 400> 44

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

40 > 210> 45
 > 211> 13
 > 212> PRT
 > 213> Homo Sapiens

45 > 400> 45

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

> 210> 46
 > 211> 31
 5 > 212> PRT
 > 213> Homo Sapiens

> 400> 46

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 10 **20 25 30**

> 210> 47
 > 211> 30
 > 212> PRT
 15 > 213> Homo Sapiens

> 400> 47

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 **25 30**

> 210> 48
 > 211> 30
 > 212> PRT
 > 213> Homo Sapiens
 25 > 400> 48

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

> 210> 49
 > 211> 32
 > 212> PRT
 > 213> Homo Sapiens

35 > 400> 49

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

> 210> 50
 40 > 211> 31
 > 212> PRT
 > 213> Homo Sapiens

> 400> 50

45

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

- > 210> 51
- > 211> 32
- > 212> PRT
- 5 > 213> Homo Sapiens
- > 400> 51

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

- 10 > 210> 52
- > 211> 31
- > 212> PRT
- > 213> Homo Sapiens

- 15 > 400> 52

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

- 20 > 210> 53
- > 211> 30
- > 212> PRT
- > 213> Homo Sapiens

- > 400> 53

25 **Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln**
1 5 10 15
Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

- 30 > 210> 54
- > 211> 23
- > 212> PRT
- > 213> Homo Sapiens

- > 400> 54

35 **Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly**
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

- 40 > 210> 55
- > 211> 15
- > 212> PRT
- > 213> Homo Sapiens

- > 400> 55

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

- > 210> 56
- > 211> 32
- 5 > 212> PRT
- > 213> Homo Sapiens
- > 400> 56

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

- > 210> 57
- > 211> 10
- > 212> PRT
- 15 > 213> Homo Sapiens
- > 400> 57

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

- > 210> 58
- > 211> 14
- > 212> PRT
- 25 > 213> Homo Sapiens
- > 400> 58

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
1 5 10

- > 210> 59
- > 211> 15
- > 212> PRT
- 30 > 213> Homo Sapiens
- > 400> 59

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

- > 210> 60
- > 211> 32
- > 212> PRT
- 40 > 213> Homo Sapiens
- > 400> 60

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

- > 210> 61

ES 2 387 924 T3

> 211> 23
 > 212> PRT
 > 213> Homo Sapiens

5 > 400> 61

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

10 > 210> 62
 > 211> 15
 > 212> PRT
 > 213> Homo Sapiens

15 > 400> 62

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

20 > 210> 63
 > 211> 32
 > 212> PRT
 > 213> Homo Sapiens

> 400> 63

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

25 > 210> 64
 > 211> 23
 > 212> PRT
 > 213> Homo Sapiens

> 400> 64

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

35 > 210> 65
 > 211> 15
 > 212> PRT
 > 213> Homo Sapiens

> 400> 65

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

45 > 210> 66
 > 211> 32
 > 212> PRT

> 213> Homo Sapiens

> 400> 66

	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
	1				5					10					15	
5	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30		

> 210> 67

> 211> 23

> 212> PRT

10 > 213> Mus musculus

> 400> 67

	Asp	Ile	Val	Met	Ser	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Val	Gly
	1				5					10					15	
	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Ser	Cys									
				20												

15

> 210> 68

> 211> 15

> 212> PRT

> 213> Mus musculus

20

> 400> 68

	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
	1				5					10					15

25

> 210> 69

> 211> 32

> 212> PRT

> 213> Mus musculus

30

> 400> 69

	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
	1				5					10					15	
	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30		

35

> 210> 70

> 211> 11

> 212> PRT

> 213> Mus musculus

> 400> 70

40

	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
	1				5					10	

45

> 210> 71

> 211> 25

> 212> PRT

> 213> Mus musculus

> 400> 71

Asp Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr
20 25

5 > 210> 72
 > 211> 13
 > 212> PRT
 > 213> Mus musculus

10 > 400> 72

Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met
1 5 10

15 > 210> 73
 > 211> 32
 > 212> PRT
 > 213> Mus musculus

> 400> 73

Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln
1 5 10 15
Leu Ile Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

25 > 210> 74
 > 211> 12
 > 212> PRT
 > 213> Mus musculus

> 400> 74

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ala Ser Ala
1 5 10

30 > 210> 75
 > 211> 13
 > 212> PRT
 > 213> Homo sapiens

35 > 400> 75

Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

40 > 210> 76
 > 211> 13
 > 212> PRT
 > 213> Homo sapiens

45 > 400> 76

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
1 5 10

> 210> 77
 > 211> 13
 > 212> PRT
 > 213> Homo sapiens

5

> 400> 77

Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 1 5 10

10 > 210> 78
 > 211> 32
 > 212> PRT
 > 213> Homo sapiens

15 > 400> 78

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

20 > 210> 79
 > 211> 32
 > 212> PRT
 > 213> Homo sapiens

> 400> 79

25

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

30 > 210> 80
 > 211> 30
 > 212> PRT
 > 213> Secuencia artificial
 > 220>
 > 223> Péptido

35 > 400> 80

Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu Asp
 5 10 15
Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe
 20 25 30

40 > 210> 81
 > 211> 20
 > 212> PRT
 > 213> Secuencia artificial
 > 220>
 45 > 223> Péptido
 > 400> 81

Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15
Glu Asp Asp Phe
20

- > 210> 82
- > 211> 20
- 5 > 212> PRT
- > 213> Secuencia artificial
- > 220>
- > 223> Péptido

10 > 400> 82

Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15
Glu Asp Asp Phe
20

- > 210> 83
- 15 > 211> 18
- > 212> PRT
- > 213> Secuencia artificial
- > 220>
- > 223> Péptido

20 > 400> 83

Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
1 5 10 15
Asp Asp

- 25 > 210> 84
- > 211> 11
- > 212> PRT
- > 213> Secuencia artificial
- > 220>
- 30 > 223> Péptido

> 400> 84

Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10

- > 210> 85
- > 211> 218
- > 212> PRT
- 40 > 213> Homo sapiens
- > 400> 85

```

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1      5      10      15
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
20
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
35      40      45
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
50      55      60
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
65      70      75      80
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
85      90      95
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
100     105     110
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
115     120     125
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130     135     140
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
145     150     155     160
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
165     170     175
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
180     185     190
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
195     200     205
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210     215

```

> 210> 86
> 211> 217
5 > 212> PRT
> 213> Homo sapiens

> 400> 86

```

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1      5      10      15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35      40      45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50      55      60
Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
65      70      75      80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85      90      95
Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
100     105     110
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

```

10

```

                115                120                125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    130                135                140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                150                155                160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                170                175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
                180                185                190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
                195                200                205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                215

```

□

- > 210> 87
- > 211> 168
- 5 > 212> PRT
- > 213> Homo sapiens

> 400> 87

```

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 1                5                10                15
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
                20                25                30
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp
                35                40                45
Tyr Val Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
 50                55                60
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
65                70                75                80
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
                85                90                95
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
                100                105                110
Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
                115                120                125
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe
130                135                140
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys
145                150                155                160
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                165

```

10

- > 210> 88
- > 211> 218
- > 212> PRT
- 15 > 213> Homo sapiens

> 400> 88

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 1 5 10 15
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 20 25 30
 Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 35 40 45
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 50 55 60
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

65 70 75 80
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 85 90 95
 Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 100 105 110
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 115 120 125
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 145 150 155 160
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 180 185 190
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 195 200 205
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215

- > 210> 89
- > 211> 107
- 5 > 212> PRT
- > 213> Homo sapiens
- > 400> 89

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

10

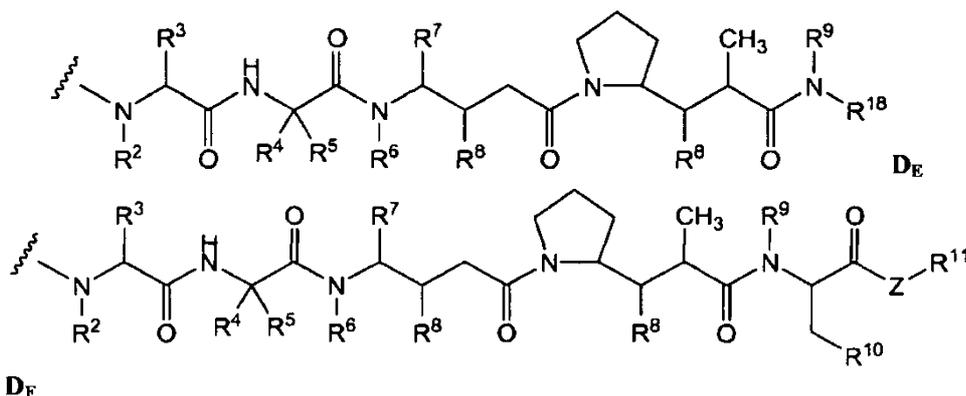
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humanizado que se une a STEAP-1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) que comprende:
- 5 (1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;
- (2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
- 10 (3) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; y
- (4) una HC-FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y una cadena ligera (LC) que comprende:
- 15 (1) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;
- (2) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y
- (3) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.
- 20 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende además al menos una, dos, o tres regiones estructurales (FR) de HC seleccionadas de:
- (1) una HC-FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22
- 25 (2) una HC-FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; y
- (3) una HC-FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.
- 30 3. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una cadena ligera (LC) de SEQ ID NO: 6.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que la HC comprende SEQ ID NO: 10.
5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo es un
- 35 fragmento de anticuerpo seleccionado de un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')₂.
6. Un procedimiento de detección de la presencia de STEAP-1 en un muestra de tejido, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la muestra de tejido con un anticuerpo de la reivindicación 1 en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo a STEAP-1 y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y STEAP-
- 40 1, en el que opcionalmente la muestra de tejido es de un paciente del que se sospecha que tiene un trastorno proliferativo de células de la próstata, pulmón, colon, vejiga, ovario o células de sarcoma de Ewing.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la muestra de tejido es de un paciente del que se sospecha que tiene un trastorno proliferativo de células de la próstata.
- 45 8. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la reivindicación 1 covalentemente unido a un agente citotóxico, en el que el agente citotóxico se selecciona opcionalmente de una toxina, un agente quimioterapéutico, un resto de fármaco, un antibiótico, un isótopo radiactivo y una enzima nucleolítica.
- 50 9. El inmunoconjugado de la reivindicación 8, en el que el agente citotóxico es una toxina.
10. El inmunoconjugado de la reivindicación 8, en el que el inmunoconjugado tiene la fórmula Ab-(L-D)_p y en la que:
- 55 (a) Ab es el anticuerpo de la reivindicación 1;
- (b) L es un ligador;
- (c) D es un resto de fármaco; y
- (d) p oscila de aproximadamente 1 a 20.

11. El immunoconjugado de la reivindicación 10, en el que L se selecciona de 6-maleimidocaproilo (MC), maleimidopropanoilo (MP), valina-citulina (val-cit), alanina-fenilalanina (ala-phe), p-aminobenciloxycarbonilo (PAB), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo (SMCC), (4-yodo-acetil)aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB) y 6-maleimidocaproil-valina-citulina-p-aminobeniloxycarbonilo (MC-vc-PAB).

12. El immunoconjugado de la reivindicación 11, en el que D se selecciona de una auristatina y dolostatina.

10 13. El immunoconjugado de la reivindicación 12, en el que D es un resto de fármaco de fórmula D_E o D_F:



15 y en las que R² y R⁶ son cada uno metilo, R³ y R⁴ son cada uno isopropilo, R⁵ es -H, R⁷ es sec-butilo, cada R⁸ se selecciona independientemente de CH₃, O-CH₃, OH y H; R⁹ es H; R¹⁰ es arilo; Z es -O- o -NH-; R¹¹ es H, alquilo C₁-C₈ o -(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₃; y R¹⁸ es -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-arilo; y p oscila de aproximadamente 1 a 8.

14. El immunoconjugado de la reivindicación 10 que tiene actividad destructora de células *in vitro* o *in vivo*.

20 15. El immunoconjugado de la reivindicación 10, en el que el immunoconjugado tiene la fórmula Ab-(L-MMAE)_p en la que L es un ligador y p oscila de 2 a 5, en la que opcionalmente L comprende val-cit, o L comprende MC, o L comprende PAB, o L comprende MC-vc-PAB.

25 16. El immunoconjugado de la reivindicación 15, en el que L comprende MC-vc-PAB.

17. Una composición farmacéutica que comprende el immunoconjugado de la reivindicación 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 18. La composición farmacéutica de la reivindicación 17 para su uso en un procedimiento para tratar cáncer de próstata, pulmón o colon, comprendiendo el procedimiento administrar a un individuo una cantidad eficaz de la composición farmacéutica.

35 19. La composición farmacéutica de la reivindicación 18 para su uso en un procedimiento para tratar cáncer de próstata.

20. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que LC comprende:

(1) una región de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90;

40 (2) una región de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92;

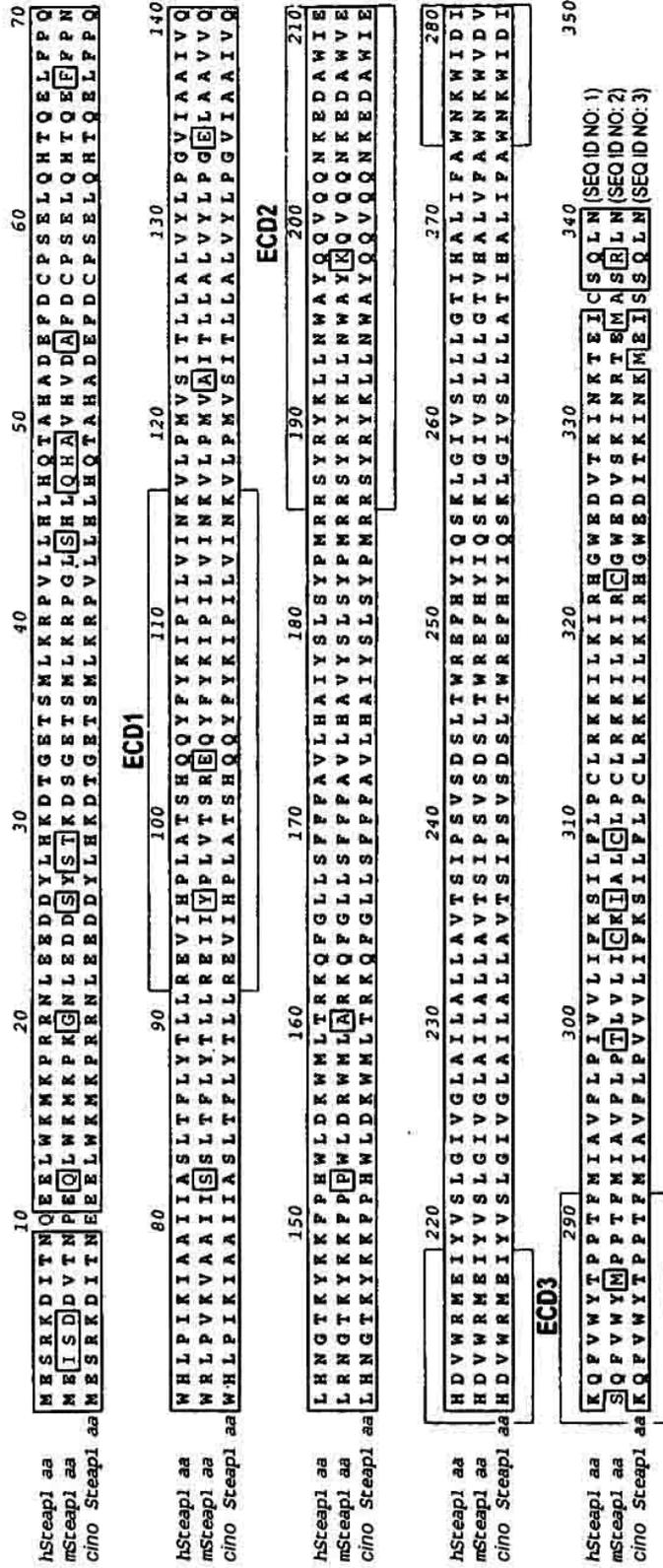
(3) una región de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93;

(4) una región de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94;

45 (5) una región de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95;

- (6) una región de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96;
- (7) una región de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97;
- 5 (8) una región de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98;
- (9) una región de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99;
- (10) una región de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100; o
- 10 (11) una región de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101.

Figura 1



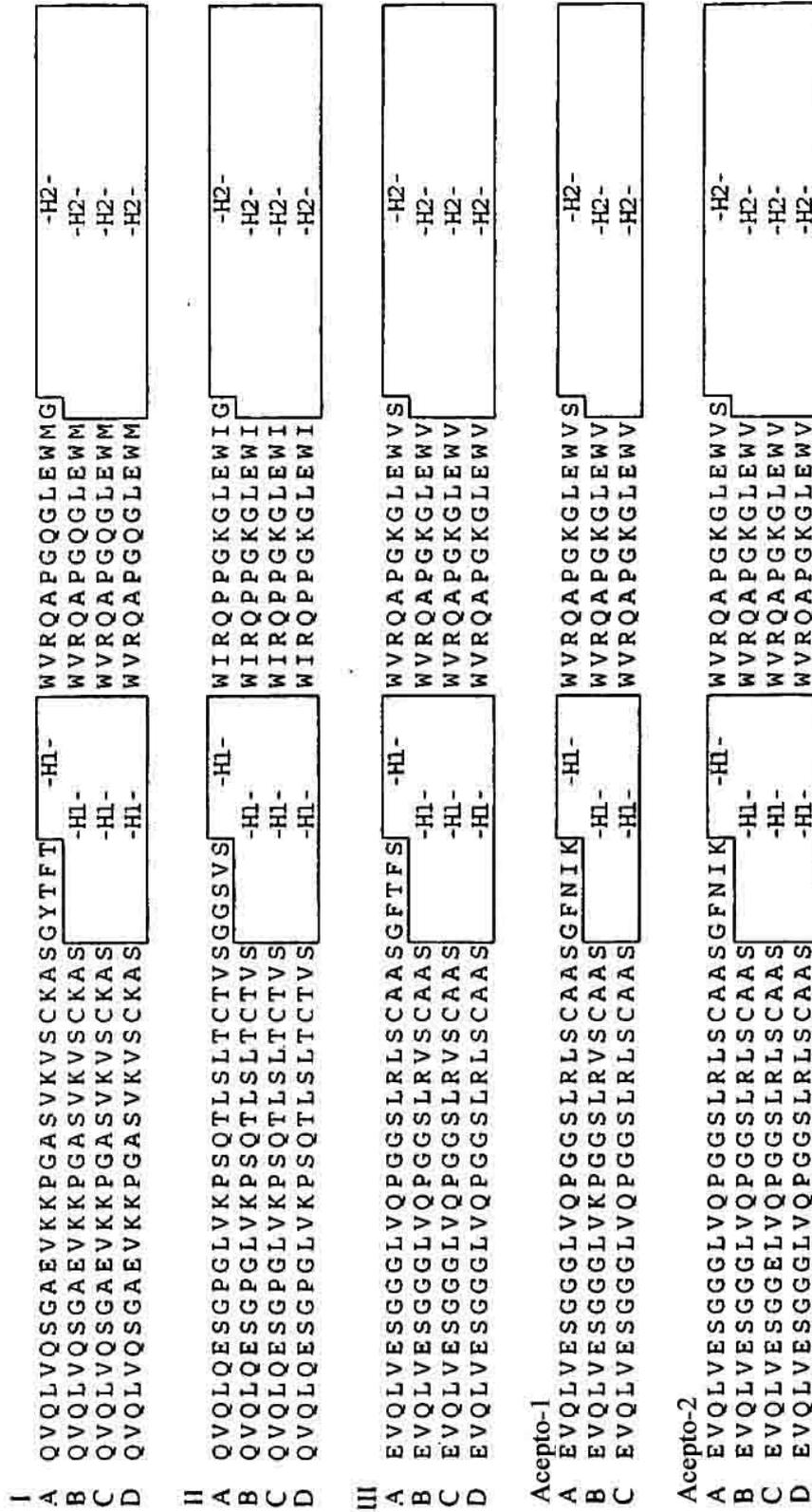


Figura 3A

SEQ ID NOs:

RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
 RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
 RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA
 RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC

-H3-
 -H3-
 -H3-
 -H3-

WGQGTLLVTVSS
 WGQGTLLVTVSS
 WGQGTLLVTVSS
 WGQGTLLVTVSS

26, 27, 28, 29
 30, 31, 28, 29
 30, 31, 32, 29
 30, 31, 33, 29

RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR
 RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR
 RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA
 RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC

-H3-
 -H3-
 -H3-
 -H3-

WGQGTLLVTVSS
 WGQGTLLVTVSS
 WGQGTLLVTVSS
 WGQGTLLVTVSS

34, 35, 36, 29
 37, 38, 36, 29
 37, 38, 39, 29
 37, 38, 40, 29

RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC

-H3-
 -H3-
 -H3-
 -H3-

WGQGTLLVTVSS
 WGQGTLLVTVSS
 WGQGTLLVTVSS
 WGQGTLLVTVSS

41, 42, 43, 29
 44, 45, 43, 29
 44, 45, 46, 29
 44, 45, 47, 29

RFTISADTTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR
 RFTISADTTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR
 RFTISADTTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS

-H3-
 -H3-
 -H3-

WGQGTLLVTVSS
 WGQGTLLVTVSS
 WGQGTLLVTVSS

48, 42, 49, 29
 44, 45, 49, 29
 44, 45, 50, 29

RFTISADTTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
 RFTISADTTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
 RFTISADTTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA
 RFTISADTTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC

-H3-
 -H3-
 -H3-
 -H3-

WGQGTLLVTVSS
 WGQGTLLVTVSS
 WGQGTLLVTVSS
 WGQGTLLVTVSS

48, 42, 51, 29
 44, 45, 51, 29
 44, 45, 52, 29
 44, 45, 53, 29

Figura 3B

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY -L2- GVPSRFSGSGGTDFLTISSSLQP

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLI -L2- GVPSRFSGSGGTDFLTISSSLQP

kv2 DIVMTQSPSLPVTGEPASISC -L1- WYLKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGGTDFLLKISRVEA

kv3 EIVLTQSPGTLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLLIY -L2- GIPDRFSGSGGTDFLTISSRLQP

kv4 DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINC -L1- WYQQKPGQPPKLLIY -L2- GVPDRFSGSGGTDFLTISSSLQA

Figura 4A

EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOS: 54, 55, 56, 57

EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOS: 54, 58, 56, 57

EDVGVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOS: 58, 59, 60, 57

EDFAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOS: 61, 62, 63, 57

EDVAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOS: 64, 65, 66, 57

Figura 4B

	230	240	250	260	270
humlgG1	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV				
humlgG2	PAP - PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
humlgG3	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYV				
humlgG4	PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV				
		****			* * *
	280	290	300	310	320
humlgG1	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humlgG2	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
humlgG3	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humlgG4	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
			* *	*	*
	330	340	350	360	370
humlgG1	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
				D L	
humlgG2	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humlgG3	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humlgG4	SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
	**	*		*	
	380	390	400	410	420
humlgG1	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
humlgG2	EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
humlgG3	EWESSGQPENNYNTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMH				
humlgG4	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH				
	*	*	*	*	* *
	430	440			
humlgG1	EALHNHYTQKSLSLSPGK		(SEQ ID NO: 85)		
humlgG2	EALHNHYTQKSLSLSPGK		(SEQ ID NO: 86)		
humlgG3	EALHNRFTQKSLSLSPGK		(SEQ ID NO: 87)		
humlgG4	EALHNHYTQKSLSLSLGLK		(SEQ ID NO: 88)		
	**	*			

Una secuencia consenso de la región contante de la cadena ligera kappa:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)

Figura 5

Figura 6C

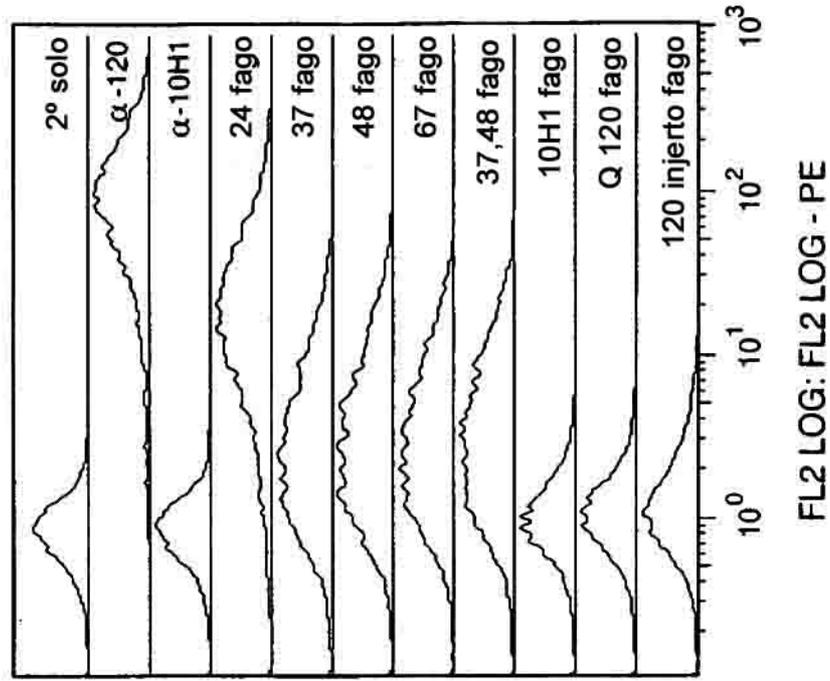


Figura 6A

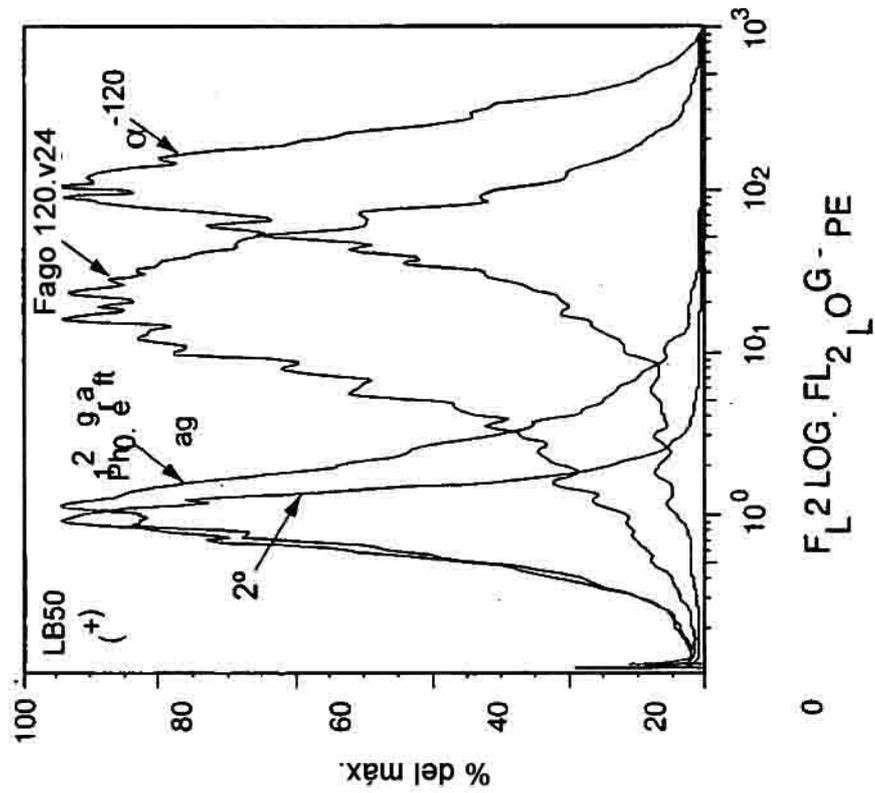


Figura 6D

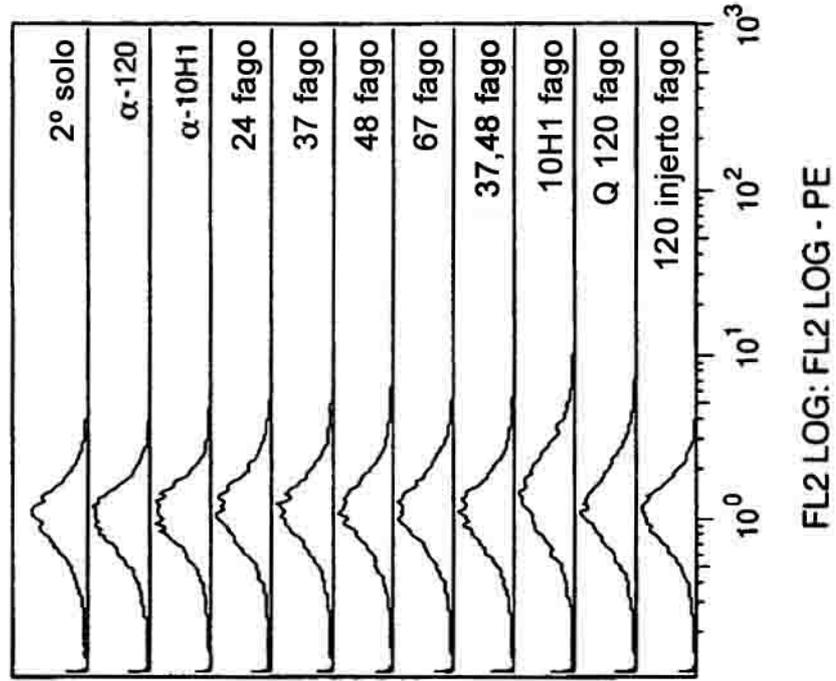
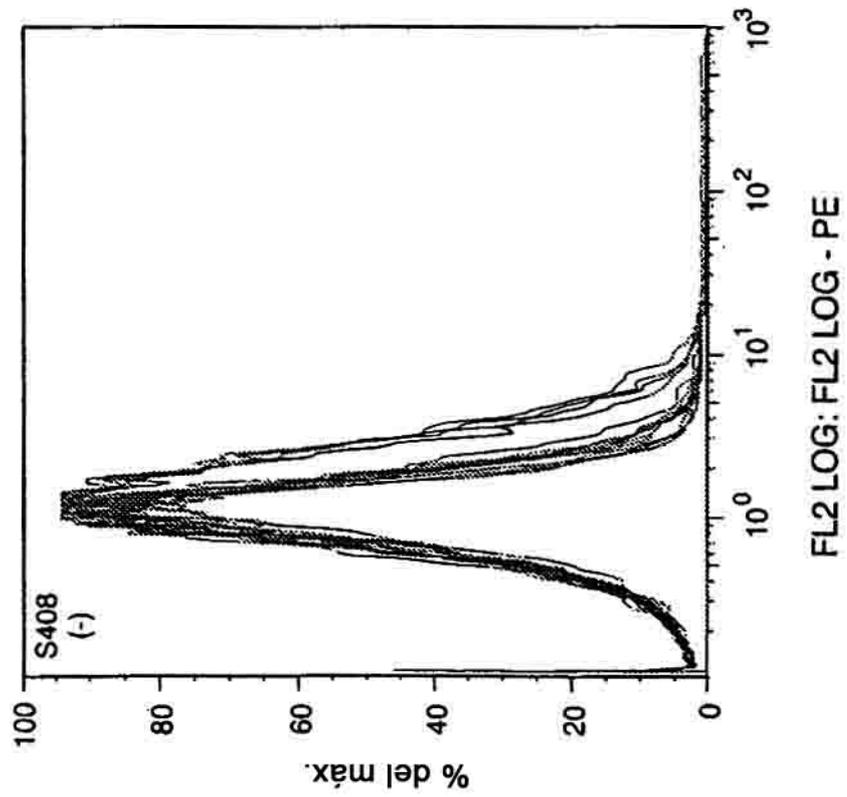


Figura 6B



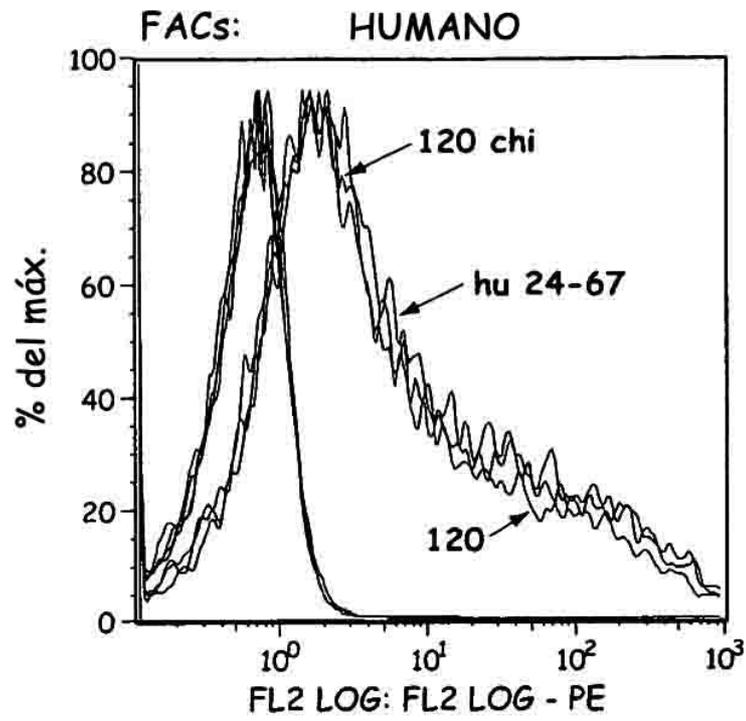


Figura 7A

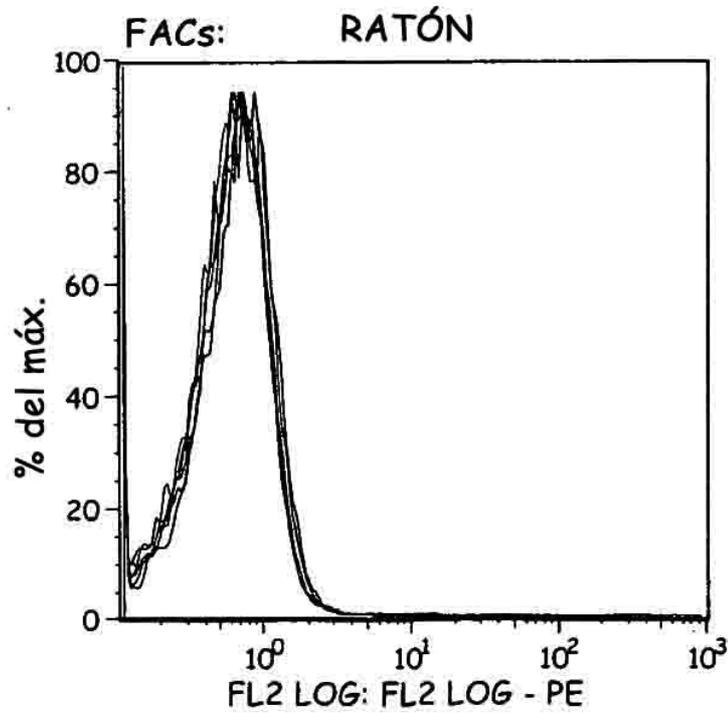


Figura 7B

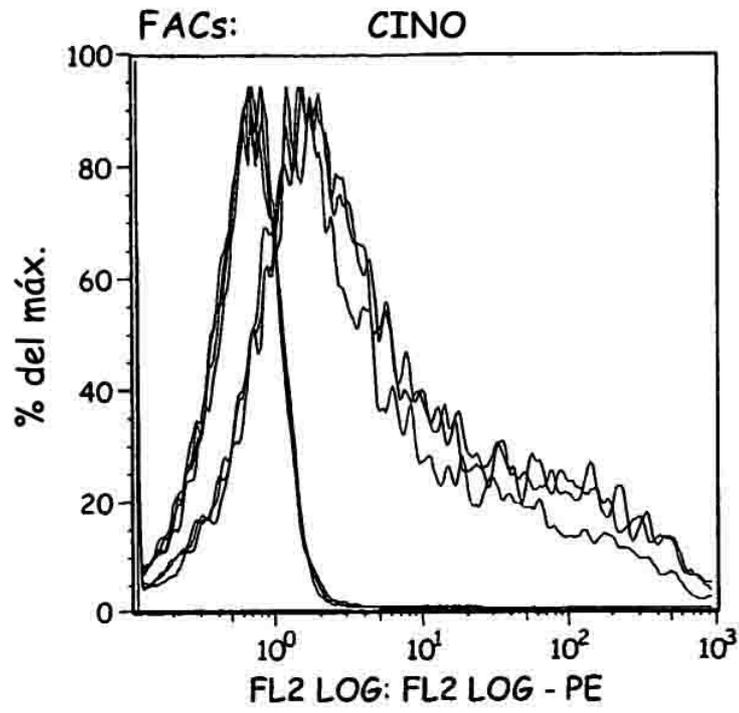


Figura 7C

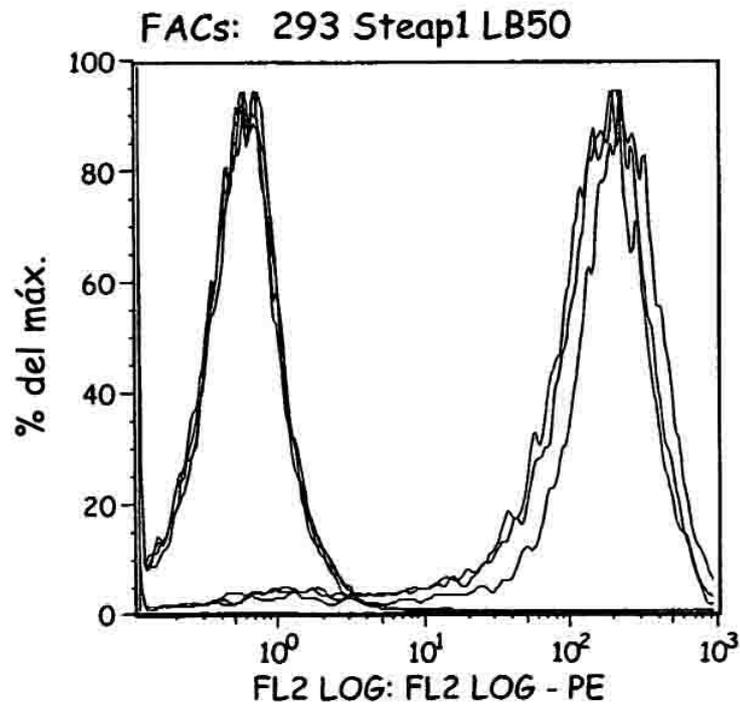


Figura 7D

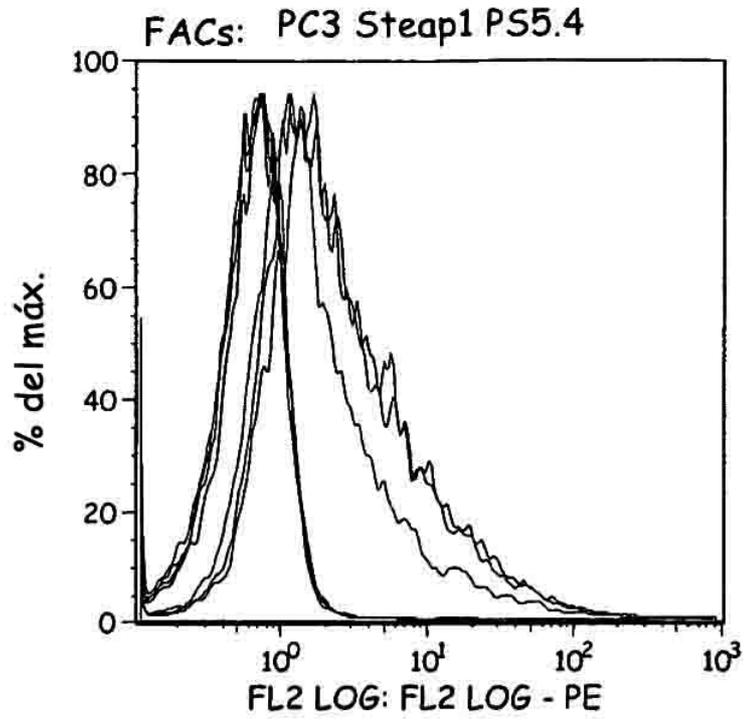


Figura 7E

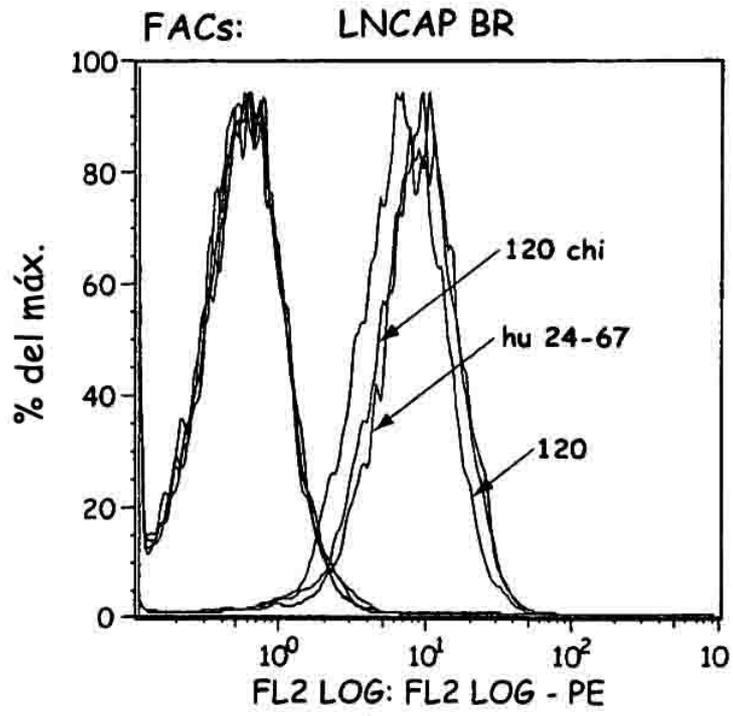


Figura 7F

Figura 8A

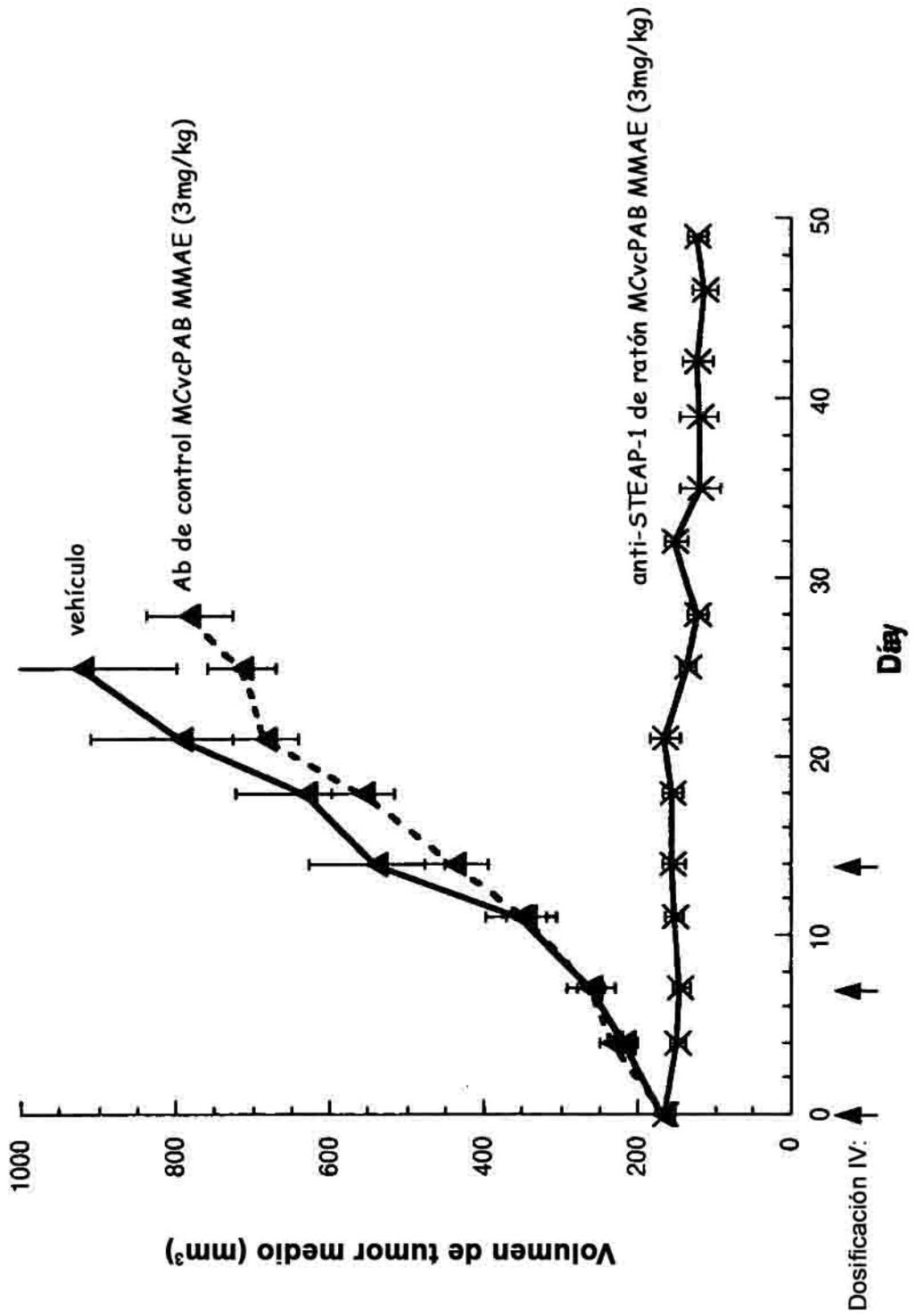


Figura 8B

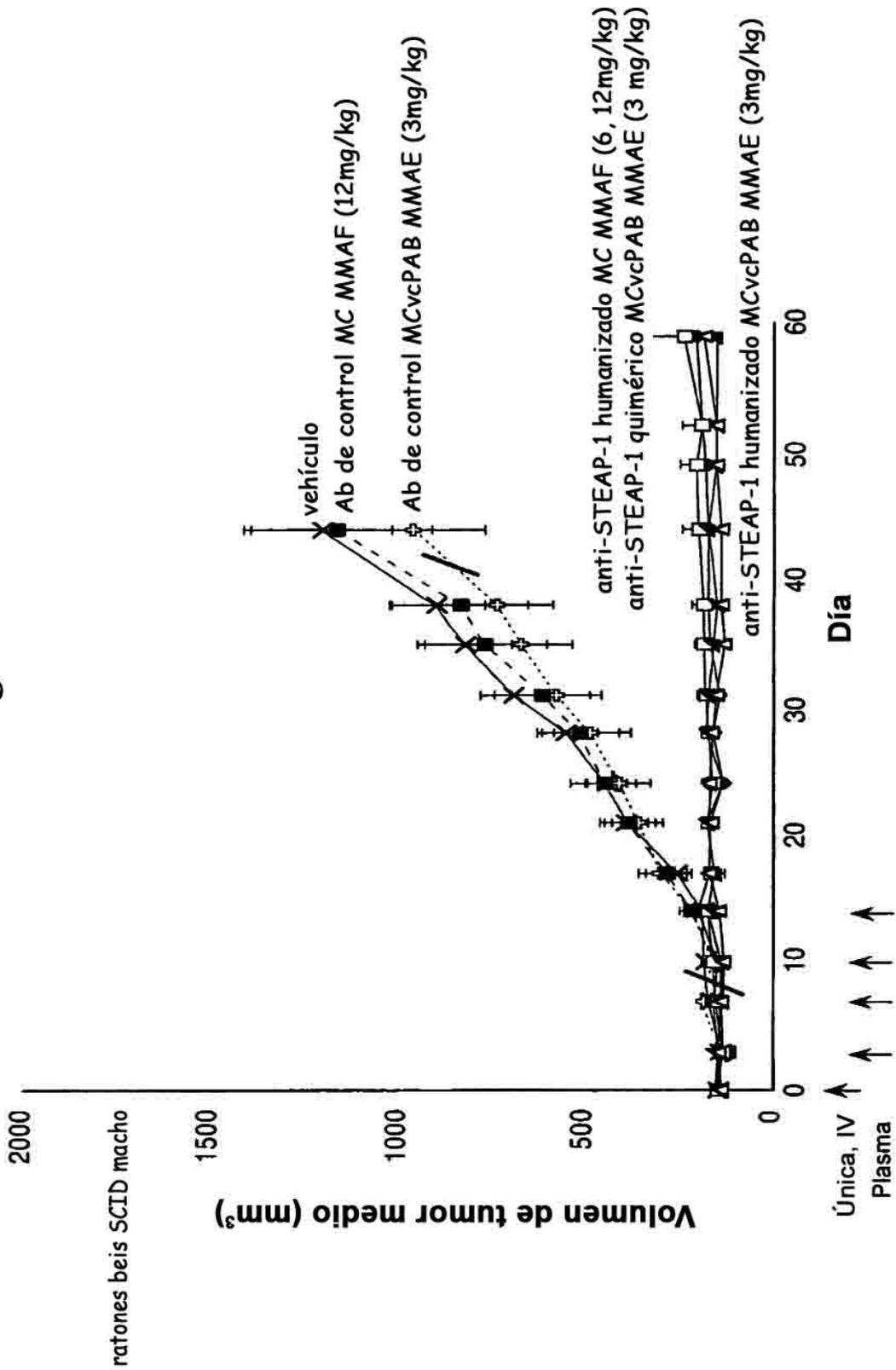


Figura 9

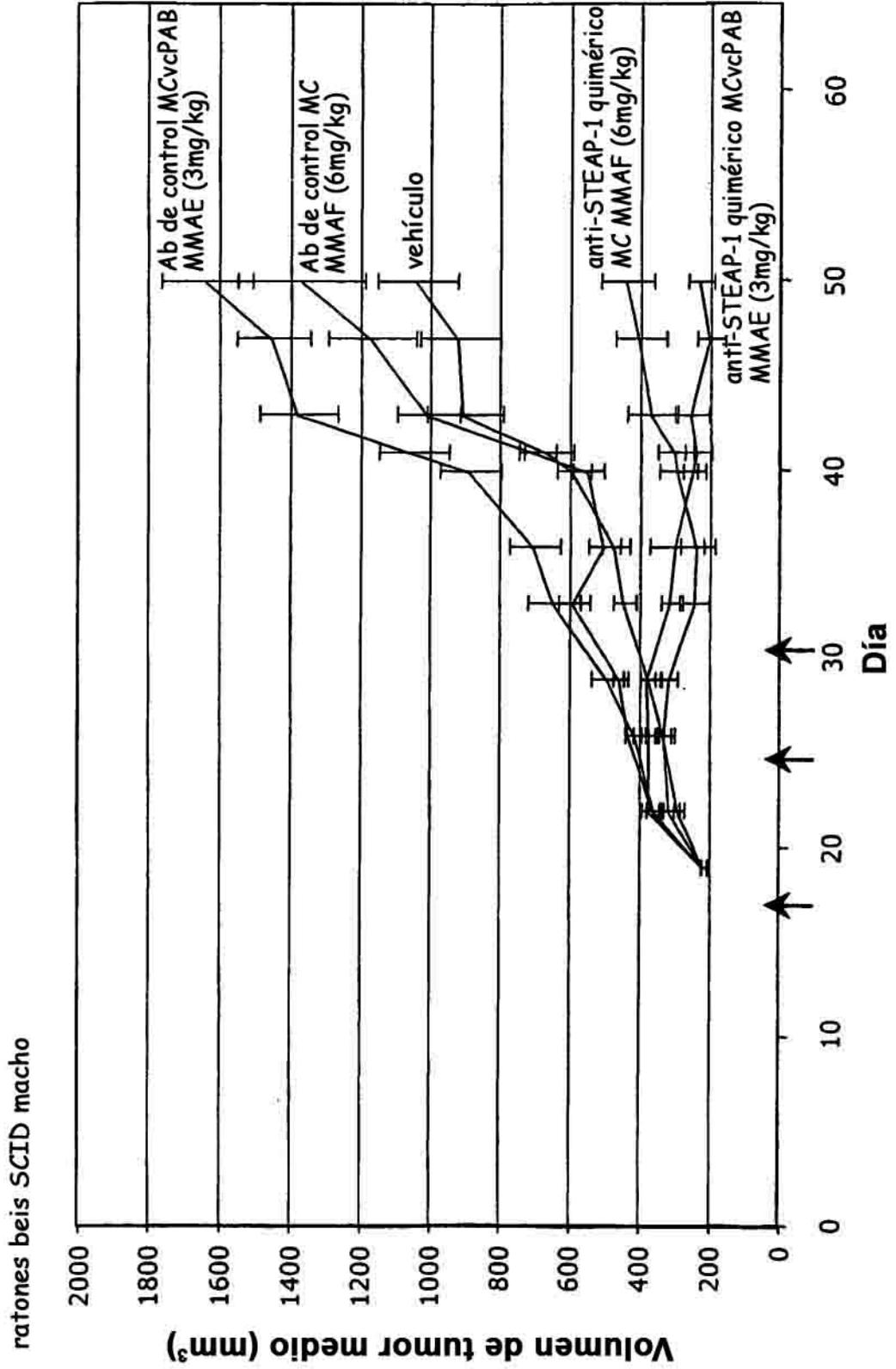


Figura 10

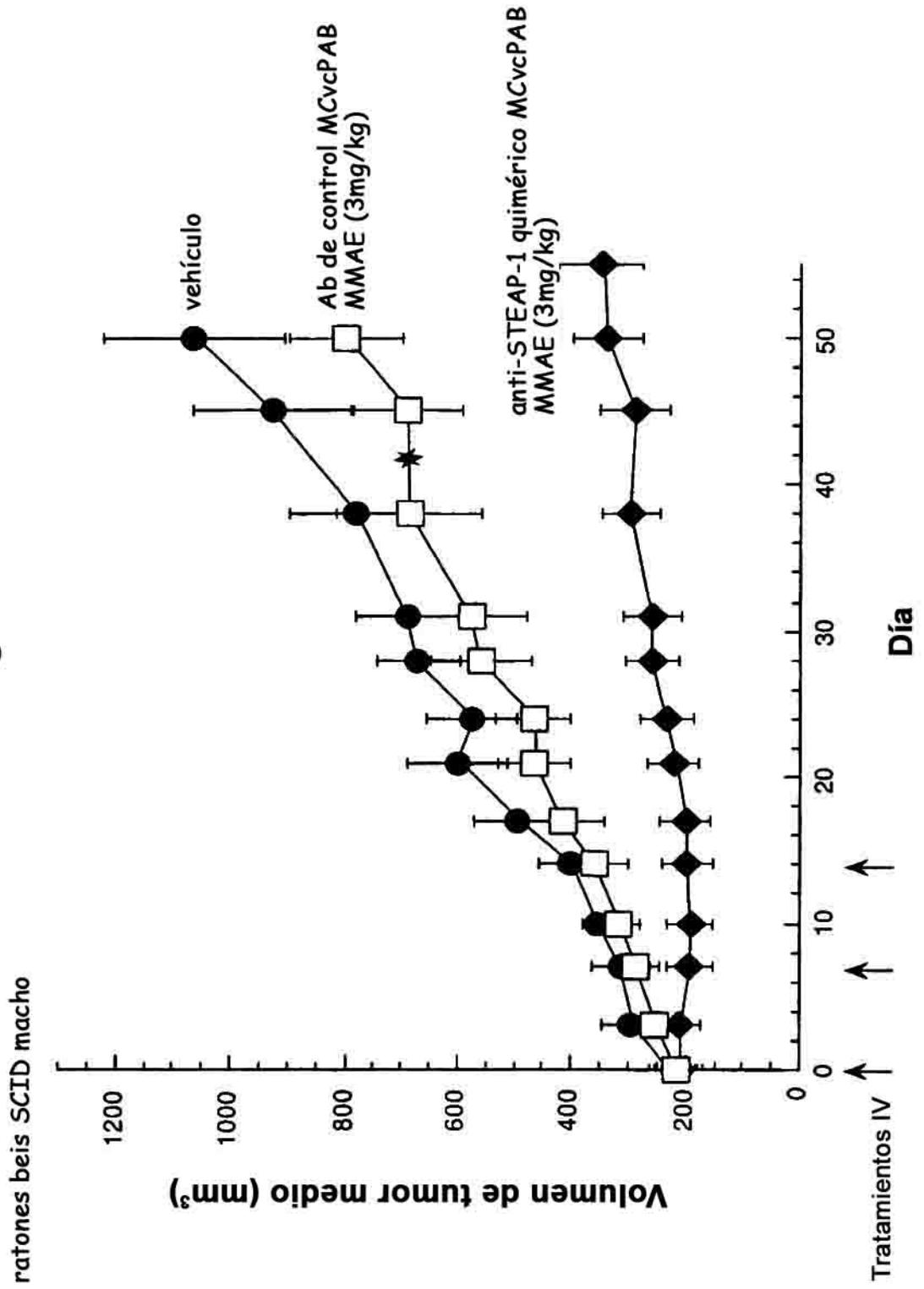


Figura 11

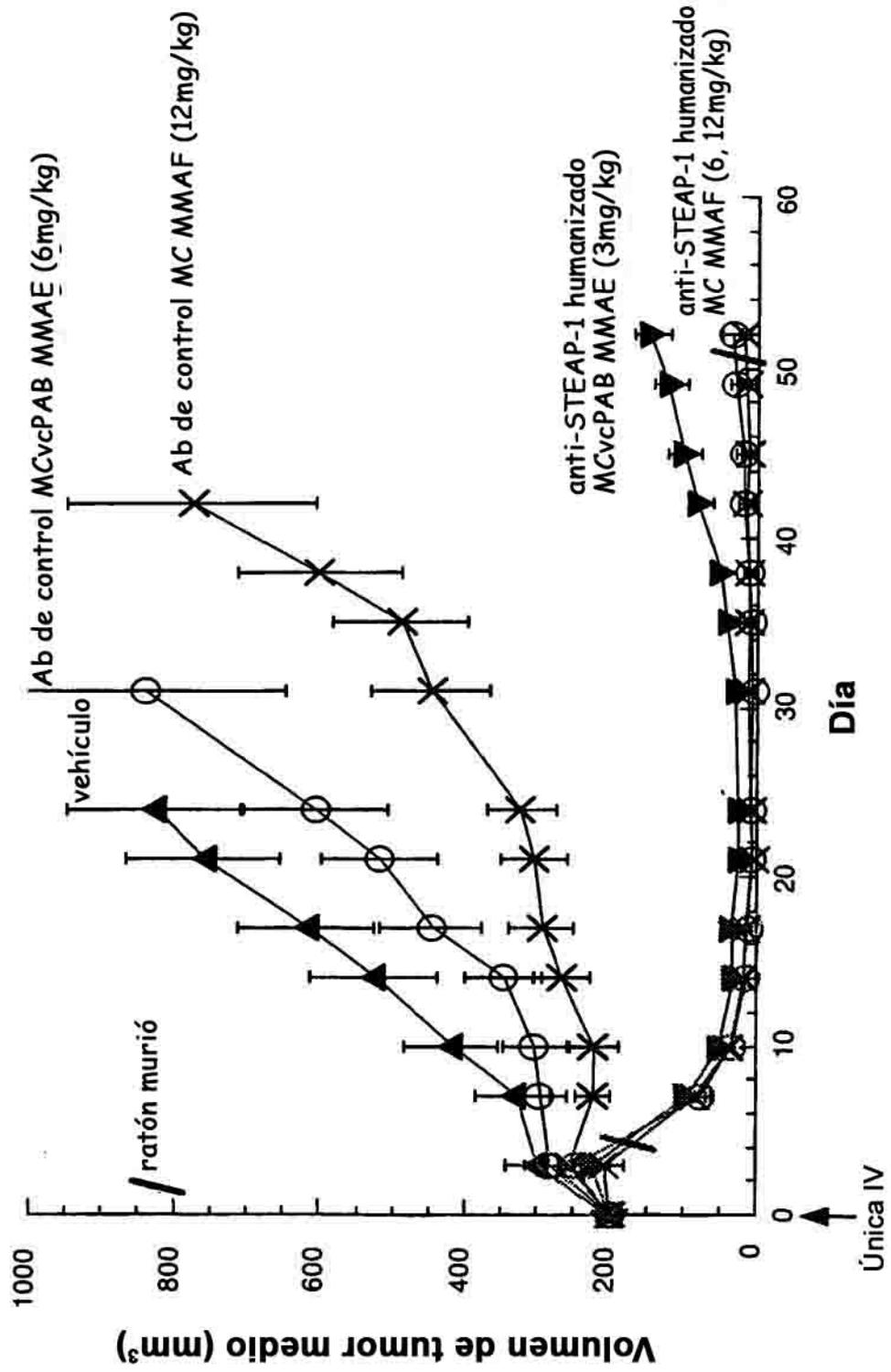


Diagrama esquemático de STEAP-1 en la membrana celular

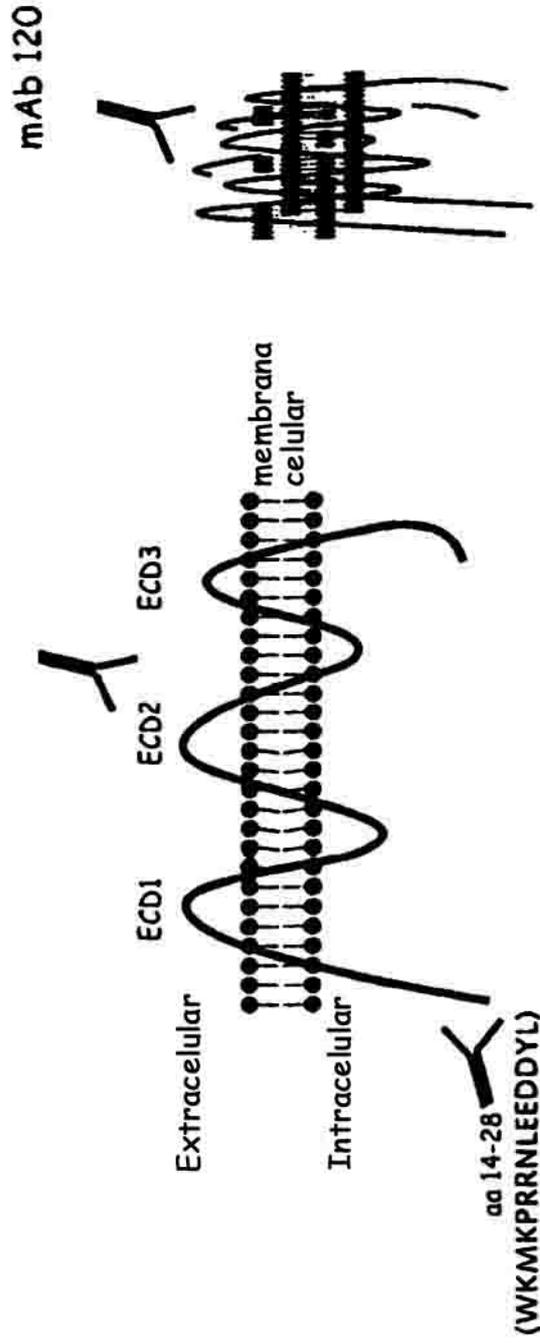
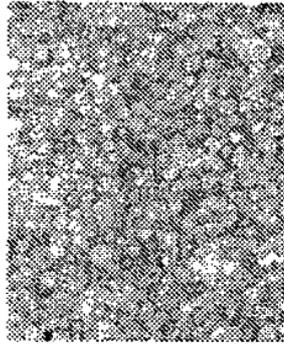


Figura 12

Expresión de STEAP-1 en modelos de cáncer de próstata

Modelos exógenos

293 STEAP1 LB50



PC3 STEAP1 PS5.4

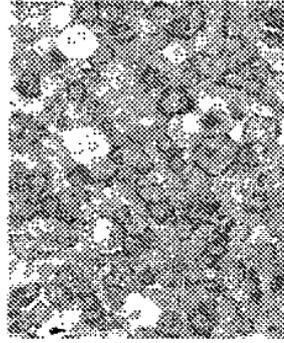


Figura 13A

Figura 13B

Modelos endógenos

LN_{CaP}

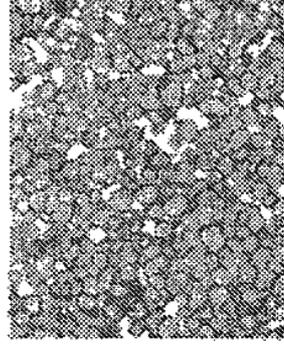


Figura 13C

LuCAP 77

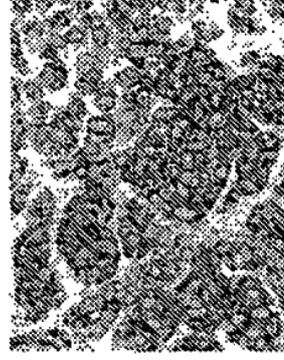


Figura 13D

Figura 14A

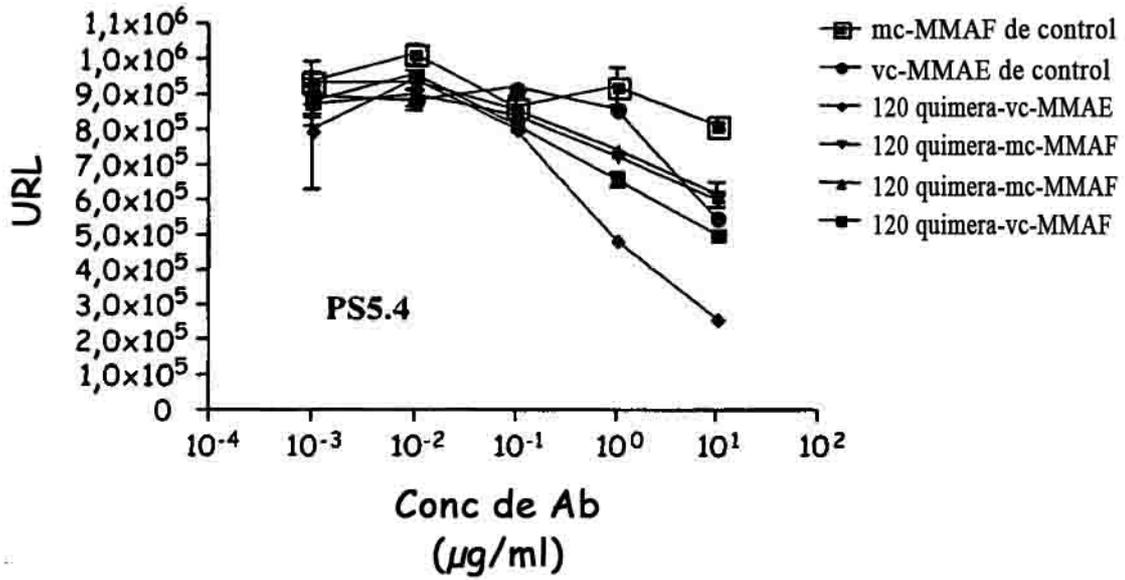


Figura 14B

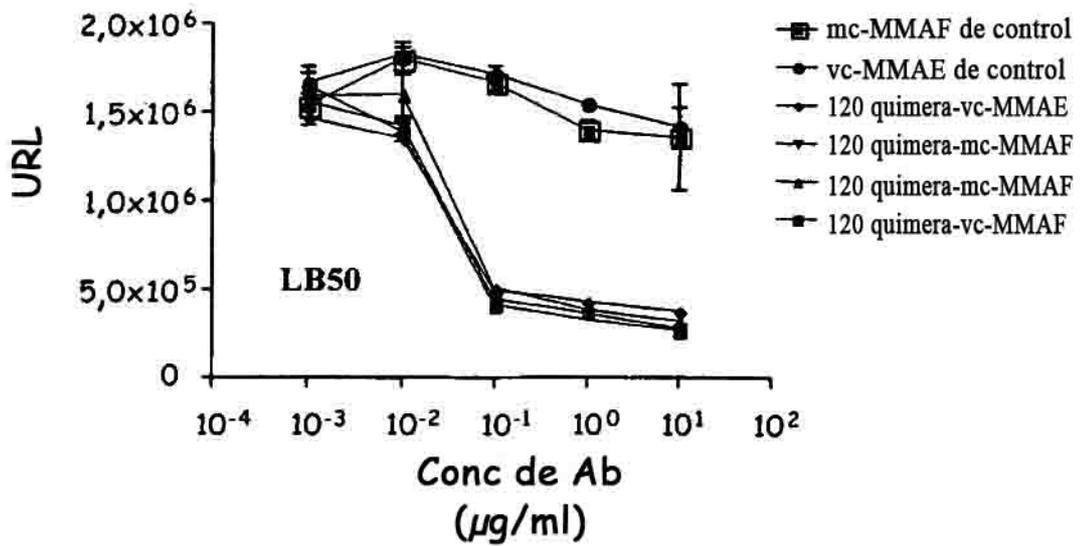


Figura 14C

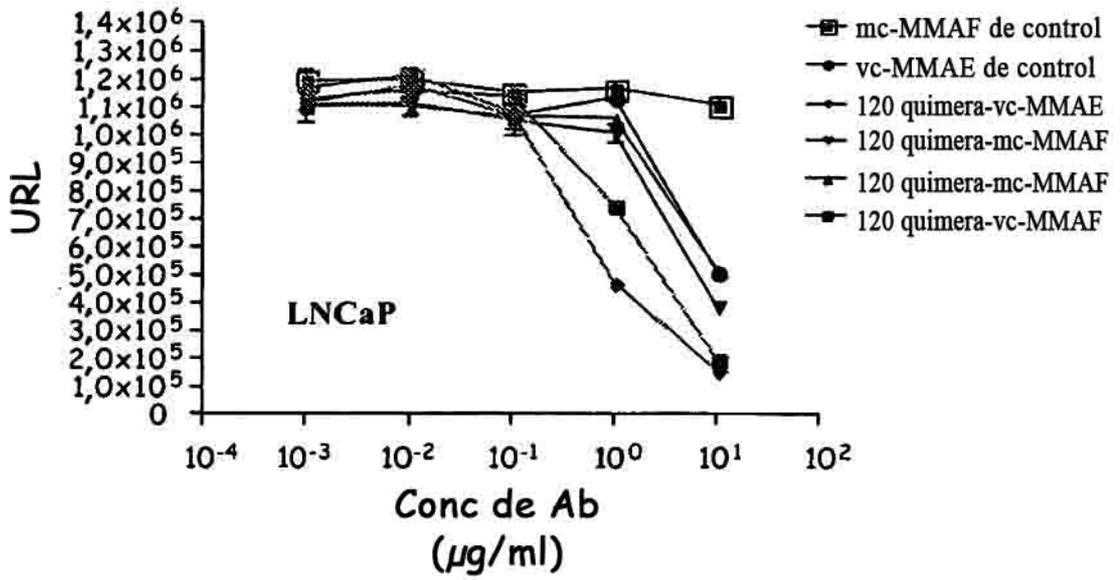


Figura 14D

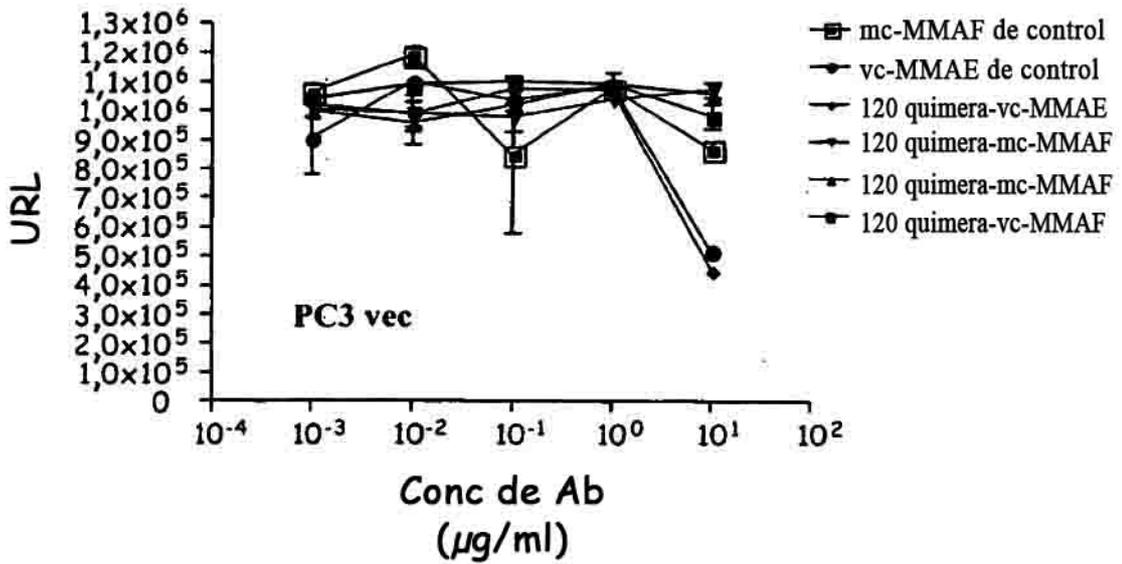
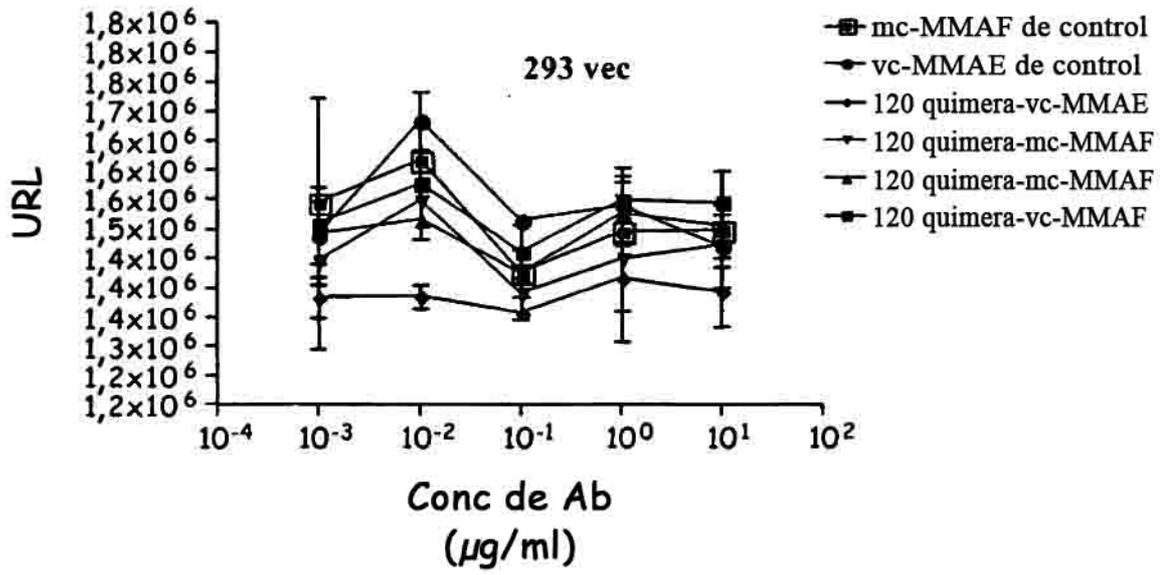
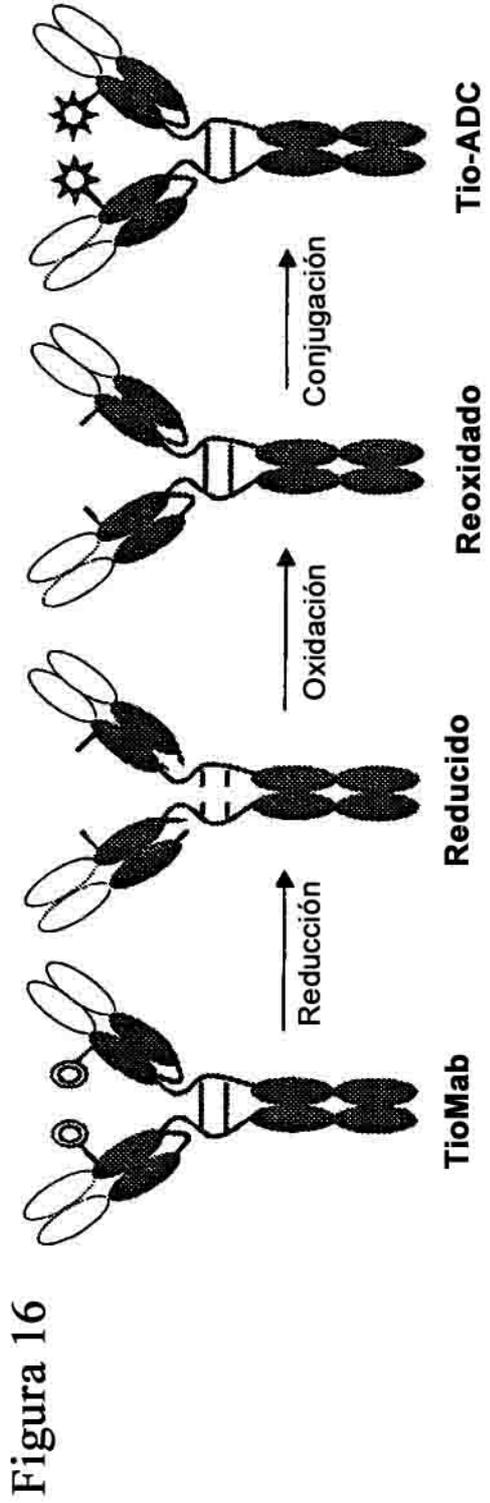
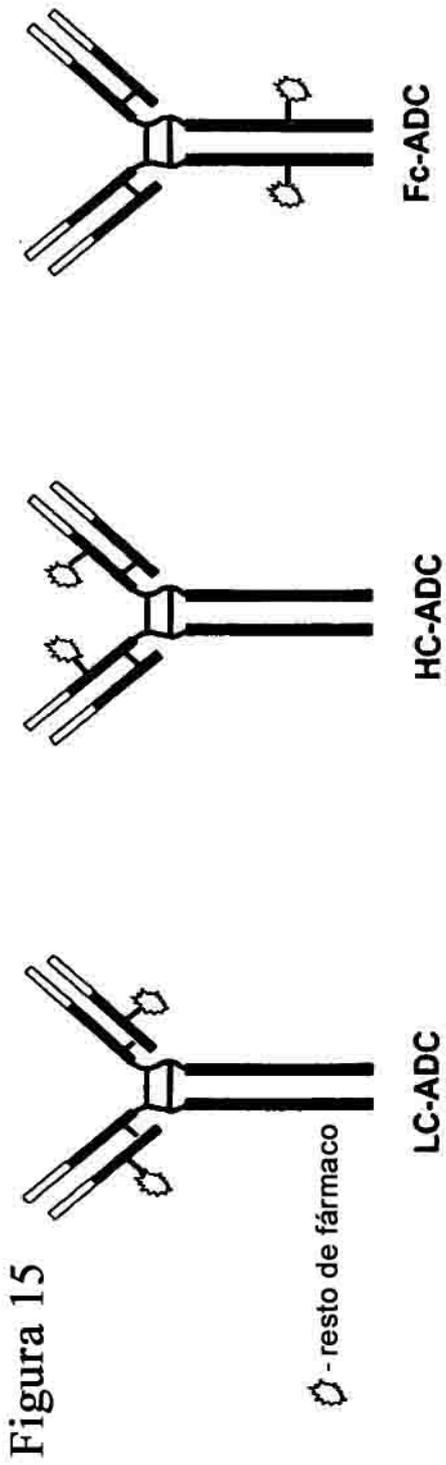


Figura 14E





Variante de tio-LC (V205C) con numeración secuencial correspondiente

Numeración normalizada >> **LC-V205C (numeración de Kabat)**

Posición relativa	LC-V210C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	219
	LC-V204C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	213
	LC-V211C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	220
	LC-V205C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	214
	LC-V205C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	214
	LC-V205C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	214
	LC-V210C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	219
	LC-V209C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	218
	LC-V209C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	218
	LC-V205C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	214
	STEAP120-LC- V211C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	220

Figura 17A

Variante de tio-HC (A121C) con numeración secuencial correspondiente

Numeración normalizada >> **HC-A118C (numeración EU)**

Posición relativa	HC-A114C	- - - - -	L Y L	W G Q G T	L V T V S S A S	T K G P S V	F P L A P S S K S T S G G T	A A L	138
	HC-A123C	- -	N S Y W Y F D V	W G Q G T	L V T V S S A S	T K G P S V	F P L A P S S K S T S G G T	A A L	147
	HC-A121C	- - -	I P R H A N V F	W G Q G T	L V T V S S A S	T K G P S V	F P L A P S S K S T S G G T	A A L	145
	HC-A117C	- - -	W T S G L D Y	W G Q G T	L V T V S S A S	T K G P S V	F P L A P S S K S T S G G T	A A L	141
	HC-A121C	- -	D G F Y A M D Y	W G Q G T	L V T V S S A S	T K G P S V	F P L A P S S K S T S G G T	A A L	145
	HC-A121C	- -	I S I A G M D Y	W G Q G T	L V T V S S A S	T K G P S V	F P L A P S S K S T S G G T	A A L	145
	HC-A121C	- -	S W D W Y F D V	W G Q G T	L V T V S S A S	T K G P S V	F P L A P S S K S T S G G T	A A L	145
	HC-A124C	-	R S H V G Y F D V	W G Q G T	L V T V S S A S	T K G P S V	F P L A P S S K S T S G G T	A A L	148
	HC-A118C	- - - - -	I R L D Y	W G Q G T	L V T V S S A S	T K G P S V	F P L A P S S K S T S G G T	A A L	142
	HC-A121C	- -	R G D Y S M D Y	W G Q G T	L V T V S S A S	T K G P S V	F P L A P S S K S T S G G T	A A L	145
	STEAP120-HC- A125C	Y D D Y Y Y A M D Y	W G Q G T	L V T V S S A S	T K G P S V	F P L A P S S K S T S G G T	A A L	149	

Figura 17B

Variante de tío-Fc (S400C) con numeración secuencial correspondiente

Numeración normalizada >> **Fc-S400C (numeración EU)**

HC-S396C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	438
HC-S405C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	447
HC-S403C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	445
HC-S399C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	441
HC-S403C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	445
HC-S403C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	445
HC-S403C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	445
HC-S406C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	448
HC-S400C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	442
HC-S403C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	445
STEAP120-HC- S407C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	449

Figura 17C

Figura 18A

293 Steap1 c.LB50

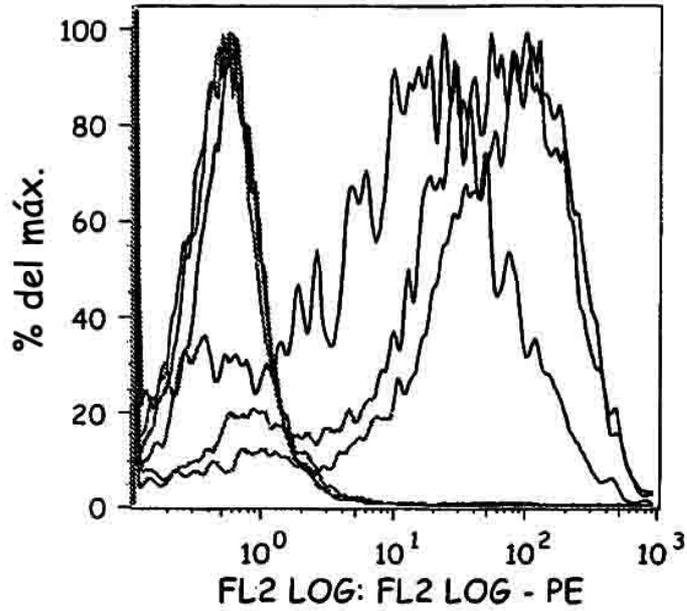


Figura 18D

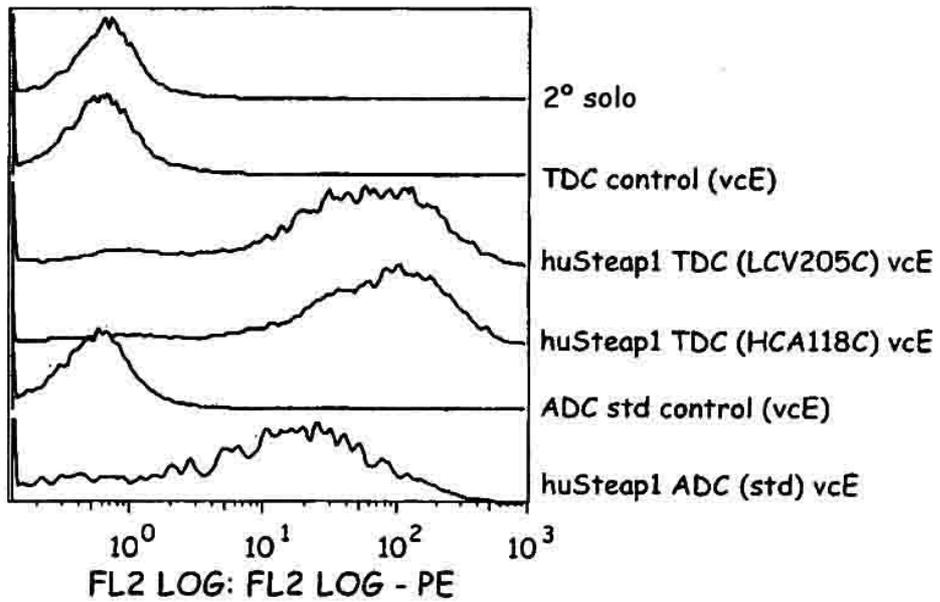


Figura 18B
PC3 Steap1 c.PS5.4

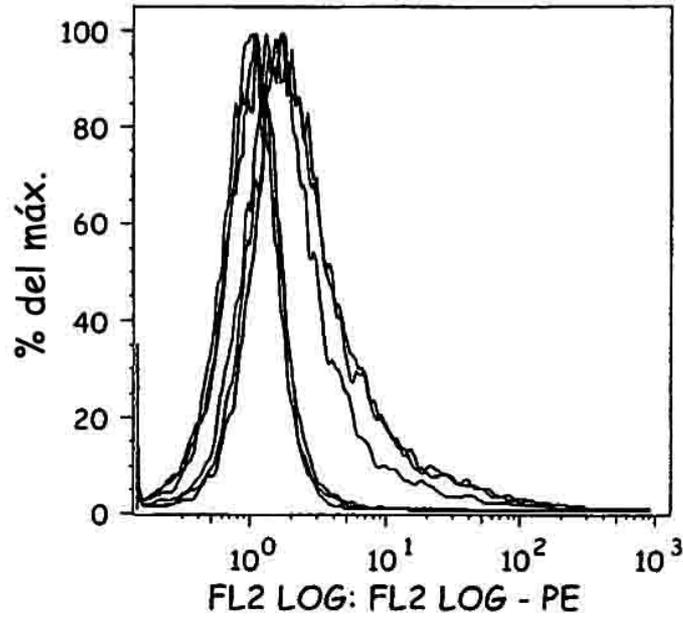


Figura 18E

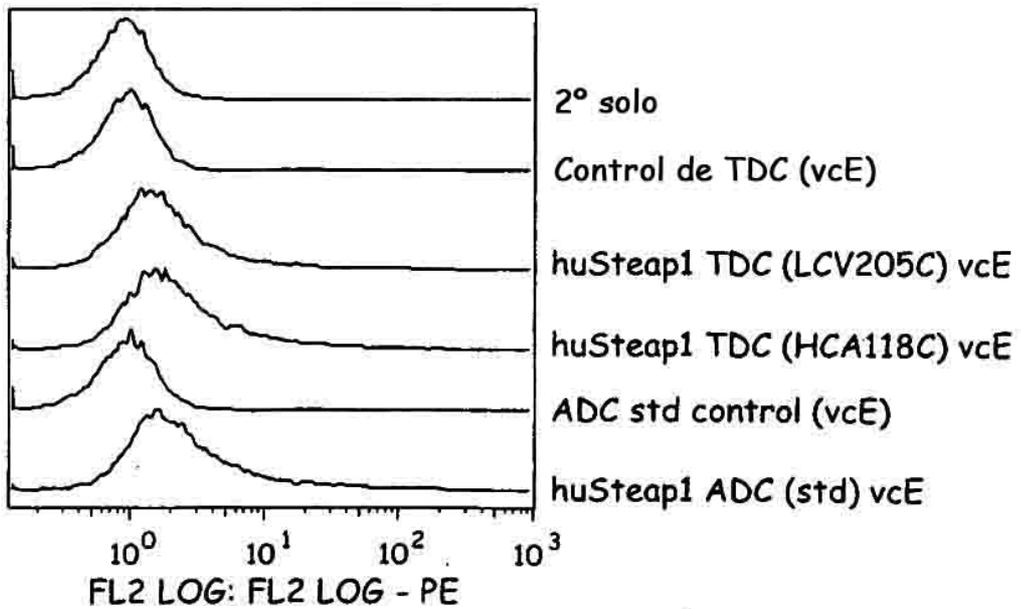


Figura 18C

LNCaP

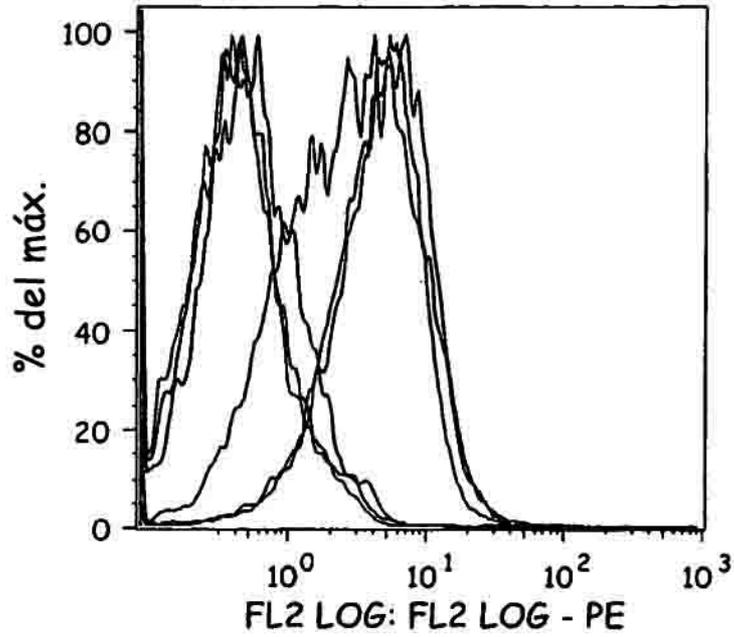


Figura 18F

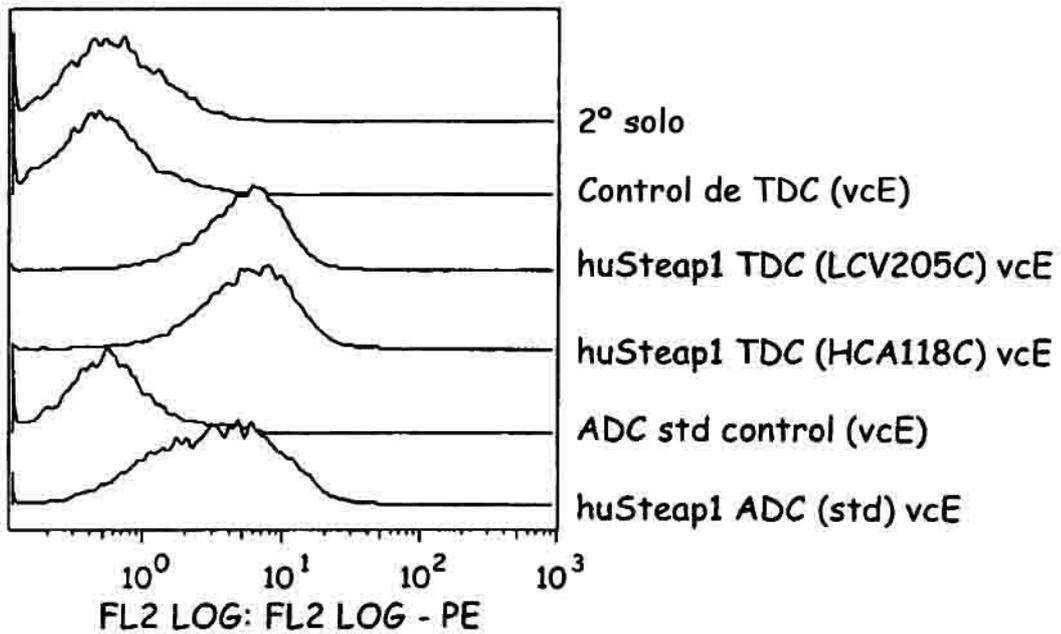


Figura 19A

LB250 2K/pocillo

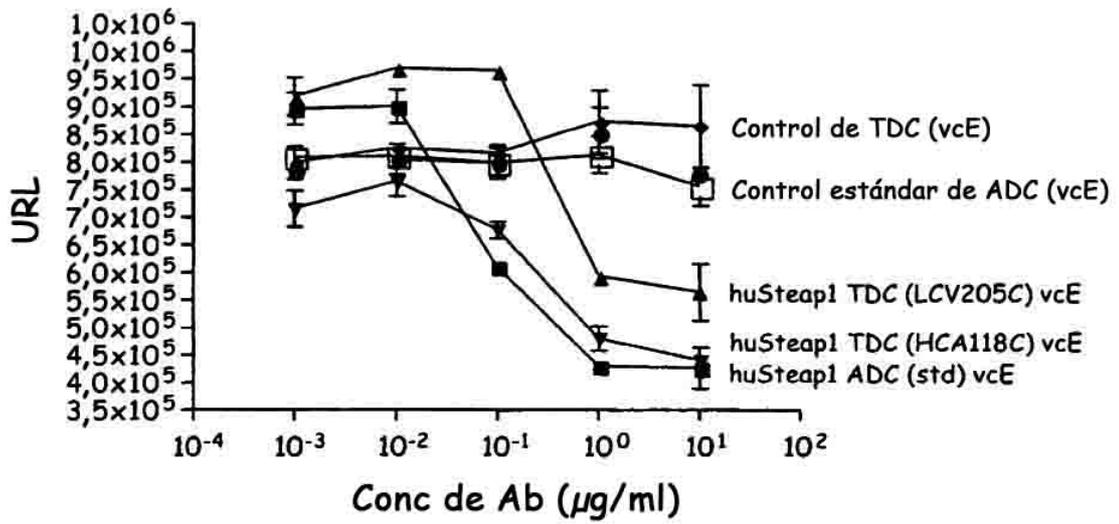


Figura 19B

PS 5.4 2K/pocillo

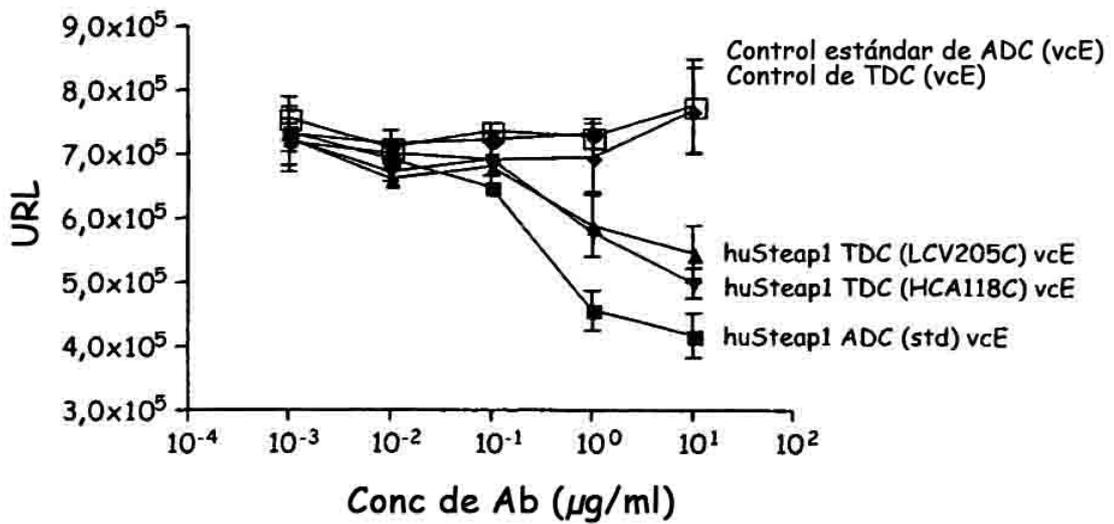
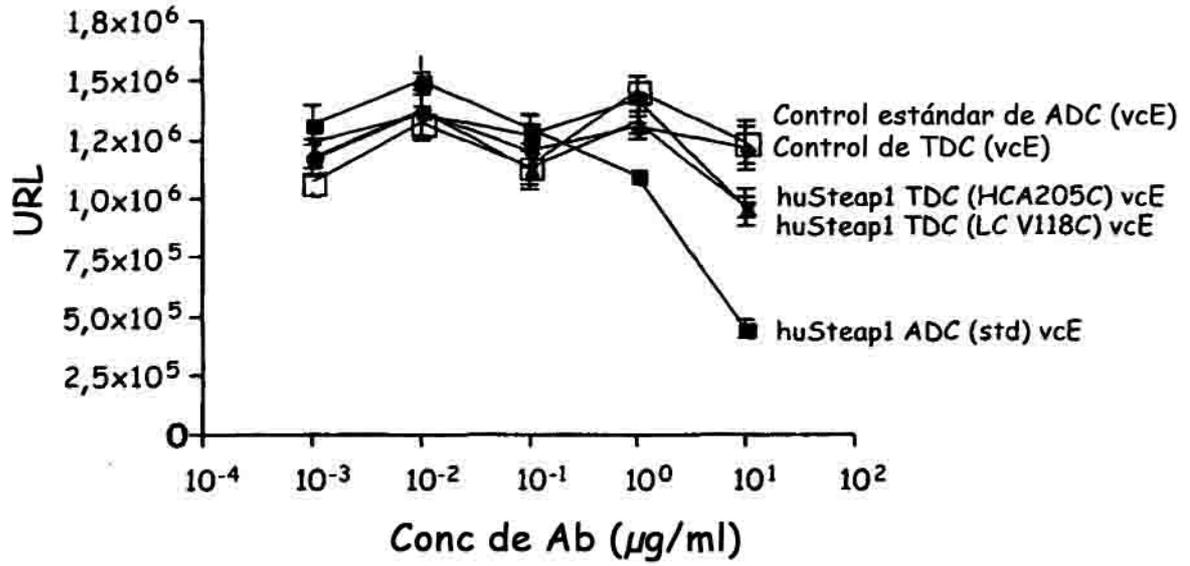


Figura 19C

LNCAP 3K/pocillo



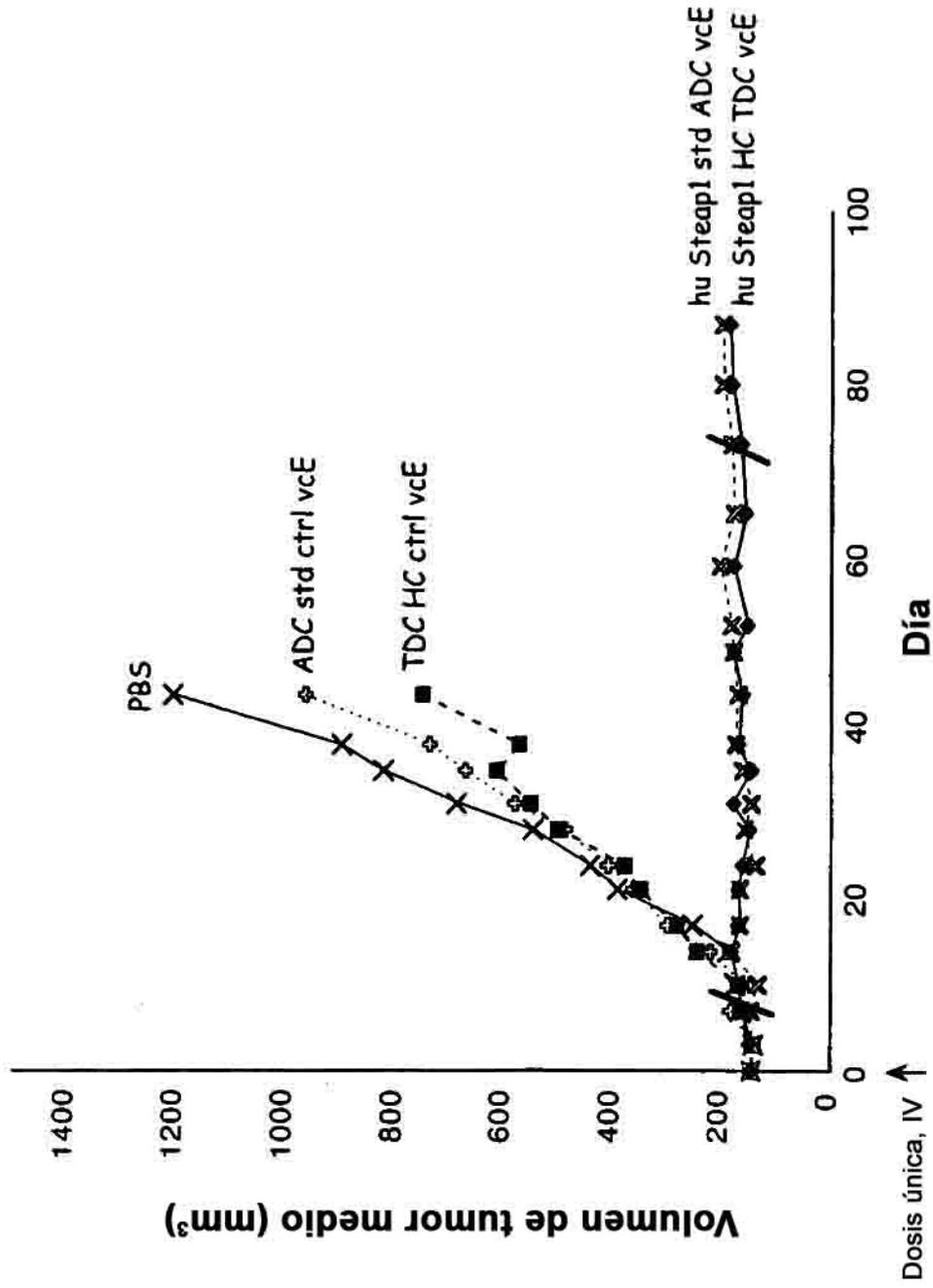


Figura 20

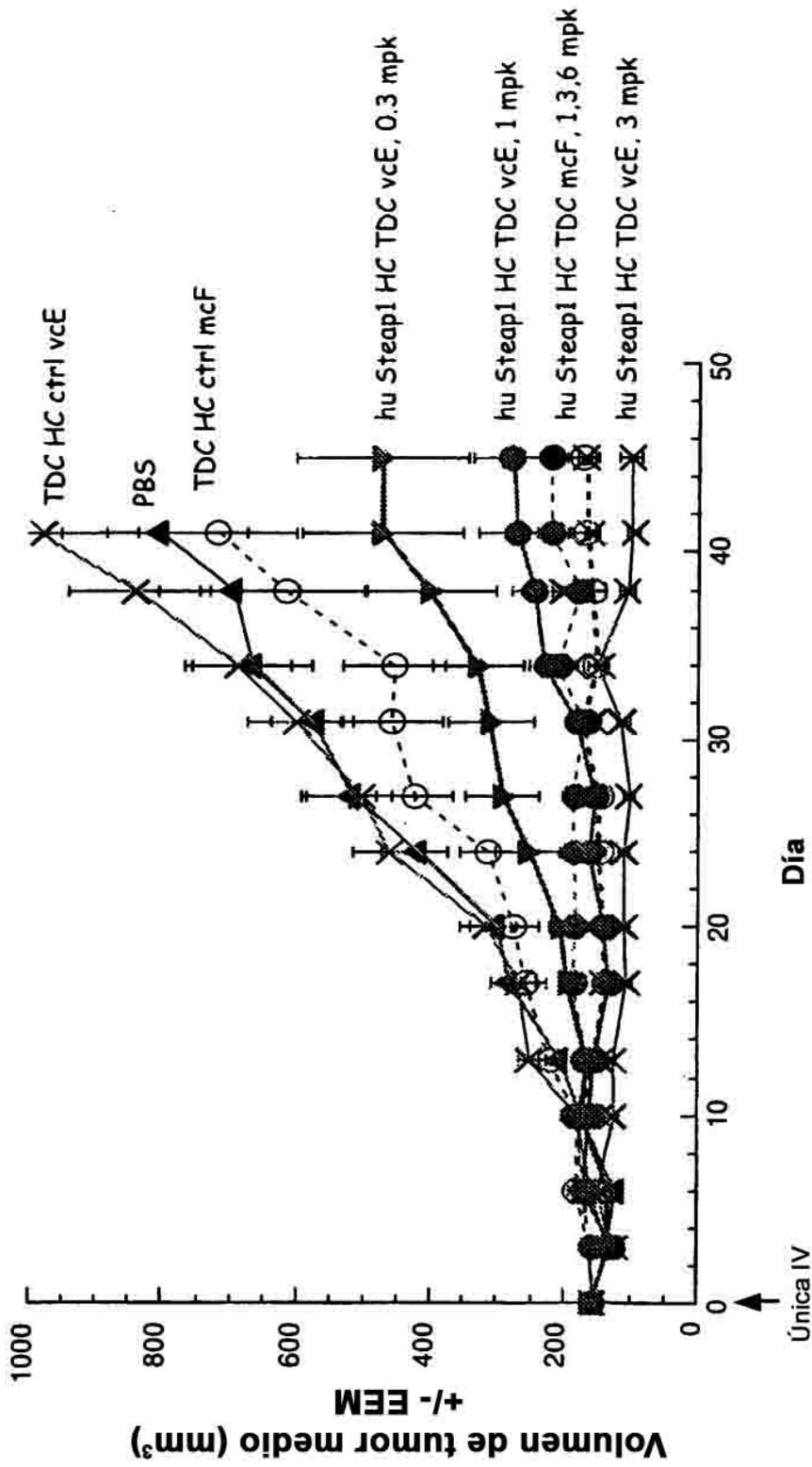


Figura 21

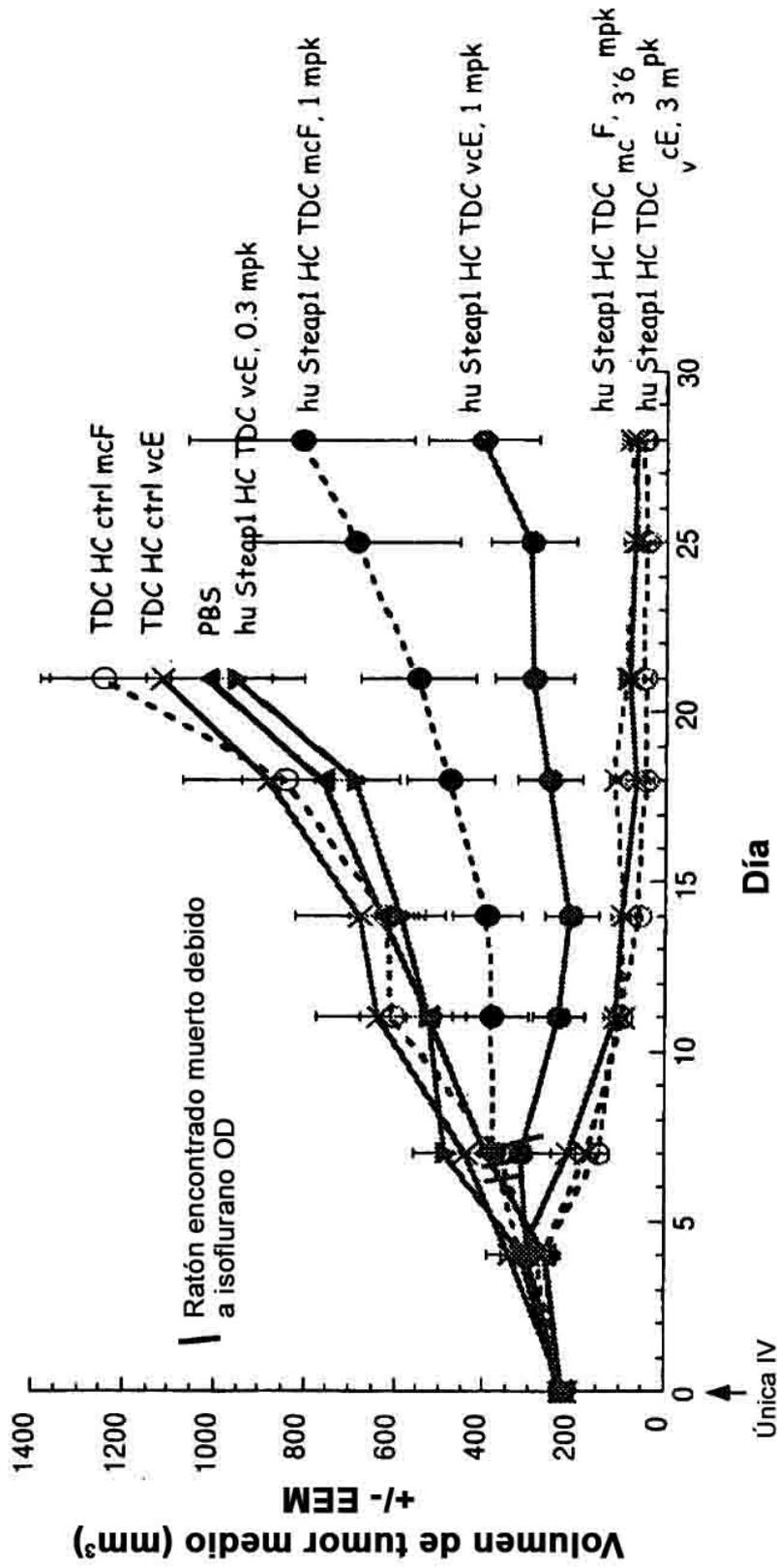


Figura 22

Diferencias de 120VL-Kappa I frente a IV

Kabat#	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37
	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Kabat - CDR L1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Chothia - CDR L1</div>
120	D I V M S Q S P S S L A V S V G E K V T M S C K S S Q S L L Y R S N Q K N Y L A W Y Q
Simmons IV 120.v24	D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S L L Y R S N Q K N Y L A W Y Q D I Q M T Q S P S L S A S V G D R V T I C K S S Q S L L Y R S N Q K N Y L A W Y Q * * * * *
Kabat#	38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 A 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Kabat - CDR L2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Chothia - CDR L2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Contacto - CDR L2</div>
120	Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V K A
Simmons IV 120.v24	Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q A Q K P G K A P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P * * * * *
Kabat#	81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 A B C D E F 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108
	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Kabat - CDR L3</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Chothia - CDR L3</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Contacto - CDR L3</div>
120	E D L A V Y Y C Q Q Y Y N Y P R T F G G G T K V E I K R
Simmons IV 120.v24	E D V A V Y Y C Q Q Y Y N Y P R T F G Q G T K V E I K R E D F A T Y Y C Q Q Y Y N Y P R T F G Q G T K V E I K R * * * * *

Figura 23 (PARTE 1)

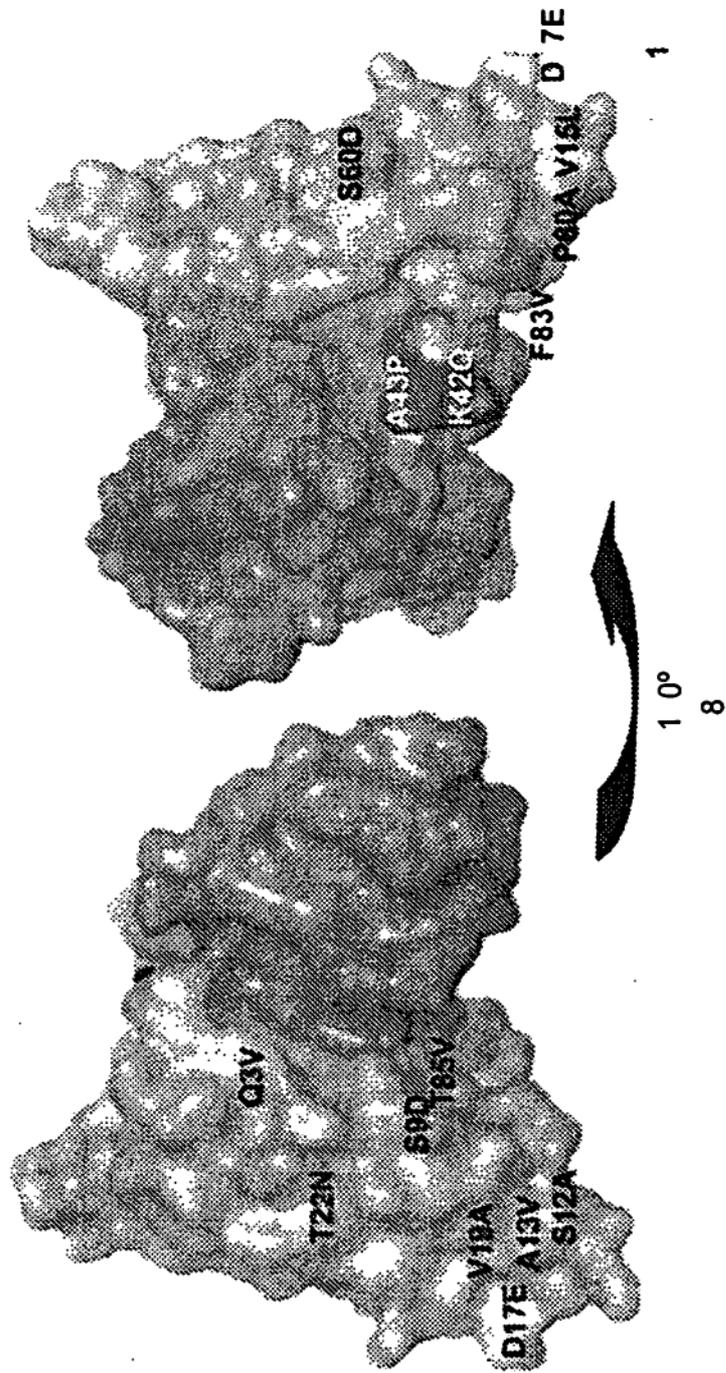
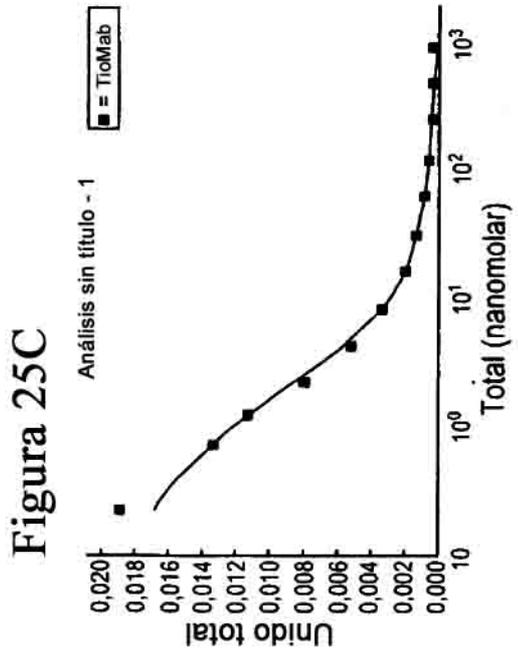
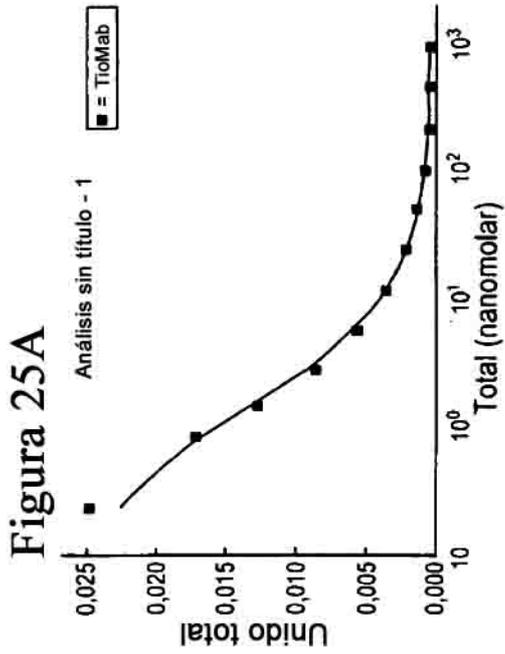
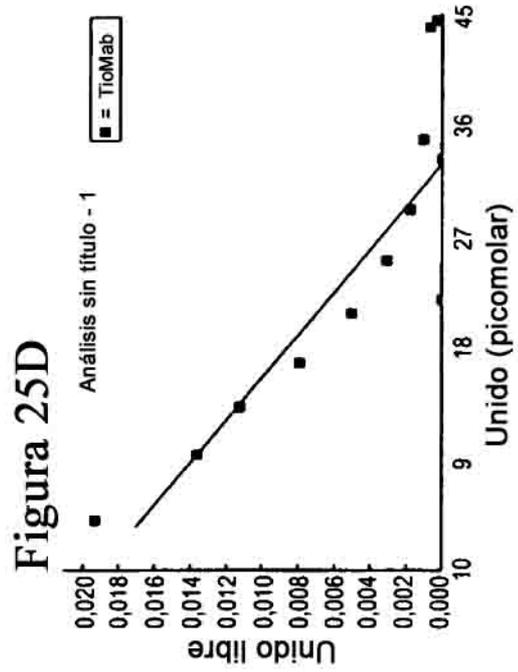
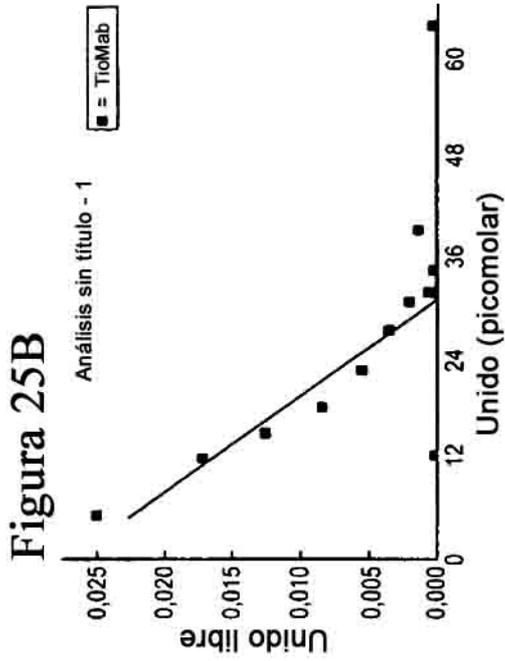
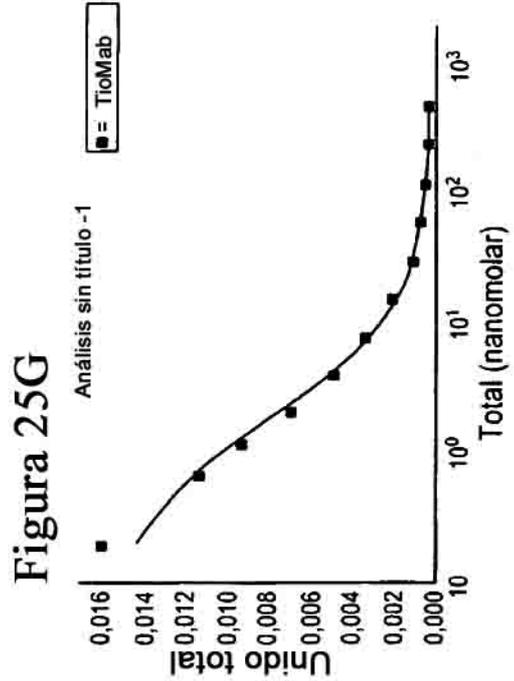
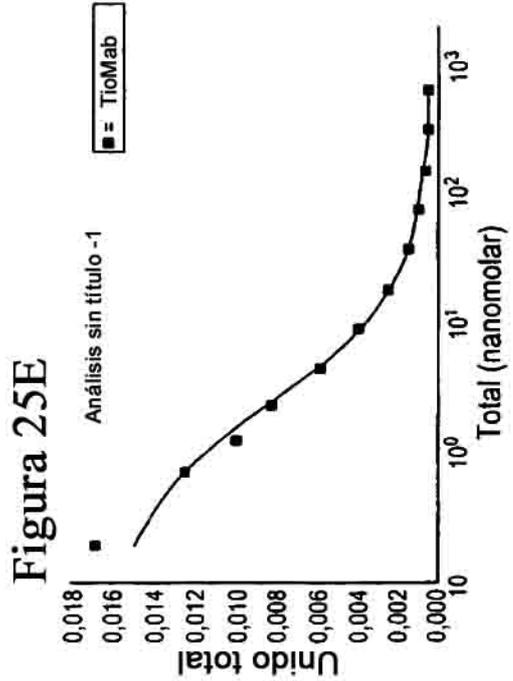
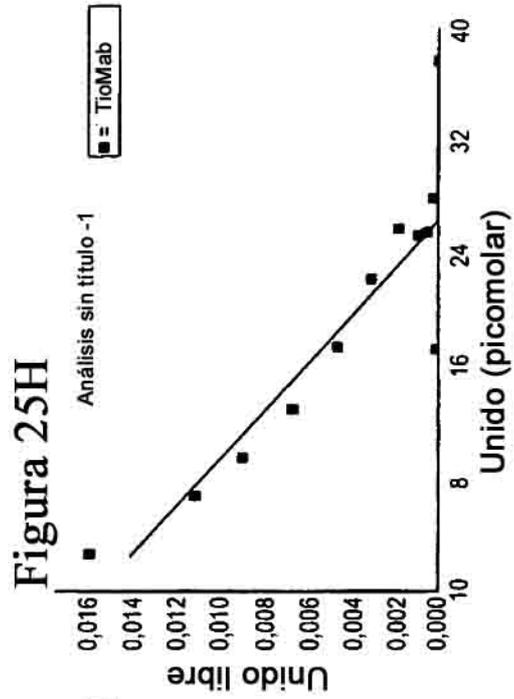
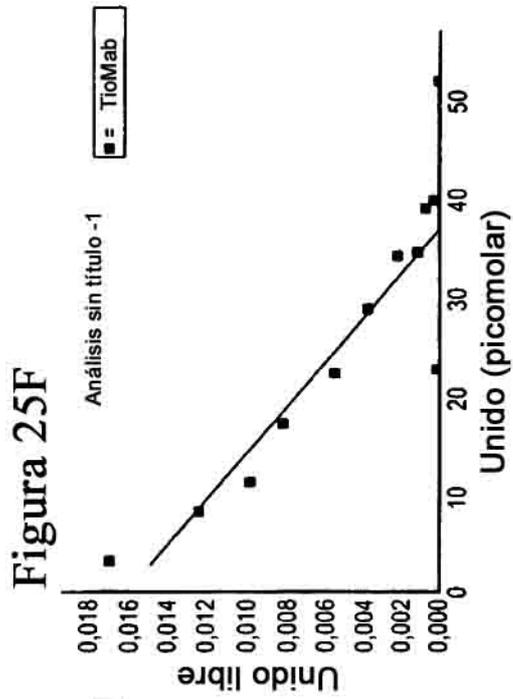


Figura 23 (PARTE 2)



Tio-120V24 original
 Ensayo 739:
 Células LNCaP.BR
 KD= 1,1 nM

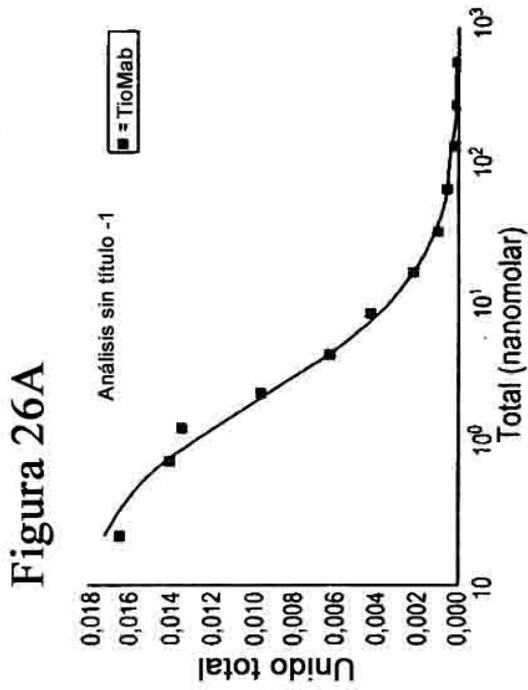
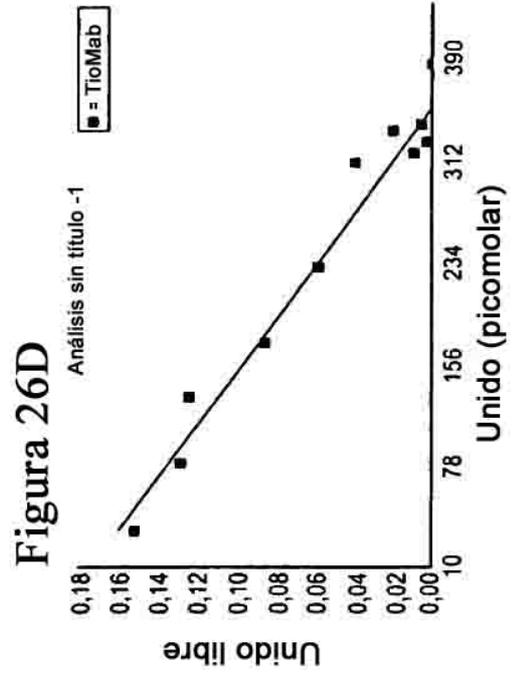
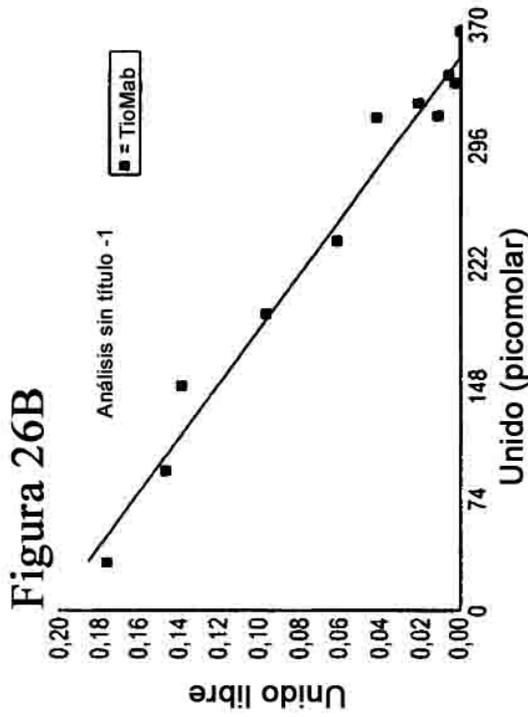
Ensayo 740:
 Células LNCaP.BR
 KD= 1,7 nM



120V24
Tio-SGIV

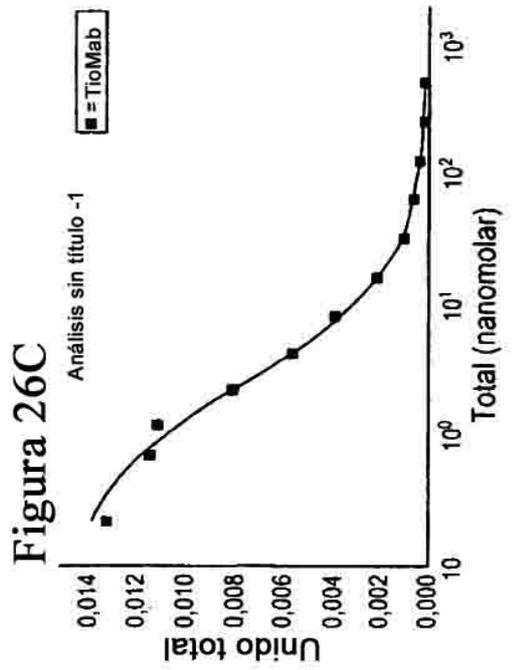
Ensayo 733:
Células LNCaP.BR
KD= 2,3 nM

Ensayo 734:
Células LNCaP.BR
KD= 1,9 nM



Tio-120V24
original

Ensayo 737:
Células 293.LB50
KD= 1,7 nM



Ensayo 738:
Células LNCaP.BR
KD= 2,0 nM

Figura 26F

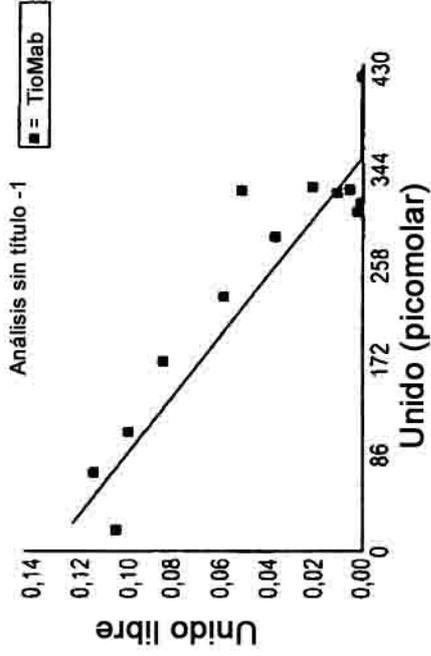


Figura 26H

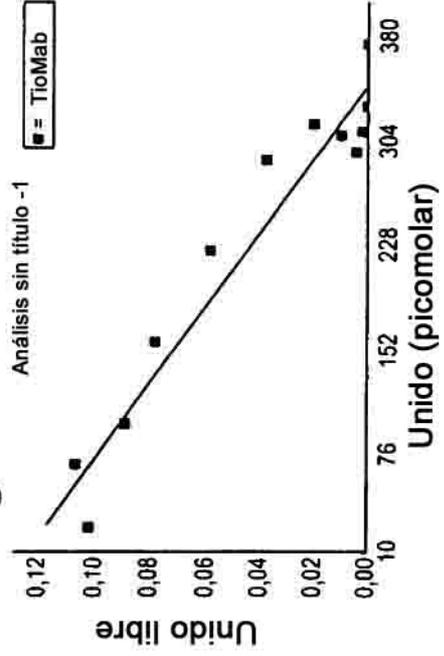
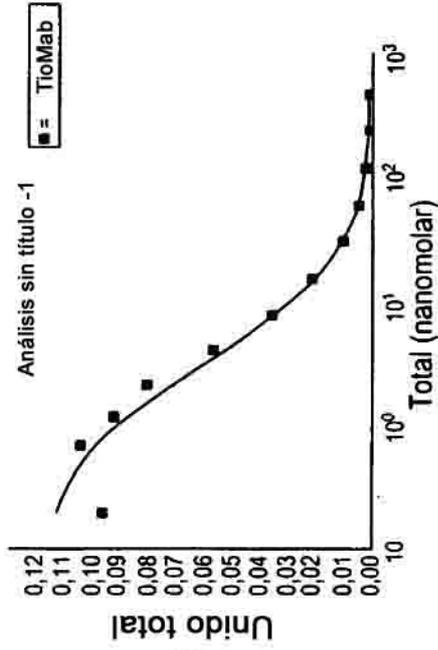
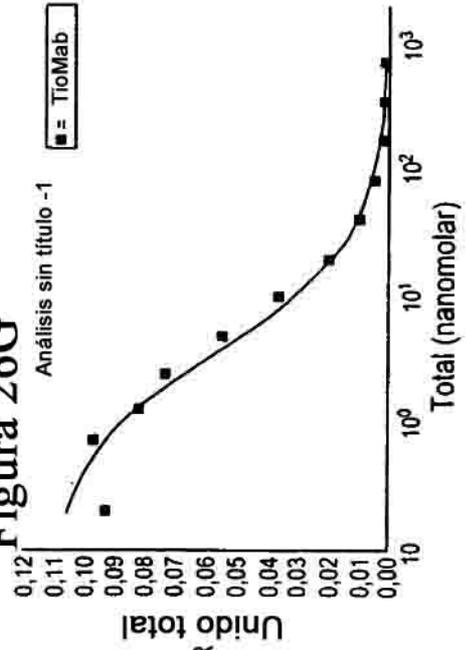


Figura 26E



120V24
Tio-SGIV
Ensayo 735:
Células 293.LB50
KD= 2,7 nM

Figura 26G



Ensayo 736:
Células LNCaP.BR
KD= 2,8 nM

Scatchard de anticuerpos para Steap 1 humanizados

Análisis de Scatchard

	murino		quimera de Fc 120v24 humano		tio orig	tio-SGIV
	$\alpha 179$	$\alpha 120$	PUR 10162)	PUR 11712)	PUR 12813)	PUR 14951)
PC3-PS5.4	~23,4 nM ~5.920	17,5 nM 187.256	9,9 nM 103.204		1,9 nM	1,5X 2,8 nM
293-LB50	4,7 nM 25.368	4,7 nM 301.100	4,9 nM 252.892	2,2 nM 264.172	1,4 nM	2,1 nM
LNCaP-BR	3,3 nM 2.626	1,5 nM 37.207	0,9 nM 22.021			

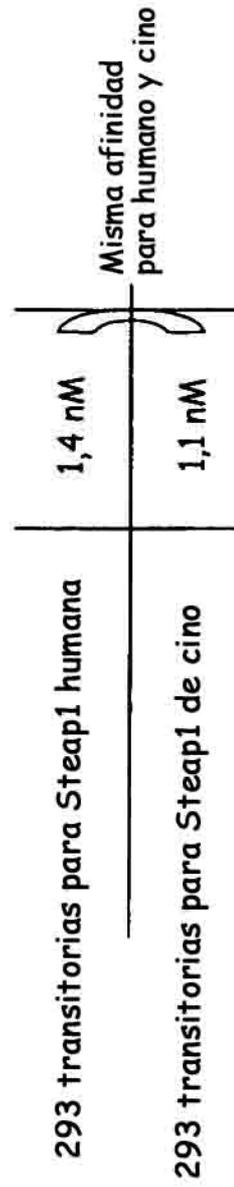


Figura 27

Figura 28B

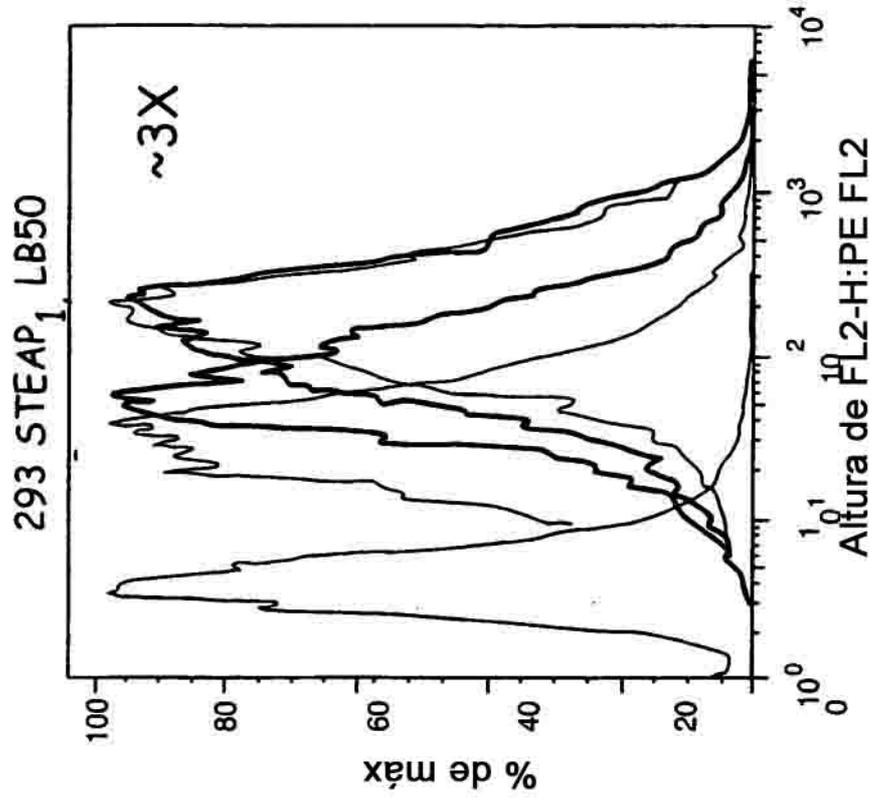


Figura 28A

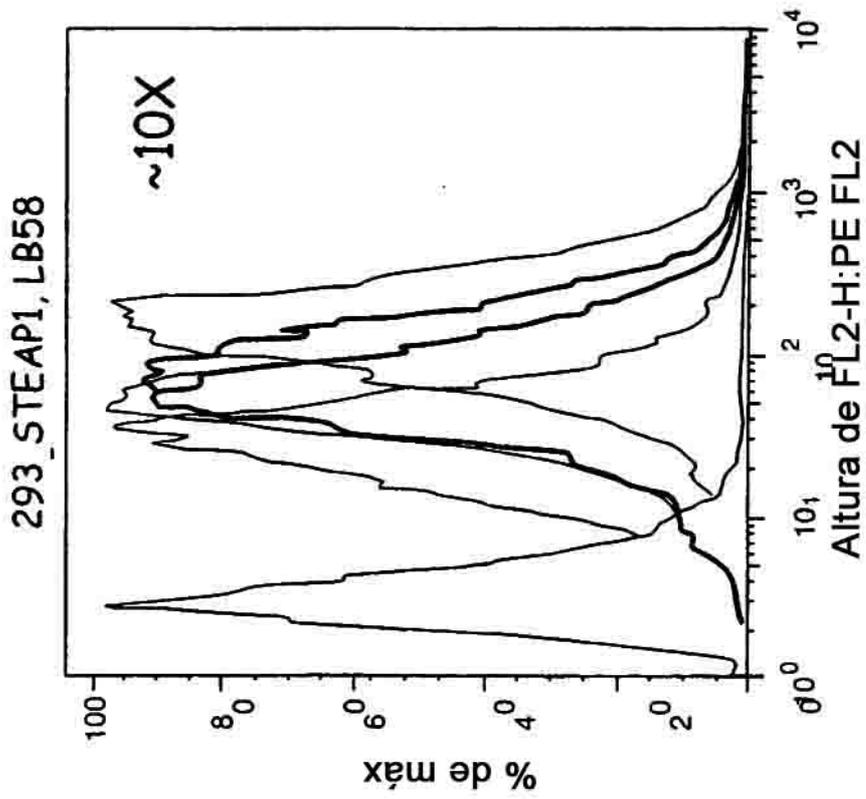


Figura 28D

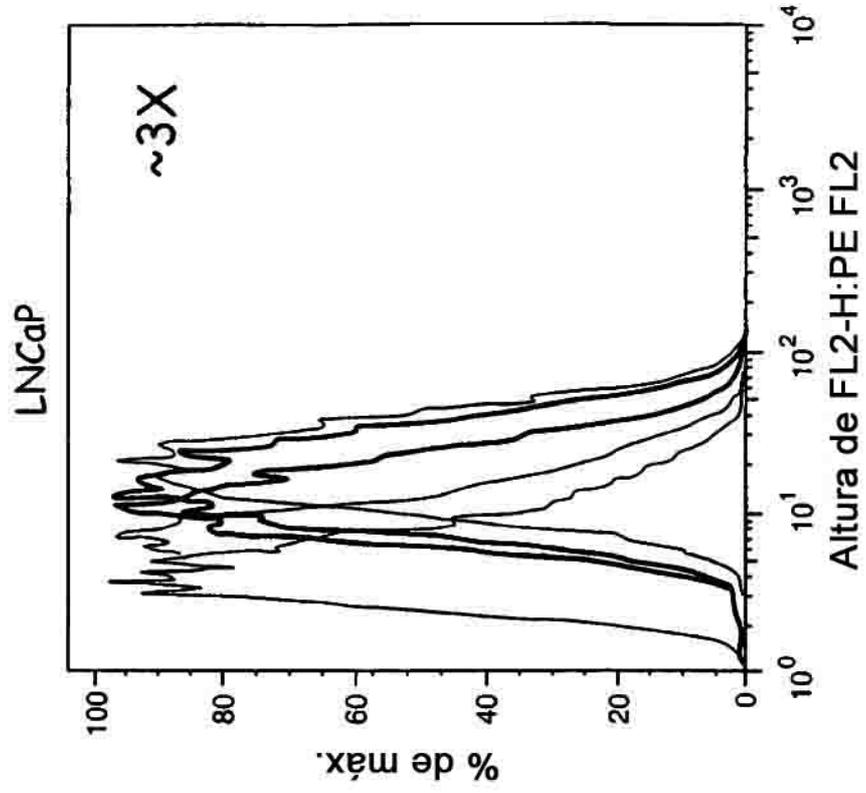
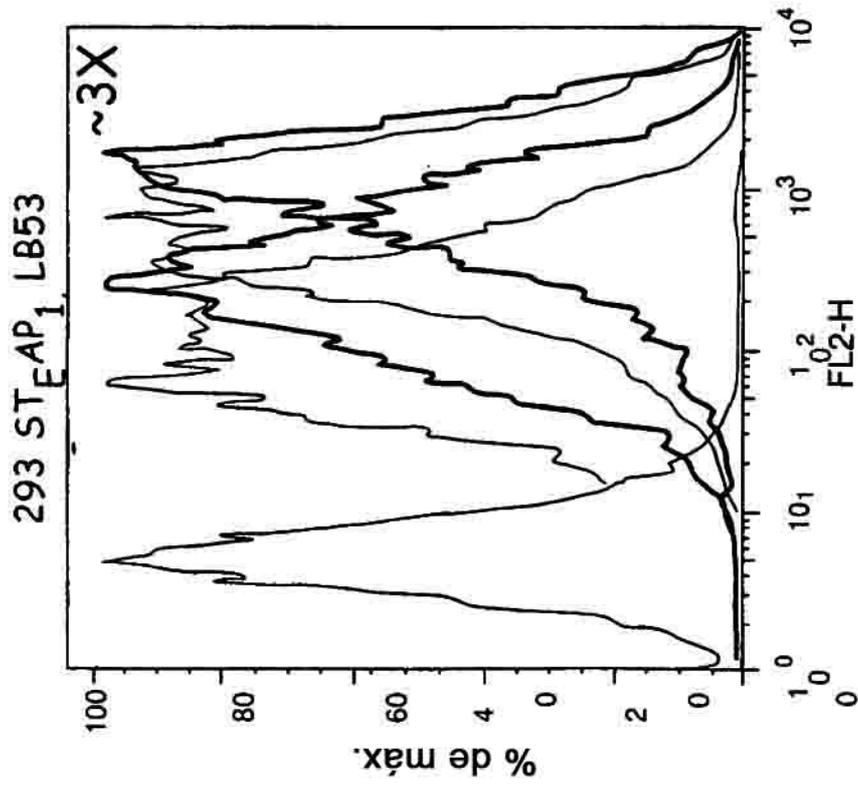


Figura 28C



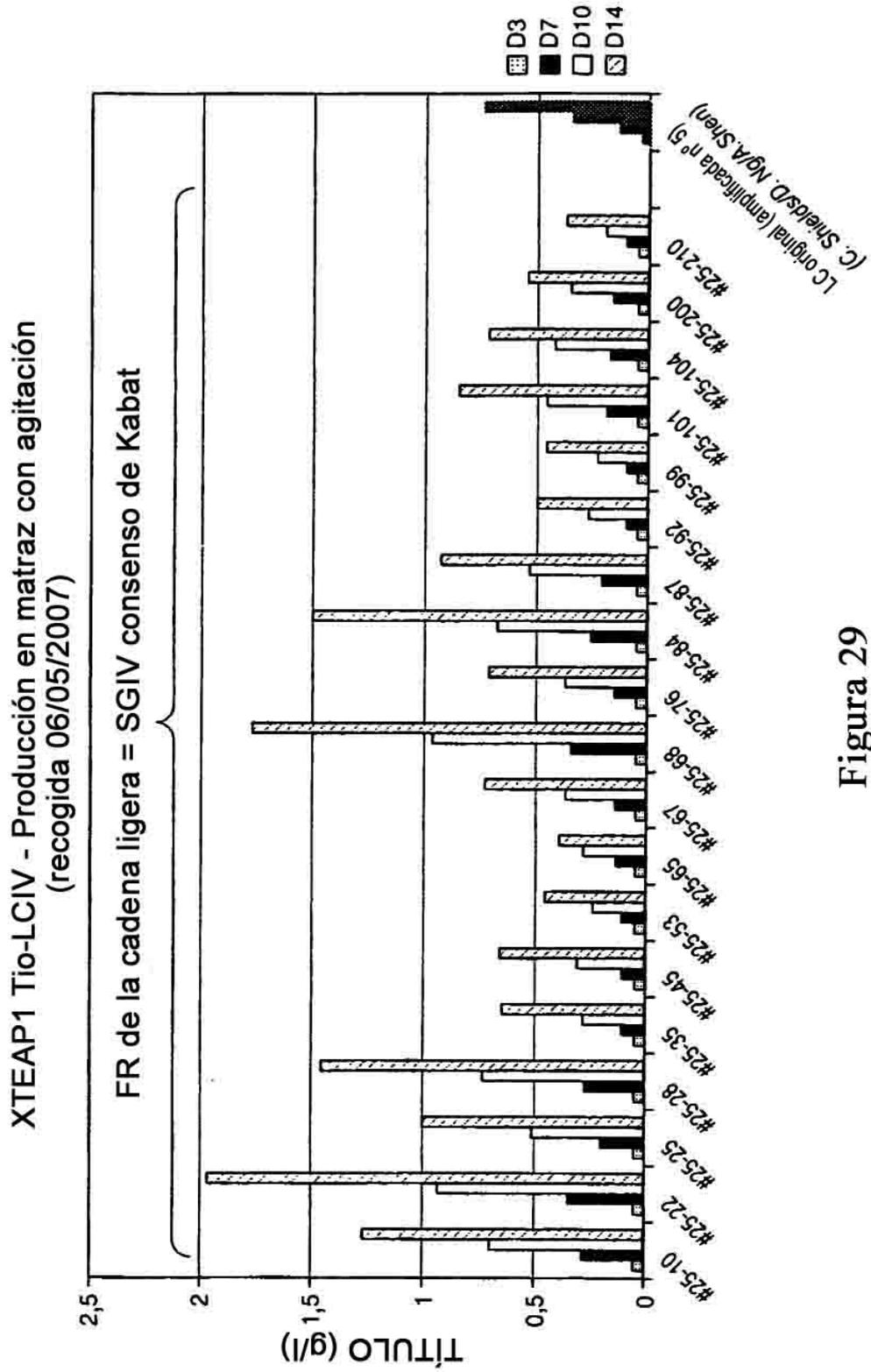


Figura 29