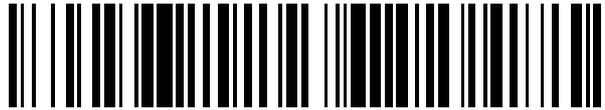


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 450 755**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2008 E 08839947 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 2209808**

54 Título: **Anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína, y conjugados de anticuerpo y fármaco**

30 Prioridad:

19.10.2007 US 981411 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.03.2014

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**MAO, WEIGUANG;
JUNUTULA, JAGATH, REDDY y
POLAKIS, PAUL**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 450 755 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 anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína, y conjugados de anticuerpo y fármaco

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere, en general, a anticuerpos modificados por ingeniería genética con restos de cisteína reactivos y, más específicamente, a anticuerpos con aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico. Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína se pueden conjugar con fármacos quimioterapéuticos, toxinas, ligandos de afinidad tales como la biotina y marcadores de detección tales como fluoróforos. La solicitud también describe métodos de uso de anticuerpos y compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco para el diagnóstico o el tratamiento *in vitro*, *in situ* e *in vivo* de células de mamífero, o afecciones patológicas asociadas.

15 **Antecedentes de la invención**

La terapia con anticuerpos se ha establecido para el tratamiento dirigido de pacientes con cáncer, y trastornos inmunológicos y angiogénicos. Los polipéptidos asociados a la transmembrana o a tumores expresados específicamente en la superficie de las células cancerosas en comparación con la/s célula/s normal/es, no cancerosa/s, se han identificado como dianas celulares para el diagnóstico del cáncer y la terapia con anticuerpos. La identificación de dichos polipéptidos de antígenos de la superficie celular asociados a tumores, es decir, antígenos asociados a tumores (AAT), permite la dirección específica hacia las células cancerosas para su destrucción a través de terapias basadas en anticuerpos.

El uso de conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC), es decir, inmunoconjugados, para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para eliminar o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Lambert, J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543-549; Wu *et al.*, (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3: 207-212; Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drug Del. Rev.* 26:151-172; US 4975278) permite la administración específica del resto de fármaco a los tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, donde la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados puede producir niveles inaceptables de toxicidad para las células normales, así como para las células tumorales que se deseen eliminar (Baldwin *et al.*, (1986) *Lancet* pág. (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 *et al.*, (editores), pág. 475-506). Los esfuerzos para mejorar el índice terapéutico, es decir, la eficacia máxima y la toxicidad mínima de los ADC, se han centrado en la selectividad de anticuerpos policlonales (Rowland *et al.*, (1986) *Cancer Immunol. Immunother*, 21: 183-87) y anticuerpos monoclonales (mAb), así como en las propiedades de unión a fármacos y de liberación de fármacos (Lambert, J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543-549). Los restos de fármaco usados en los conjugados de anticuerpo y fármaco incluyen toxinas proteicas bacterianas tales como la toxina de la difteria, toxinas de proteínas vegetales tales como ricina, pequeñas moléculas tales como auristatinas, geldanamicina (Mandler *et al.*, (2000) *J. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler *et al.*, (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 025-1028; Mandler *et al.*, (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 93:8618-8623), caliqueamicina (Lode *et al.*, (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman *et al.*, (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342), daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland *et al.*, (1986) *supra*). Los restos de fármaco pueden afectar a los mecanismos citotóxicos y citostáticos, incluyendo la unión a tubulina, la unión a ADN o la inhibición de la topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando están conjugados con anticuerpos grandes o ligandos de receptores de proteínas.

Los péptidos auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina (WO 02/088172), se han conjugado como restos de fármaco a: (i) anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos de Lewis Y en carcinomas); (ii) cAC10 que es específico de CD30 en neoplasias hematológicas (Klussman, *et al.*, (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15 (4): 765-773; Doronina *et al.*, (2003) *Nature Biotechnology* 21 (7): 778-784; Francisco *et al.*, (2003) *Blood* 102 (4): 1458-1465; US 2004/0018194); (iii) anticuerpos anti-CD20, tales como rituxán (WO 04/032828) para el tratamiento de los cánceres que expresan el CD20 y trastornos inmunes; (iv) anticuerpo anti-EphB2R 21-19 para el tratamiento del cáncer colorrectal (Mao *et al.*, (2004) *Cancer Research* 64 (3): 781-788); (v) anticuerpo E-selectina (Bhaskar *et al.*, (2003) *Cancer Res.* 63:6387-6394); (vi) trastuzumab (HERCEPTIN®, US 2005/0238649); y (vii) anticuerpos anti-CD30 (WO 03/043583). En los documentos US 5767237 y US 6124431, se desvelan variantes de auristatina E. En Senter *et al.*, "Proceedings of the American Association for Cancer Research", volumen 45, Número de sumario 623, presentado el 28 de marzo de 2004, se desvela la monometil-auristatina E conjugada a anticuerpos monoclonales. Los análogos de auristatina MMAE y MMAF se han conjugado con diversos anticuerpos (US 2005/0238649).

Los medios convencionales de fijación, es decir, la unión a través de enlaces covalentes, de un resto de fármaco con un anticuerpo, generalmente, conducen a una mezcla heterogénea de moléculas en la que los restos de fármaco están unidos a una serie de sitios del anticuerpo. Por ejemplo, los fármacos citotóxicos, por lo general, se han conjugado con anticuerpos a través de los, a menudo numerosos, restos de lisina de un anticuerpo, generando una mezcla heterogénea de conjugados de anticuerpo y fármaco. Dependiendo de las condiciones de reacción, la

mezcla heterogénea normalmente contiene una distribución de anticuerpos con de 0 a aproximadamente 8, o más, restos de fármaco unidos. Además, dentro de cada subgrupo de conjugados con una determinada proporción en números enteros de restos de fármaco con respecto al anticuerpo, hay una mezcla potencialmente heterogénea en la que el resto de fármaco se une a varios sitios del anticuerpo. Los métodos analíticos y preparativos pueden no ser adecuados para separar y caracterizar las moléculas de las especies de conjugados de anticuerpo y fármaco dentro de la mezcla heterogénea resultante de una reacción de conjugación. Los anticuerpos son biomoléculas grandes, complejas y estructuralmente diversas, a menudo con muchos grupos funcionales reactivos. Sus reactividades con reactivos enlazadores y productos intermedios de fármaco y enlazador dependen de factores tales como el pH, la concentración, la concentración de sal y los codisolventes. Además, el proceso de conjugación de múltiples etapas puede no ser reproducible debido a las dificultades en el control de las condiciones de reacción, y la caracterización de los reactivos y productos intermedios.

Los tioles de cisteína son reactivos a pH neutro, a diferencia de la mayoría de las aminas, que están protonadas y son menos nucleófilas cerca del pH 7. Como los grupos tiol libres (RSH, sulfhidrilo) son relativamente reactivos, las proteínas con restos de cisteína suelen existir en su forma oxidada como oligómeros ligados por disulfuro o tienen grupos disulfuro puenteados internamente. Las proteínas extracelulares, en general, no tienen tioles libres (Garman, 1997, "Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press", Londres, pág. 55). Los grupos tiol de cisteína de los anticuerpos son generalmente más reactivos, es decir, más nucleófilos, hacia los reactivos de conjugación electrófilos que los grupos amina o hidroxilo de los anticuerpos. Los restos de cisteína se han introducido en las proteínas mediante técnicas de ingeniería genética para formar enlaces covalentes con ligandos o para formar nuevos enlaces disulfuro intramoleculares (Better *et al* (1994) *J. Biol. Chem.* 13:9644-9650; Bernhard *et al* (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:126-132; Greenwood *et al* (1994) *Therapeutic Immunology* 1:247-255; Tu *et al* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 96:4862-4867; Kanno *et al* (2000) *J. of Biotechnology*, 76:207-214; Chmura *et al* (2001) *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 98(15):8480-8484; US 6248564). Sin embargo, la ingeniería genética en los grupos tiol de cisteína mediante la mutación de varios restos de aminoácidos de una proteína en aminoácidos de cisteína es potencialmente problemática, particularmente en el caso de los restos no apareados (Cys libres) o aquellos que son relativamente accesibles para la reacción u oxidación. En las soluciones concentradas de la proteína, ya sea en el periplasma de *E. coli.*, sobrenadantes de cultivo, o proteína parcial o totalmente purificada, los restos de Cys no apareados de la superficie de la proteína pueden formar pares y oxidarse para formar disulfuros intermoleculares y, por lo tanto, dímeros o multímeros de proteínas. La formación de dímeros de disulfuro vuelve a la nueva Cys no reactiva para la conjugación con un fármaco, ligando u otro marcador. Por otra parte, si la proteína forma en condiciones de oxidación un enlace disulfuro intramolecular entre el resto de Cys recién modificado por ingeniería genética y un resto de Cys existente, ambos grupos tiol de Cys no están disponibles para participar e interactuar en el sitio activo. Además, la proteína se puede volver inactiva o inespecífica por el mal plegamiento o la pérdida de la estructura terciaria (Zhang *et al* (2002) *Anal. Biochem.* 311: 1-9).

Se han diseñado anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína en forma de fragmentos de anticuerpos Fab (tioFab) y se han expresado como anticuerpos monoclonales IgG (tioMab) de longitud completa (US 2007/0092940). Los anticuerpos TioFab y TioMab se han conjugado a través de enlazadores en los tioles de cisteína recién introducidos con reactivos enlazadores reactivos con tiol y reactivos enlazadores de fármacos para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC de Tio).

El TENB2 es un polipéptido antigénico asociado a los tumores (conocido también como PR1), y la proteína TBNB2 contiene 2 dominios de tipo folistatina y un dominio de tipo EGF conservado. El gen que codifica la proteína se caracterizó por primera vez a partir de una biblioteca de ADNc de cerebro humano (véase Uchida, *et al.* (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:593-602) y, más tarde, se aisló de una biblioteca de ADNc de cerebro fetal humano (véase Horie *et al.* (2000) *Genomics* 67:146-152). Véase también, por ejemplo, "Online Mendelian Inheritance in Man", número 605734; Unigene Cluster Hs.22791; LocusLink 23671; y otros sitios vinculados. El TENB2 se ha denominado PR I, tomorregulina, TR, gen de la poliposis hiperplásica 1, HPP1 y TMEFF2. Su secuencia de ácido nucleico se puede identificar por los números de registro ATCC AF264150, AB004064, AB017269 y AF179274; y su secuencia de aminoácidos se puede identificar por los números de registro ATCC AAF91397, BAA90820, BAA87897 y AAD55776. El número de identificación de UniGene Cluster de TENB2 es hs.22791, el número de identificación de Locuslink es 23671 y número de identificación de OMIM es 605734.

El gen también se ha implicado en ciertos estados cancerosos. Young *et al.*, (2001) *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 98:265-270 informaron de la expresión en pólipos colorrectales. Glynne-Jones, *et al.* (2001) *Int. J. Cancer* 94:178-184 lo publicaron como un marcador para el cáncer de próstata.

Debido a su sobreexpresión en ciertos tumores humanos, el polipéptido TENB2 y el ácido nucleico que codifica dicho polipéptido son dianas para las comparaciones cuantitativas y cualitativas entre diferentes muestras de tejido de mamífero. Los perfiles de expresión únicos del polipéptido TENB2, y el ácido nucleico que codifica dicho polipéptido, se pueden aprovechar para el diagnóstico y el tratamiento terapéutico de ciertos tipos de tumores cancerosos en los mamíferos.

Recientemente, se desvelaron ciertos anticuerpos anti-TENB2, incluyendo el anticuerpo anti-TMEFF2 N° 19, y demostraron ser interiorizados y útiles para el tratamiento de afecciones proliferativas de la próstata, incluyendo, por

ejemplo, la hiperplasia benigna de próstata y el cáncer de próstata (PCT/US03/07209, N° de serie US 10/383447, presentada el 7 de marzo de 2003; Vinay *et al.*, "Antibodies Against Cancer Antigen TMEFF2 and Uses Thereof").

Sumario

5

La presente invención es como se expone en las reivindicaciones.

10

En el presente documento, se describe un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína que comprende uno o más aminoácidos de cisteína libres y una secuencia seleccionada de entre SEC ID N° 8-23. El anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína se puede unir a un polipéptido TENB2. Los antígenos asociados a tumores (AAT), tales como los polipéptidos TENB2, se pueden preparar para su uso en la generación de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína usando métodos e información que son bien conocidos en la técnica y, por ejemplo, en el documento PCT/US03/07209. Los anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína se pueden preparar mediante un proceso que comprende el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos de un anticuerpo anti-TENB2 parental por cisteína.

15

El uno o más restos de aminoácidos de cisteína libres de los anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína se ubican en una cadena ligera o una cadena pesada.

20

En un aspecto, la invención incluye un método para determinar la presencia de una proteína TENB2 en una muestra sospechosa de contener dicha proteína, comprendiendo dicho método exponer dicha muestra a un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína y determinar la unión de dicho anticuerpo a dicha proteína TENB2 en dicha muestra, en el que la unión del anticuerpo a dicha proteína indica la presencia de dicha proteína en dicha muestra como se expone en las reivindicaciones.

25

Los anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína se pueden usar como anticuerpos desnudos (no conjugados a un resto de fármaco o marcador) o como conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC). El anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína se puede unir covalentemente a un resto de fármaco auristatina, mediante lo que se forma un conjugado de anticuerpo y fármaco. El conjugado de anticuerpo y fármaco puede comprender un anticuerpo (Ab) anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína y un resto de fármaco auristatina (D), en el que el anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína está unido a través de uno o más aminoácidos de cisteína libres por un resto enlazador (L) a D; teniendo el compuesto la Fórmula I:

30



35

en la que p es 1, 2, 3 o 4. Los restos de fármaco auristatina incluyen MMAE y MMAF.

40

Un aspecto de la invención es un ensayo para detectar células cancerosas que comprende: (a) exponer las células a un compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco; y (b) determinar el grado de unión del compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco con las células según lo expuesto en las reivindicaciones.

45

Un aspecto de la invención es una formulación farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo y fármaco, y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable según lo expuesto en las reivindicaciones.

50

Un aspecto de la invención es un método de inhibición de la proliferación celular que comprende el tratamiento de células tumorales de mamífero en un medio de cultivo celular con un compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco, mediante lo que se inhibe la proliferación de las células tumorales según lo expuesto en las reivindicaciones.

55

También se describe en el presente documento un método para tratar el cáncer que comprende la administración, a un paciente, de la formulación farmacéutica. El paciente puede recibir un agente quimioterapéutico en combinación con el compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco.

60

Un aspecto de la invención es un artículo de fabricación que comprende la formulación farmacéutica, un recipiente y un prospecto o etiqueta que indica que el compuesto se puede usar para tratar el cáncer caracterizado por la sobreexpresión de un polipéptido TENB2 según lo expuesto en las reivindicaciones.

65

Un aspecto de la invención es un método para fabricar un compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco de Fórmula I que comprende las etapas de: (a) hacer reaccionar un grupo cisteína diseñado por ingeniería genética del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con un reactivo enlazador para formar un producto intermedio de anticuerpo y enlazador Ab-L; y (b) hacer reaccionar el Ab-L con un resto de fármaco activado D; mediante lo que se forma el conjugado de anticuerpo y fármaco; o que comprende las etapas de: (c) hacer reaccionar un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo enlazador para formar un producto intermedio fármaco y enlazador D-L; y (d) hacer reaccionar el D-L con un grupo cisteína diseñado por ingeniería genética del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína, mediante lo que se forma el conjugado de anticuerpo y fármaco según lo expuesto en las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

- 5 La Figura 1 muestra la secuencia de la cadena pesada: SEC ID N°: 1, y la secuencia de la cadena ligera: SEC ID N°: 2 del anticuerpo anti-TENB2 humanizado TMEFF2 N° 19 hu.
- La Figura 2 muestra la secuencia de la cadena pesada: SEC ID N°: 3, y la secuencia de la cadena ligera: SEC ID N°: 2 de un anticuerpo anti-TENB2 humanizado modificado por ingeniería genética con cisteína, TMEFF2 N° 19 tio hu A121C. La secuencia señal no se incluye en la numeración secuencial del anticuerpo anti-TENB2.
- 10 La Figura 3 muestra la alineación de la cadena ligera de trastuzumab humanizado (LC de HuTMAB, SEC ID N°: 4) y la cadena ligera de TMEFF2 N° 19 hu (SEC ID N°: 5). La numeración sigue la convención de numeración secuencial.
- 15 La Figura 4 muestra la alineación de la cadena pesada de trastuzumab humanizado (HC de HuTMAB, SEC ID N°: 6), y la cadena pesada de TMEFF2 N° 19 hu (SEC ID N°: 7). La numeración sigue la convención de numeración secuencial.
- 20 La Figura 5 muestra representaciones de conjugados de anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína y fármaco (ADC) en los que un resto de fármaco está unido a un grupo cisteína diseñado por ingeniería genética en: la cadena ligera (LC-ADC); la cadena pesada (HC-ADC); y la región Fc (Fc-ADC).
- 25 La Figura 6 muestra las etapas de: (i) reducir aductos de disulfuro de cisteína, y disulfuros intercatenarios e intracatenarios de un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína (TioMab); (ii) oxidar parcialmente, es decir, reoxidar para volver a formar los disulfuros intercatenarios e intracatenarios; y (iii) conjugación del anticuerpo reoxidado con un producto intermedio de fármaco y enlazador para formar un conjugado (ADC) de anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína y fármaco.
- 30 La Figura 7 muestra la expresión de TENB2 en tejidos humanos cancerosos y normales: el análisis de micromatrices de oligonucleótidos se realizó en ARN extraído de 4.841 muestras de tejidos humanos. Cada recuadro de la gráfica proporciona una intensidad de la señal (diferencia media a escala de 100) para TENB2 para una muestra del tejido indicado. Los recuadros verdes son el tejido normal, los recuadros rojos son los tumores y los recuadros azules representan otros tejidos enfermos.
- 35 La Figura 8 muestra la expresión de TENB2 en tumores de próstata humanos: los paneles superiores e inferiores son de modelos de explantes de próstata humanos, línea celular estable de medio PC3TENB2 con el control de vectores y el tumor de próstata, respectivamente.
- 40 La Figura 9 muestra la interiorización del anticuerpo monoclonal TENB2 (mAb) en la línea celular de medio PC3TENB2 y el tumor LuCaP 70.
- La Figura 10 muestra los datos de FACS en células de medio PC3TENB2 con tío o tratamiento convencional con ADC de anti-TENB2.
- 45 La Figura 11 muestra un ensayo de destrucción celular en células de medio PC3TENB2 con ADC de anti-TENB2 convencional y tío-anti-TENB2.
- La Figura 12 muestra un estudio de eficacia en las células de medio PC3TENB2 usando ACF de anti-TENB2 y tío-anti-TENB2 (conjugados con vc-MMAE o MC-MMAF).
- 50 La Figura 13 muestra una transferencia Western con diversos tejidos tumorales de explantes LuCaP usando anticuerpo anti-TENB2 humanizado (TMEFF2 N° 19 hu).
- La Figura 14 muestra experimentos con xenoinjertos usando LuCaP 70, 77 y 96.1 de cáncer de próstata humano.
- 55 La Figura 15 muestra la evaluación farmacocinética de ratas usando ADC de tío-anti-TENB2 y convencionales.
- La Figura 16 muestra una evaluación de la seguridad en ratas con anti-TENB2-vc-MMAE frente a MC-MMAF.
- 60 La Figura 17 muestra una evaluación de la seguridad en macacos con anti-TENB2-vc-MMAE frente a anti-TENB2-MC-MMAF.
- La Figura 18 muestra una evaluación de la seguridad en ratas con tío-anti-TENB2-vc-MMAE frente a anti-TENB2-vc-MMAE.
- 65

Descripción detallada de realizaciones ejemplares

A continuación, se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en las estructuras y las fórmulas con las que se acompañan.

5

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, las expresiones y los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por el experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención, y coinciden con: Singleton *et al* (1994) "Dictionary of Microbiology and Molecular Biology". II Ed., J. Wiley & Sons, Nueva York, NY; y Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) "Immunobiology", V Ed., Garland Publishing, Nueva York.

10

15

20

25

30

El término "anticuerpo", en el presente documento, se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Miller *et al* (2003) *Jour of Immunology* 170:4854-4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies. Un anticuerpo es una proteína que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) "Immuno Biology", V edición., Garland Publishing, Nueva York). Un antígeno diana, en general, tiene numerosos sitios de unión, también denominados epítomos, reconocidos por las CDR en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítomo diferente tiene una estructura diferente. Por lo tanto, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión al antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno de una diana de interés o parte de la misma, incluyendo tales dianas, pero sin limitación, células cancerosas o células que producen anticuerpos autoinmunes asociados con una enfermedad autoinmune. La inmunoglobulina desvelada en el presente documento puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden proceder de cualquier especie tal como humana, murina o de conejo. Para consultar la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, "Basic and Clinical Immunology", VIII edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (Eds.). Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, pág. 71 y Capítulo 6.

35

40

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente, la región variable o de unión al antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; minicuerpos (US 5641870, Ejemplo 2; Zapata *et al* (1995) *Protein Eng.* 8 (10): 1057-1062); Olafsen *et al* (2004) *Protein Eng. Design & Sel.* 17 (4): 315-323), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), RDC (región determinante de la complementariedad) y fragmentos de unión a epítomo de cualquiera de los anteriores que se unen inmuno-específicamente a antígenos de las células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

45

50

55

60

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, a excepción de posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se pueden sintetizar sin contaminación por otros anticuerpos. El adjetivo "monoclonal" indica que el anticuerpo se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención se pueden crear mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al* (1975) *Nature* 256:495, o se pueden crear mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo: US 4816567; US 5807715). En el método del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, como se describe anteriormente para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Tras la inmunización, los linfocitos se aíslan y, a continuación, se fusionan con una línea celular de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, (1986) "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", pág. 59-103 Academic Press). Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al* (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks *et al* (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597.

65

El ADN que codifica el anticuerpo se puede modificar para producir polipéptidos de anticuerpos quiméricos o de fusión, por ejemplo, mediante la sustitución de secuencias humanas del dominio constante de cadena pesada y cadena ligera (C_H y C_L) con las secuencias murinas homólogas (US 4816567 y Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU.*, 81: 6851 (1984)), o mediante la fusión de la secuencia codificante de inmunoglobulina con toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no es inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias de polipéptidos que no son inmunoglobulinas se pueden sustituir con los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen con los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

Los "anticuerpos nativos", en general, son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene, en un extremo, un dominio variable (V_H) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que determinados restos de aminoácidos forman una superficie de contacto entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de los anticuerpos derivados de una determinada especie, o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la/s cadena/s es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otra especie, o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (US 4.816567; y Morrison *et al* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81:6851-6855). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión al antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del Viejo Mundo, Simio, etc.) y secuencias de región constante humanas.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor están reemplazados por restos 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 capacidad deseadas del anticuerpo. En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana están reemplazados por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para mejorar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), por lo general, la de una inmunoglobulina humana. El fragmento Fc comprende las porciones carboxi terminales de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan mediante las secuencias de la región Fc, cuya región también es la parte reconocida por los receptores Fc (FcR) que se encuentran en ciertos tipos de células (Jones *et al* (1986) *Nature* 321: 522-525; Riechmann *et al* (1988) *Nature* 332:323-329; Presta. (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596; Verhoeven *et al* (1988) *Science*, 239: 1534-1536; Sims *et al* (1993) *J. Immunol.* 151: 2296; Chothia *et al* (1987) *J. Mol. Biol.*, 196:901). Otros métodos usan una determinada región marco derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas (Carter *et al* (1992) *Proc. Natl. Acad. Science. EE.UU.*, 89:4285; Presta *et al* (1993) *J. Immunol.* 151: 2623).

Un "anticuerpo humano" es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha creado usando cualquiera de las técnicas para crear anticuerpos humanos desveladas en el presente documento. La presente definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión al antígeno no humanos. Hay animales transgénicos (por ejemplo, ratones) disponibles, que son capaces, tras la inmunización, de 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 (J_H) del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal produce la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana a tales ratones mutantes de la línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno (Jakobovits *et al* (1993) *Proc. Natl. Acad. Science. EE.UU.*, 90:2551; Jakobovits *et al* (1993) *Nature*, 362:255-258; Bruggemann *et al*

(1993) *Year in Immuno.* 07:33; US 5545806; US 5569825; US 5591669; US 5545807 y WO 97/17852.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es aquel con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que producen una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo que no posee dicha/s alteración/es. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante maduración por afinidad por barajado de dominios de VH y VL (Marks *et al* (1992) *Bio/Technology* 10:779-783) o mutagénesis aleatoria de CDR y/o restos de armazón (Barbas *et al* (1994) *Proc Nat. Acad. Sci.*, EE.UU. 91: 3809-3813; Schier *et al* (1995) *Gene* 169: 147-155; Yelton *et al* (1995) *J. Immunol.* 155: 1994-2004; Jackson *et al* (1995) *J. Immunol.* 154 (7): 3310-9; y Hawkins *et al* (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896).

Un "anticuerpo intacto", en el presente documento, es aquel que comprende los dominios VL y VH, así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variante de la secuencia de aminoácidos de los mismos. El anticuerpo intacto puede tener una o más "funciones efectoras" que se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región constante Fc (una región Fc de la secuencia nativa o región Fc de la variante de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de los anticuerpos incluyen la unión a C1q; citotoxicidad dependiente de complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; e infrarregulación de los receptores de la superficie celular tales como el receptor de células B y el BCR.

La expresión "variante de secuencia de aminoácidos" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren en cierto grado de un polipéptido de secuencia nativa. Comúnmente, las variantes de secuencias de aminoácidos poseerán al menos aproximadamente un 70 % de identidad de secuencia con al menos un dominio de unión a un receptor de un polipéptido de secuencia nativa o con al menos un dominio de unión a un ligando de un receptor nativo, y preferentemente, serán al menos aproximadamente un 80 %, más preferentemente, al menos aproximadamente un 90 % homólogos en secuencia con dichos dominios de unión al receptor o al ligando. Las variantes de secuencias de aminoácidos poseen sustituciones, deleciones y/o inserciones en ciertas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa. Los aminoácidos se designan por los nombres convencionales, códigos de una letra y de tres letras.

"Identidad de secuencia" se define como el porcentaje de restos de la variante de secuencia de aminoácidos que son idénticos tras alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Los métodos y los programas informáticos para el alineamiento son bien conocidos en la técnica. Uno de dichos programas informáticos es "Align 2", creado por Gencntech, Inc., que fue presentado con el manual de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991, y cuyo código se encuentra en el documento PCT/US03/07209.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas inespecíficas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, posteriormente, provocan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar la ADCC, los linfocitos NK, solo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3, página 464, de Ravetch y Kinet, (1991), *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92. Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en los documentos US 5500362 y US 5821337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o además, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al* (1998) *Proc. Nat. Acad. Sci.* (EE.UU.) 95:652-656.

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más receptores de la región constante (FcR) y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; prefiriéndose las PBMC y los linfocitos NK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo, de sangre o de células PBMC como se describe en el presente documento.

La expresión "receptor de Fc" o el término "FcR" significan un receptor que se une a la región constante Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye los receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas, y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de las mismas. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su

dominio citoplásmico. (Véase la revisión M. en Daëron, (1997), *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, (1991) *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92; Capel *et al* (1994) *Immunomethods* 4:25-34; y Haas *et al* (1995) *J. Lab. Clin. Mcd.* 126:330-41. Otros FcR, incluyendo aquellos que se identificarán en el futuro, están comprendidos en el término "FcR" del presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al* (1976) *J. Immunol.*, 117:587 y Kim *et al* (1994) *J. Immunol.* 24:249).

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín (Gazzano-Santoro *et al* (1996) *J. Immunol. Methods* 202:163).

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos, y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables tanto en la cadena ligera como en los dominios variables de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco conservadas (FR). Cada dominio variable de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprende cuatro FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al* (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", V Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC).

La expresión "región hipervariable", o los términos "HVR" o "HV", cuando se usan en el presente documento, se refieren a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en la VH (H1, H2, H3), y tres en la VL (L1, L2, L3). Hay una serie de delineaciones de las regiones hipervariables en uso y englobada por el presente documento. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más usadas (Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", V Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). En cambio, Chothia se refiere a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lcsk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras de cristales complejos disponibles. Los restos de cada una de estas regiones hipervariables se indican más adelante. A menos que se indique de otra manera, se empleará la numeración de Kabat de acuerdo con la base de datos de Kabat de secuencias alineadas de proteínas (Wu y Kabat (1970) *J. Exp. Med.* 132:211-250; Johnson y Wu (2000) *Nuc. Acids Res.* 28(1):214-218). Las ubicaciones de las regiones hipervariables son generalmente las siguientes: aminoácidos 24-34 (HVR-L1), aminoácidos 49-56 (HVR-L2), aminoácidos 89-97 (HVR-L3), aminoácidos 26-35A (HVR-H1), aminoácidos 49-65 (HVR-H2) y aminoácidos 93-102 (HVR-H3). Las regiones hipervariables también pueden comprender "regiones hipervariables extendidas" de la siguiente manera: aminoácidos 24-36 (L1) y aminoácidos 46-56 (L2) en la VL. Los restos del dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra* para cada una de estas definiciones. Una "región hipervariable modificada", a los efectos del presente documento, es una región hipervariable que comprende una o más (por ejemplo, de una a aproximadamente 16) sustituciones de aminoácidos en la misma. Una "región hipervariable no modificada", a los efectos del presente documento, es una región hipervariable que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un anticuerpo no humano del que se derivó, es decir, aquella que carece de una o más sustituciones de aminoácidos en la misma.

La expresión "resto de dominio variable que se enumera como en Kabat" o "posición de aminoácido que se enumera como en Kabat", y las variaciones de las mismas, se refieren al sistema de numeración usado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos de Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", V Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Con el uso de este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un recorte o a una inserción en una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una inserción de un solo aminoácido (resto 52a según Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, los restos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del resto 82 de FR de la cadena pesada. La numeración Kabat de restos se puede determinar para un determinado anticuerpo mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia enumerada Kabat "convencional".

"Afinidad de unión" se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en el presente 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 pareja Y se puede representar en general por la constante de disociación (Kd). La afinidad de puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad, en general, se unen a los antígenos lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de afinidad elevada, en general, se unen a los antígenos más rápidamente y tienden a permanecer unidos más tiempo. En la técnica se conoce varios métodos de medición de la afinidad de unión, pudiéndose usar cualquiera de ellos para los fines de la presente invención. A continuación, se describen realizaciones ilustrativas específicas.

Un "antígeno" es un polipéptido, hidrato de carbono, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto natural o sintético predeterminado al que un anticuerpo puede unirse selectivamente. Restos de "armazón" o de "FR" son aquellos restos del dominio variable diferentes de los restos de la región hipervariable como se define en el presente documento. Un "armazón de consenso humano" es un armazón que representa el resto de aminoácidos más habitual en una selección de secuencias armazón VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", V Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). En una realización, para la VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.* En una realización, para la VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al.* Un "armazón de consenso del subgrupo III de VH" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III de la cadena pesada variable de Kabat *et al.* Un "armazón de consenso del subgrupo I de VL" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa de la cadena ligera variable de Kabat *et al.*

"Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. En conjunto, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que solo comprende tres regiones hipervariables específicas de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos cuantos restos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación que se da en el presente documento al Fab' en el que e/los resto/s de cisteína de los dominios constantes portan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptido. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno (Plückthun en "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Con el uso de un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno (EP 404 097; WO 93/11161; Hollinger *et al* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:6444-6448).

Un "aminoácido de cisteína libre" se refiere a un resto de aminoácido de cisteína que se ha modificado por ingeniería genética en un anticuerpo parental, que tiene un grupo funcional tiol (-SH) y no está emparejado como, ni forma parte de, un puente disulfuro intramolecular o intermolecular.

La expresión "valor de reactividad del tiol" es una caracterización cuantitativa de la reactividad de los aminoácidos de cisteína libres. El valor de reactividad del tiol es el porcentaje de un aminoácido de cisteína libre en un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína que reacciona con un reactivo que reacciona con tiol y se convierte a un valor máximo de 1. Por ejemplo, un aminoácido de cisteína libre de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína que reacciona en un rendimiento del 100 % con un reactivo que reacciona 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 modificado por ingeniería genética en el mismo o diferente anticuerpo parental que

reacciona en un rendimiento del 80 % con un reactivo que reacciona con tiol tiene un valor de reactividad del tiol de 0,8. Otro aminoácido de cisteína modificado por ingeniería genética en el mismo o diferente anticuerpo parental que no consigue reaccionar en absoluto con un reactivo que reacciona con tiol tiene un valor de reactividad del tiol de 0. La determinación del valor de reactividad del tiol de una determinada cisteína se puede realizar mediante un ensayo

5 ELISA, espectrometría de masas, cromatografía líquida, autorradiografía u otros ensayos analíticos cuantitativos. Los reactivos que reaccionan con tiol que permiten la captura del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína, y la comparación y cuantificación de la reactividad de la cisteína incluyen biotina-PEO-maleimida ((+)-biotinil-3-maleimidopropionamidil-3,6-dioxaoctaindiamina, Oda *et al* (2001) "Nature Biotechnology" 19:379-382, Pierce Biotechnology, Inc.) Biotina-BMCC, PEO-yodoacetil-biotina, yodoacetil-LC-biotina y biotina-HPDP (Pierce

10 Biotechnology Inc.) y $N\alpha$ -(3-maleimidilpropionil)biotina (MPB, Molecular Probes, Eugene, OR). Otras fuentes comerciales para reactivos enlazadores bifuncionales y multifuncionales, de biotilación, incluyen Molecular Probes, Eugene, OR y Sigma, St. Louis, MO.

Un "anticuerpo parental" es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se han reemplazado uno o más restos de aminoácidos por uno o más restos de cisteína. El anticuerpo parental puede comprender una secuencia nativa o de tipo silvestre. El anticuerpo parental puede tener modificaciones preexistentes en la secuencia de aminoácidos (tales como, adiciones, deleciones y/o sustituciones) con respecto a otras formas nativas, de tipo silvestre o modificadas de un anticuerpo. Un anticuerpo parental se puede dirigir contra un antígeno diana de interés, por ejemplo, un polipéptido de importancia biológica. También se contemplan anticuerpos dirigidos contra antígenos que no son polipéptidos (tales como antígenos de glucolípidos asociados a tumores; véase el documento US 5091178).

15

20

Un anticuerpo "aislado" es aquel que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95 % en peso de anticuerpo según lo determinado por el método Lowry, y lo más preferentemente más de 99 % en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria; o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de 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. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación

25

30

Un anticuerpo "que se une" a una diana molecular o un antígeno de interés, por ejemplo, antígenos TENB2 o CA125, es aquel capaz de unirse al antígeno con suficiente afinidad, de manera que el anticuerpo sea útil en la dirección de una célula que exprese el antígeno. Cuando el anticuerpo es aquel que se une a TENB2, por lo general, se unirá preferentemente a TENB2, y puede ser aquel que no reaccione significativamente de forma cruzada con otras proteínas. En dichas realizaciones, el grado de unión del anticuerpo a estas proteínas no TENB2 (por ejemplo, superficie celular que se une a receptor endógeno) será inferior al aproximadamente 10 % según lo determinado mediante un análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA).

35

40

"Tratar" o "tratamiento" o "alivio" se refieren tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) la afección o el trastorno patológico en cuestión. Las personas que necesitan tratamiento incluyen aquellas que ya padecen el trastorno, así como aquellas propensas a padecer el trastorno o aquellas en las que debe prevenirse el trastorno. Un sujeto o mamífero es "tratado" satisfactoriamente contra una cáncer que expresa el polipéptido CA125/0772P si, después de recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo anti-CA125/0772P, tal como un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, el paciente muestra una reducción observable y/o medible o una ausencia de uno o más de los siguientes factores: reducción del número de células cancerosas o ausencia de células cancerosas; reducción del tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentización en cierto grado y, preferentemente, detención) de la infiltración de las células cancerosas en órganos periféricos incluyendo la propagación del cáncer a tejido blando y hueso; inhibición (es decir, ralentización en cierto grado y preferentemente detención) de la metástasis tumoral; inhibición, en cierto grado, del crecimiento tumoral; y/o alivio, en cierto grado, de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducidas, y mejora en cuestiones de calidad de vida. Siempre que el anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, pueda prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. La reducción de estos signos o síntomas también puede ser percibida por el paciente. Los parámetros anteriores para evaluar un tratamiento satisfactorio y una mejora en la enfermedad son fácilmente medibles mediante procedimientos de rutina familiares para el médico. Para la terapia contra el cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, mediante la valoración del tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o la determinación de la velocidad de respuesta (RR). La metástasis se puede determinar mediante ensayos de estadificación y exploración ósea, así como análisis de los niveles de calcio y otras enzimas para determinar la propagación hacia los huesos. También se pueden realizar exploraciones CT para buscar la propagación hacia la pelvis y los nódulos linfáticos de la zona. Los rayos X del pecho y la medición de los niveles de

45

50

55

60

65

enzimas hepáticas mediante métodos conocidos se usan para buscar metástasis hacia pulmones e hígado, respectivamente. Otros métodos de rutina para monitorizar la enfermedad incluyen la ultrasonografía transrectal (TRUS) y la biopsia con aguja transrectal (TRNB).

5 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Un "tumor" comprende una o más células cancerosas, y se refiere a todo el crecimiento y proliferación celular neoplásico, ya sea maligno o benigno, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Los ejemplos más concretos de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de células pequeñas de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas ("NSCLC"), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o de útero, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de hígado o riñón, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

20 Un cáncer que "sobreexpresa" un receptor antigénico es aquel que tiene niveles significativamente más elevados del receptor, tal como TENB2, en la superficie celular del mismo, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar causada por la amplificación génica o por el aumento de la transcripción o la traducción. La sobreexpresión del receptor se puede determinar en un ensayo de detección o pronóstico mediante la evaluación de los niveles aumentados de la proteína receptora presente en la superficie de una célula (por ejemplo, mediante un ensayo de inmunohistoquímica; IHC). Como alternativa, o además, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica el receptor, por ejemplo, mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH; véase el documento WO98/45479), técnicas de transferencia Southern o de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tales como la PCR cuantitativa a tiempo real con transcriptasa inversa (qRT-PCR).

30 Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; prefiriéndose las células PBMC y NK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

35 Las expresiones "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que están asociados con cierto grado de proliferación de células anormales. En una realización, el trastorno proliferativo celular es el cáncer.

40 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco, por ejemplo, un conjugado de anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína y fármaco o un agente quimioterapéutico, eficaz para tratar una enfermedad o un trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferentemente detener) la infiltración de las células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierto grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar, en cierto grado, uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. El término "citostático" se refiere al efecto de limitar la función de las células, tal como limitar el crecimiento celular o la proliferación de las células. Para la terapia del cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la velocidad de respuesta (RR).

55 Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen erlotinib (TARCEVA®), Genentech/OSI Pharm.), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), sutent (SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), imatinib mesilato (GLEEVEC®, Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), oxaliplatino (Eloxatin®, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), leucovorina, rapamicina (Sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, GlaxoSmithKline), lonafamib (SCH 66336), sorafenib (BAY43-9006, Bayer Labs) y getitinib (IRESSA®, AstraZeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), agentes de alquilación tales como tiopeca y ciclosfosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, metilsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo alrelamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilmelamina; acetogeninas (especialmente, bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW2189 y CB1-TMI); eleuterobina; 65 pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostaza de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina,

clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente, caliqueamicina gamma I1, caliqueamicina omega I1 (*Angew Chem. Intl. Ed. Engl.* (1994) 33:183-186); dinemicina, incluyendo la dinemicina A; bisfosfonatos tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina de cromoproteínas relacionadas), 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-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elfomilina; acetato de eliptinio; una eptilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procabazina; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, el paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), formulación de nanopartículas modificadas por ingeniería genética con albúmina libres de Cremophor de paclitaxel ABRAXANE® (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y doxetaxel TAXOTERE® (Rhôdane-Poulenc Rorer, Antony, Francia); chloranbucil; gemcitabina GEMZAR®; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NAVELBINE®; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

También se incluyen en la presente definición de "agente quimioterapéutico": (i) agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas en tumores, tales como antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON; (ii) inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestanic, fadrozol, vorocol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®; (iii) antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; así como troxacitabina (un análogo 1,3-dioxolano del nucleósido de citosina); (iv) inhibidores de la aromatasa; (v) inhibidores de proteínas quinasa; (vi) inhibidores de lípido quinasa; (vii) oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en los mecanismos de señalización implicados en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Ralf y H-Ras; (viii) ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; (ix) vacunas tales como vacunas para la terapia génica, por ejemplo, las vacunas ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® y VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; (x) agentes antiangiogénicos tales como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y (xi) sales, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Algunos ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas del crecimiento tales como la hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metionilo y hormona del crecimiento bovino; hormona paratiroidal; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas de glucoproteínas tales como la hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteínica (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor α y β de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento I y II de tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón α , β y γ ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-

macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (IL) tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y ligando kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

El término "marcador" significa cualquier resto que puede unirse covalentemente a un anticuerpo y que funciona para: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con un segundo marcador para modificar la señal detectable proporcionada por el primer o segundo marcador, por ejemplo, FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia); (iii) estabilizar las interacciones o aumentar la afinidad de unión, con el antígeno o ligando; (iv) afectar a la movilidad, por ejemplo, la movilidad electroforética, o la permeabilidad celular, por la carga, hidrofobicidad, forma u otros parámetros físicos; o (v) proporcionar un resto de captura, para modular la afinidad por el ligando, la unión de anticuerpo/antígeno o la formación de complejos iónicos.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un ADC. Las sales a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tannato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentsinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula, tal como un ión acetato, un ión succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que estabilice la carga en el compuesto. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los ejemplos en los que múltiples átomos cargados forman parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. De ahí que una sal farmacéuticamente aceptable pueda tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

"Solvato farmacéuticamente aceptable" se refiere a una asociación de una o más moléculas de disolvente y un ADC. Los ejemplos de disolventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.

"Vehículos", como se usa en el presente documento, incluyen los vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, que no son tóxicos para la célula o el mamífero que se expone a los mismos a las dosis y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada de pH. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (inferiores a aproximadamente 10 restos); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS®.

Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en el presente documento siguen, en general, 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 rotar el plano de la luz polarizada por el plano. Al describir un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o *R* y *S*, se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula en torno a su centro o centros quirales. Los prefijos *d* y *l* o (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación de la luz polarizada por el plano por el compuesto, significando (-) o *l* que el compuesto es levorrotatorio. Un compuesto con prefijo (+) o *d* es dextrorrotatorio. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos a excepción de que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también se puede denominar enantiómero, y una mezcla de dichos isómeros a menudo se denomina mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o racemato, que puede tener lugar cuando no ha habido estereoselección ni estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. La expresión "mezcla racémica" y el término "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, carentes de actividad óptica.

En el presente documento, se usan las siguientes abreviaturas, que tienen las definiciones indicadas: BME es beta-mercaptoetanol, Boc es *N*-(*t*-butoxicarbonilo), cit es citrulina (ácido 2-amino-5-ureido-pentanoico), dap es dolaproina, 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 dimetiléter de etilenglicol (o 1,2-dimetoxietano), DMF es *N,N*-dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfóxido, doe es dolafenina, dov es *N,N*-dimetilvalina, DTNB es ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico), DTPA es ácido dietilentriaminopentaacético, DTT es ditiotreitól, EDCI es 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, EEDQ es 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, EM (EN) es espectrometría de masas por electronebulización, EtOAc es acetato de etilo, Fmoc es *N*-(9-

fluorenilmetoxycarbonilo), 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 de 4-anisildifenilmetilo (o 4-metoxitritilo), nor es (1*S*, 2*R*)-(+)-norefedrina, PAB es *p*-aminobencilcarbamoilo, PBS es solución salina tamponada con fosfato (pH 7), PEG es polietilenglicol, Ph es fenilo, PNP es *p*-nitrofenilo, MC es de 6-maleimidocaproilo, phe es la L-fenilalanina, PyBrop es hexafluorofosfato de bromo-*tris*-pirrolidin-fosfonio, SEC es cromatografía de exclusión por tamaño, Su es succinimida. TFA es ácido trifluoroacético, TLC es cromatografía en capa fina, UV es ultravioleta y val es valina.

ANTICUERPOS ANTI-TENB2 MODIFICADOS POR INGENIERÍA GENÉTICA CON CISTEÍNA

Los compuestos descritos en el presente documento incluyen anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína en los que se reemplazan uno o más aminoácidos de cualquier forma de tipo silvestre o anticuerpo anti-TENB2 parental por un aminoácido de cisteína. El aminoácido de cisteína diseñado por ingeniería genética es un ácido libre de cisteína y no forma parte de una unidad disulfuro intracatenaria ni intercatenaria. Es posible modificar mediante ingeniería genética de este modo, es decir, mutar cualquier forma de anticuerpo anti-TENB2. Por ejemplo, se puede modificar un fragmento Fab de anticuerpo parental para formar un Fab modificado con cisteína, denominado en el presente documento "TioFab." De manera similar, se puede modificar un anticuerpo monoclonal parental para formar un "TioMab". Cabe señalar que, debido a la naturaleza dimérica del anticuerpo IgG, una mutación de un solo sitio produce un único resto de cisteína modificado por ingeniería genética en un TioFab, mientras que una mutación de un solo sitio produce dos restos de cisteína modificados por ingeniería genética en un TioMab. Los anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína de la invención incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos, y fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno, polipéptidos de fusión y análogos que se unen preferentemente a polipéptidos TENB2 asociados a la célula.

Los anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína conservan la capacidad de unión al antígeno de sus anticuerpos anti-TENB2 parentales homólogos de tipo silvestre. Por lo tanto, Los anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína son capaces de unirse a los antígenos TENB2.

Un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína comprende uno o más aminoácidos de cisteína libres con grupos sulfhidrilo (tiol) reducidos en los que el anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína se une a un polipéptido TENB2.

En una realización, el anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína se prepara mediante un proceso que comprende el reemplazo de uno o más restos de aminoácido de un anticuerpo anti-TENB2 parental por cisteína.

Es posible evaluar la reactividad de los grupos tiol de cisteína modificados por ingeniería genética recién introducidos de los mutantes con restos de cisteína (Cys) reemplazados ("modificados por ingeniería genética"). El valor de reactividad del tiol es un término numérico relativo en el intervalo de 0 a 1,0 y se puede medir para cualquier anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína. Los valores de reactividad del tiol de los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína de la invención pueden estar en los intervalos de 0,6 a 1,0; de 0,7 a 1,0; o de 0,8 a 1,0.

En un aspecto, se describe un anticuerpo anti-TENB2 aislado modificado por ingeniería genética con cisteína que comprende una secuencia de aminoácidos que está codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento de una molécula de ADN que codifica (a) un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa como se desvela en el presente documento; (b) una secuencia de aminoácidos de anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína que carece del péptido señal como se desvela en el presente documento; (c) un dominio extracelular de una proteína transmembrana de anticuerpo modificado con cisteína, con o sin el péptido señal, como se desvela en el presente documento; (d) una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las secuencias de ácido nucleico desveladas en el presente documento; o (e) cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia de aminoácidos de longitud completa de anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína como se desvela en el presente documento.

En el presente documento, se describe un anticuerpo anti-TENB2 aislado modificado por ingeniería genética con cisteína sin la secuencia señal del extremo N y/o sin la metionina de iniciación y está codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica dicha una secuencia de aminoácidos como se describe en el presente documento. Los procesos para producir el mismo también se describen en el presente documento, en el que los procesos comprenden cultivar una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante apropiada en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína y recuperar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína del cultivo celular.

También se describe en el presente documento un anticuerpo anti-TENB2 aislado modificado por ingeniería genética con cisteína, que tiene el dominio transmembrana bien eliminado o inactivado. Los procesos para producir el mismo

también se describen en el presente documento, en el que estos procesos comprenden cultivar una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante apropiada en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína y recuperar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína del cultivo celular.

5 También se describen en el presente documento anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína quiméricos anti-TENB2 aislados que comprenden cualquiera de los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína descritos en el presente documento fusionados a un polipéptido heterólogo (no TENB2). Los ejemplos de dichas moléculas quiméricas comprenden cualquiera de los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína, descritos en el presente documento, fusionados a un polipéptido heterólogo tales como, por ejemplo, una secuencia de epítipo marcadora o una región Fc de una inmunoglobulina.

15 El anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína puede ser un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo monocatenario o anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo anti-polipéptido TENB2 a su respectivo epítipo antigénico. Los anticuerpos de la presente invención se pueden conjugar opcionalmente a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, una auristatina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica, o similares. Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas y preferentemente inhiben el crecimiento o la proliferación de o inducen la muerte de una célula a la que se unen. Para fines de diagnóstico, los anticuerpos de la presente invención se pueden marcar para que sean detectables, unir a un soporte sólido, o similares.

25 También se describen en el presente documento vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína descritos en el presente documento. También se proporcionan células huésped que comprenden cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, células de *E. coli* o células de levadura. Se proporciona además un proceso para producir cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento, y comprende cultivar células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

30 Los anticuerpos anti-TENB2 parentales o modificados por ingeniería genética con cisteína se unen a un polipéptido TENB2 o variante de polipéptido TENB2 descrita en el documento PCT/US03/07209.

35 Una variante de polipéptido TENB2 es un polipéptido TENB2 que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un TENB2 que es: (i) una secuencia nativa de longitud completa; (ii) una secuencia de polipéptido que carece del péptido señal; (iii) un dominio extracelular, con o sin el péptido señal; (iv) o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido TENB2 de longitud completa. Dichas variantes de polipéptido TENB2 incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que se añaden, o se eliminan, uno o más restos de aminoácidos en el extremo N o C de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Comúnmente, una variante de polipéptido TENB2 tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de polipéptido TENB2 nativa de longitud completa, una secuencia de polipéptido TENB2 que carece de péptido señal, un dominio extracelular de un polipéptido TENB2, con o sin el péptido señal, o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de polipéptido TENB2 de longitud completa. Normalmente, las variantes de polipéptido TENB2 son de al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, alternativamente, de al menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 aminoácidos de longitud, o más. Opcionalmente, las variantes de polipéptido TENB2 tendrán una sustitución conservadora de no más de un aminoácido en comparación con la secuencia nativa del polipéptido TENB2, alternativamente, una sustitución conservadora de no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos en comparación con la secuencia de polipéptido TENB2 nativa.

55 Los polipéptidos TENB2 se pueden preparar mediante expresión recombinante en: (i) *E. coli* con vector pBR322; (ii) células de mamífero tales como células HEK293 humanas (ATCC CCL 1573), células COS (fibroblasto de simio, SV-40), células de ovario de hámster chino (CHO) con el vector pRK5; (iii) levadura, tal como la cepa AB110 de levadura; o (iv) células de insecto infectadas con baculovirus (PCT/US03/07209). Los polipéptidos TENB2 nativos o recombinantes se pueden purificar mediante varias técnicas convencionales en la campo de la purificación de proteínas. Por ejemplo, el polipéptido pro-TENB2, polipéptido TENB2 maduro o polipéptido pre-TENB2 se purifica mediante cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos específicos del polipéptido TENB2 de interés. En general, se construye una columna de inmunoafinidad mediante el acoplamiento covalente del anticuerpo anti-polipéptido TENB2 a una resina cromatográfica activada. Los polipéptidos TENB2 se pueden producir de manera recombinante como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura o del polipéptido. Como alternativa, los polipéptidos TENB2 se pueden producir como polipéptidos de fusión con una secuencia señal

- y una secuencia de polipéptido heteróloga que permita la purificación del polipéptido de fusión TENB2; los ejemplos de dichos polipéptidos son polihistidina (His₆ (SEC ID N°: 24) o His₈ (SEC ID N°: 25)), Fc de IgG humana, el epítipo FLAG (KDYKDDDDK (SEC ID N°: 26)) y el epítipo gD (KYLADASLKMADPNRFRGKDLPLV (SEC ID N°: 27)). La secuencia señal puede ser un componente del vector o puede ser una parte del ADN que codifica el anticuerpo anti-TENB2 o polipéptido TENB2 que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o conductores de enterotoxina termoestable II. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, el conductor de la invertasa de levadura, el conductor del factor alfa (incluyendo los líderes de factor α *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* (US 5.010.182), o el conductor de la fosfatasa ácida, el conductor de la glucoamilasa de *C. albicans* (EP 0362179) o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión de células de mamíferos, se pueden usar secuencias señal de mamífero para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o de especies relacionadas, así como conductores de secretores virales.
- Una célula que expresa TENB2 expresa un polipéptido antigénico TENB2 endógeno o transfectado bien en la superficie celular o en una forma secretada. Un cáncer que expresa TENB2 comprende células que tienen un polipéptido TENB2 presente en la superficie celular o que producen y secretan un polipéptido antigénico TENB2. Un cáncer que expresa TENB2 produce opcionalmente niveles suficientes de polipéptido TENB2 en la superficie de células del mismo, de manera que un anticuerpo anti-TENB2, o un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, se puede unir al mismo y ejercer un efecto terapéutico con respecto al cáncer. Un cáncer que sobreexpresa un polipéptido TENB2 es aquel que tiene niveles significativamente más elevados de polipéptido TENB2 en la superficie celular del mismo, o produce y secreta, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar causada por la amplificación génica o por el aumento de la transcripción o la traducción. La sobreexpresión de polipéptido TENB2 se puede determinar en un entorno clínico mediante la evaluación de los niveles aumentados de la proteína TENB2 presente en la superficie de una célula, o secretada por la célula, (por ejemplo, mediante un ensayo de inmunohistoquímica usando anticuerpos anti-TENB2 preparados contra un polipéptido TENB2 aislado que se puede preparar usando tecnología de ADN recombinante a partir de un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido TENB2; análisis FACS, etc.). Como alternativa, o además, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica el polipéptido TENB2 o ARNm en la célula, por ejemplo, a través de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) usando una sonda basada en ácidos nucleicos correspondiente a un ácido nucleico que codifica TENB2 o el complemento del mismo; (WO98/45479), técnicas de transferencia Southern, transferencia Northern o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR de transcriptasa inversa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). También se puede detectar la sobreexpresión del polipéptido TENB2 midiendo el antígeno escindido en un fluido biológico, tal como suero, por ejemplo, usando ensayos basados en anticuerpos US 4933294; WO 91/05264; US 5401638; y Sias *et al.* (1990), *J. Immunol. Methods* 132: 73-80). Cabe contemplar otros diversos ensayos *in vivo*. Como alternativa, se pueden exponer células en el cuerpo del paciente a un anticuerpo que esté opcionalmente marcado con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo con las células en el paciente, por ejemplo, mediante rastreo externo de la radiactividad o mediante el análisis de una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.
- Los anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína y parentales son capaces de unirse, preferentemente específicamente, a un polipéptido TENB2 como se describe en el presente documento. Los oligopéptidos de unión a TENB2 se pueden identificar sin excesiva experimentación usando técnicas bien conocidas. En este sentido, se observa que las técnicas de exploración de bibliotecas de oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la materia (US 5556762; US 5750373; US 4708871; US 4833092; US 5223409; US 5403484; US 5571689; US 5663143; WO 84/03506; WO84/03564; Geysen *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81:3998-4002; Geysen *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 82:178-182; Geysen *et al.*, en "Synthetic Peptides as Antigens", 130-149 (1986); Geysen *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 102:259-274 (1987); Schoofs *et al.*, *J. Immunol.*, 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 87:6378; Lowman, H. B. *et al.* (1991) *Biochemistry*, 30:10832; Clackson, T. *et al.* (1991) *Nature*, 352: 624; Marks, J. D. *et al.* (1991), *J. Mol. Biol.*, 222:581; Kang, A. S. *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 88:8363, y Smith, G. P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2:668).
- Los anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína y parentales de la invención incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, humanos, biespecíficos y heteroconjugados. Se contemplan varias formas de un anticuerpo anti-TENB2 humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab. Como alternativa, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.
- Los anticuerpos anti-TENB2 biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión con al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos anti-TENB2 biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes de una proteína TENB2 como se describe en el presente documento. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a TENB2 con un sitio de unión para otra proteína. Como alternativa, un brazo anti-TENB2 puede combinarse con un brazo que se una a una molécula inductora en un leucocito, tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD3) o receptores Fc para IgG (FC γ R), tales como FC γ RI (CD64), FC γ RII (CD32) y FC γ RIII (CD16) con el fin de centrar y localizar los mecanismos de defensa celulares en la célula que expresa TENB2. Los

anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan TENB2. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a TENB2 y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón- α , alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno con isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein *et al.* (1983), *Nature*, 305:537-539).

Los anticuerpos anti-TENB2 heteroconjugados también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (US 4676980) y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* usando métodos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes de reticulación.

Los anticuerpos anti-TENB2 de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes con tres o más sitios de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión recombinante de ácido nucleico que codifique las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión al antígeno. El dominio de dimerización preferido 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 al antígeno amino terminales a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en el presente documento comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho, pero preferentemente cuatro, sitios de unión al antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferentemente dos cadenas polipeptídicas), en el que la/s cadena/s polipeptídica/s comprende/n dos o más dominios variables. Por ejemplo, la/s cadena/s polipeptídica/s 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 polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o un polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la/s cadena/s polipeptídica/s puede/n comprender: cadena VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-región Fc; o cadena VH-CH1-VH-CH1-región Fc. El anticuerpo multivalente del presente documento comprende preferentemente además al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente del presente documento puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de cadena ligera contemplados en el presente documento comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, además, comprenden un dominio CL.

Es posible modificar la función efectora de un anticuerpo anti-TENB2 mediante la introducción de sustituciones de uno o más aminoácidos en la región Fc. Dicha modificación puede aumentar la citotoxicidad mediada por la célula dependiente del antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo anti-TENB2. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener una mejor capacidad de interiorización y/o una mayor citólisis mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron *et al.* (1992), *J. Exp. Med.*, 176: 1191-1195 y Shopes B. J. (1992), *Immunol.*, 148: 2918-2922. También se pueden preparar anticuerpos anti-TENB2 homodiméricos con una actividad anti-tumoral aumentada usando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolf *et al.* (1993) *Cancer Research*, 53: 2560-2565. Como alternativa, se puede diseñar por ingeniería genética un anticuerpo para que tenga regiones Fc duales y, de esta manera, tenga mayores capacidades de lisis por complemento y ADCC (Stevenson *et al.* (1989), *Anti-Cancer Drug Design*, 3:219-230).

Es posible modular la semivida en suero de un anticuerpo anti-TENB2 mediante la incorporación de un epítipo de unión al receptor de tipo silvestre, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo (US 5739277). Como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión al receptor de tipo silvestre" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable del aumento de la semivida en suero *in vivo* de la molécula IgG.

Los anticuerpos monoclonales que se unen a epítipos TENB2, incluyendo TMEFF2 N° 19, se determinan mediante análisis de unión competitiva convencional y el mapeo de epítipos (PCT/US03/07209).

Se realizó un análisis inmunohistoquímico usando anticuerpos monoclonales TMEFF2 N° 19 (PCT/US03/07209; Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989; Ausubel *et al.*, "Current Protocols of Molecular Biology", Unidad 3.16, John Wiley and Sons, 1997). El anticuerpo monoclonal TMEFF2 N° 19 demostró una unión débil a fuerte en 176 de las 241 muestras de cáncer de próstata humano.

El anticuerpo monoclonal TMEFF2 N° 19 se interioriza en las células a las que une el polipéptido TENB2 en la superficie celular a un ritmo rápido.

Modificaciones de anticuerpos anti-TENB2

Se pueden realizar modificaciones y variaciones en los anticuerpos anti-TENB2 descritos en el presente documento, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y directrices conocidas en la materia para realizar mutaciones conservativas y no conservativas, por ejemplo, las del documento US 5364934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una eliminación o una inserción de uno o más codones que codifiquen el anticuerpo o el polipéptido que den lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con el anticuerpo anti-TENB2 de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es por sustitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del anticuerpo anti-TENB2. Las variaciones se pueden realizar usando métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis (dirigida) mediada por oligonucleótidos, por rastreo de alanina y mutagénesis por PCR. Se pueden realizar la mutagénesis dirigida (Carter *et al* (1986) *Nucl. Acids Res.*, 13:4331; Zoller *et al* (1987) *Nucl. Acids Res.*, 10:6487), mutagénesis de casete (Wells *et al* (1985) *Gene*, 34:315), mutagénesis de selección por restricción (Wells *et al* (1986) *Philos. Trans. R. Soc. Londres SerA*, 317:415) u otras técnicas conocidas sobre el ADN clonado para producir el ADN variante del anticuerpo anti-TENB2. Los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales del anticuerpo anti-TENB2, tal como cambiar el número o la posición de los sitios de glucosilación o alterar las características de anclaje a la membrana. Otras modificaciones incluyen la desamidación de los restos glutaminilo y asparaginilo en los correspondientes restos glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de restos serilo o treonilo, la metilación de los grupos α -amino de lisina, arginina y cadenas laterales de histidina (T. E. Creighton, "Proteins: Structure and Molecular Properties", (1983) W. H. Freeman & Co., San Francisco, pág. 79-86), la acetilación de la amina N-terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal. Los anticuerpos anti-TENB2 se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de codificación y/o por síntesis química.

Fragmentos del anticuerpo anti-TENB2 pueden estar truncados en el extremo N o C, o pueden carecer de restos internos, por ejemplo, si se comparan con un anticuerpo anti-TENB2 de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de restos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del anticuerpo anti-TENB2. Los fragmentos del anticuerpo anti-TENB2 se pueden preparar mediante cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Es posible sintetizar fragmentos de péptidos deseados químicamente. Un enfoque alternativo implica la generación de fragmentos de anticuerpo mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida por escindir proteínas en sitios definidos por determinados residuos de aminoácidos o mediante la digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y el aislamiento del fragmento deseado. Otra técnica adecuada más implica el aislamiento y la amplificación de un fragmento de ADN que codifica un anticuerpo o fragmento deseado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferentemente, los fragmentos de anticuerpo anti-TENB2 comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el anticuerpo anti-TENB2 nativo desvelado en el presente documento.

Un tipo particularmente preferido de variante por sustitución implica la sustitución de uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo humanizado o humano. En general, la/s variante/s resultante/s seleccionada/s para el desarrollo posterior tendrá/n propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes por sustitución implica la maduración por afinidad usando la presentación en fagos. En síntesis, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de esta manera se presentan de manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado en cada partícula. A continuación, se exploran las variantes presentadas en el fago en cuanto a su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. Con el fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede aplicar la mutagénesis por rastreo de alanina para identificar los restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa, o además, puede ser beneficioso analizar una estructura del cristal del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el polipéptido TENB2 humano. Dichos restos de contacto y restos próximos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez generadas dichas variantes, se somete a exploración el grupo de variantes como se describe en el presente documento, pudiéndose seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para un desarrollo posterior.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo anti-TENB2 incluido en el alcance de la presente invención comprende la modificación del patrón de glucosilación nativo del anticuerpo o polipéptido mediante la eliminación de uno o más restos de hidrato de carbono hallados en el anticuerpo anti-TENB2 de secuencia nativa (bien mediante la eliminación del sitio de glucosilación subyacente o mediante la eliminación de la glucosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o la adición de uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo anti-TENB2 de secuencia nativa. Además, la modificación incluye cambios cualitativos en la glucosilación de las proteínas nativas, implicando un cambio en la naturaleza y las proporciones de los diversos restos de hidrato de carbono presentes. La glucosilación de anticuerpos y otros polipéptidos es habitualmente por unión a N o unión a O. La unión a N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto

prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación. La glucosilación por unión a O se refiere a la unión de uno de los azúcares *N*-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más habitualmente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo anti-TENB2 se puede realizar convenientemente modificando la secuencia de aminoácidos, de manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación unidos a N). La modificación se puede realizar mediante la adición de, o la sustitución con, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo anti-TENB2 (para sitios de glucosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-TENB2 se puede modificar opcionalmente mediante cambios a nivel del ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el anticuerpo anti-TENB2 en bases preseleccionadas, de manera que los codones que se generan se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otros medios para aumentar el número de restos hidrato de carbono en el anticuerpo anti-TENB2 son mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido. Dichos procedimientos están descritos en la técnica, por ejemplo, en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 259-306 (1981).

La eliminación de restos de hidrato de carbono presentes en el anticuerpo anti-TENB2 se puede realizar química o enzimáticamente, o mediante sustitución mutacional de codones que codifican los restos de aminoácidos que actúan como dianas para la glucosilación. Las técnicas de desglucosilación química son conocidas en la materia y están descritas, por ejemplo, por Hakimuddin, *et. al. Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) y por Edge, *et al. Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). La escisión enzimática de restos de hidrato de carbono se puede realizar mediante el uso de varias endo- y exoglucosidasas según lo descrito por Thotakura *et al.* (1987) *Meth. Enzymol.*, 138:350.

Otro tipo de modificación covalente de anticuerpo anti-TENB2 comprende la unión del anticuerpo o polipéptido a uno de varios polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la forma establecida en los documentos US 4640835; US 4496689; US 4301144; US 4670417; US 4791192 o US 4179337. El anticuerpo o polipéptido también se puede encapsular en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización de interfase (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato) respectivamente), en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en "Remington's Pharmaceutical Sciences", XVI Edición, Osol, A. ed. (1980).

El anticuerpo anti-TENB2 de la presente invención también se puede modificar de manera que forme moléculas quiméricas que comprendan un anticuerpo anti-TENB2 fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogo. En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión del anticuerpo anti-TENB2 con un polipéptido marcador que proporciona un epítipo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-marcador. El epítipo marcador se sitúa generalmente en el extremo amino o carboxilo terminal del anticuerpo anti-TENB2. La presencia de dichas formas marcadas con epítipo del anticuerpo anti-TENB2 se puede detectar usando un anticuerpo contra el polipéptido marcador. Además, la disposición del epítipo marcador permite purificar el anticuerpo anti-TENB2 fácilmente mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo anti-marcador u otro tipo de matriz de afinidad que se una al epítipo marcador. En la técnica, se conocen ampliamente varios polipéptidos marcadores y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos incluyen marcadores de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido marcador de gripe HA y su anticuerpo 12CA5 (Field *et al.* (1988), *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165); el marcador c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 del mismo (Evan *et al.* (1985), "Molecular and Cellular Biology", 5: 3610-3616); y el marcador de glucoproteína D (gD) del virus del Herpes Simplex y su anticuerpo (Paborsky *et al.*, (1990), *Protein Engineering*, 3(6): 547-553). Otros polipéptidos marcadores incluyen el péptido Flag (Hopp *et al.* (1988), *BioTechnology*, 6: 1204-1210); el péptido epítipo KT3 (Martin *et al.*, (1992), *Science*, 255: 192-194); un péptido epítipo de α -tubulina (Skinner *et al.* (1991), *J. Biol. Chem.*, 266: 15163-15166); y el péptido marcador de la proteína T7 del gen 10 (Lutz-Freyemuth *et al.* (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 87: 6393-6397).

En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del anticuerpo anti-TENB2 con una inmunoglobulina o una determinada región de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también denominada "inmuno adhesina"), dicha fusión podría ser a la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferentemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado) de un anticuerpo anti-TENB2 en lugar de al menos una región variable de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH₂ y CH₃, o las regiones bisagra, CH₁, CH₂ y CH₃ de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas (US 5428130).

Preparación de anticuerpos anti-TENB2

El ADN que codifica una variante de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína y los anticuerpos anti-TENB2 parentales de la invención se prepara mediante varios métodos que incluyen, pero sin limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos naturales), preparación por mutagénesis dirigida (o mediada por oligonucleótidos) (Carter (1985) *et al Nucleic Acids Res.* 13:4431-4443; Ho *et al* (1989) *Gene (Amst.)* 77:51-59; Kunkel *et al* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82:488; Liu *et al* (1998) *J. Biol. Chem.* 273:20252-20260), mutagénesis por PCR (Higuchi, (1990) en "PCR Protocols", pág.177-183. Academic Press; Ito *et al* (1991) *Gene* 102:67-70; Bernhard *et al* (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:126-132; y Vallette *et al* (1989) *Nuc. Acids Res.* 17:723-733) y mutagénesis de casete (Wells *et al* (1985) *Gene* 34:315-323) de un ADN preparado anteriormente que codifica el polipéptido. Los protocolos de mutagénesis, kits y reactivos se encuentran disponibles en el mercado, por ejemplo, el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QuikCchange® (Stratagene, La Jolla, CA). Las mutaciones individuales también se generan mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos usando un ADN plasmídico bicatenario como molde mediante la mutagénesis basada en PCR (Sambrook y Russel, (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", III Edición; Zoller *et al* (1983) *Methods Enzymol.* 100:468-500; Zoller, M. J. y Smith, M. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10:6487-6500). Las variantes de anticuerpos recombinantes se pueden construir también mediante la manipulación del fragmento de restricción o mediante el solapamiento de la extensión PCR con oligonucleótidos sintéticos. Los cebadores mutagénicos codifican la sustitución o sustituciones en el codón de cisteína. Las técnicas de mutagénesis convencionales se pueden emplear para generar ADN que codifique dichos anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína mutantes (Sambrook *et al* "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; y Ausubel *et al* "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, N. Y., 1993).

La tecnología de presentación en fagos (McCafferty *et al.* (1990), *Nature* 348, 552-553) se puede usar para producir anticuerpos anti-TENB2 humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en el marco en un gen de proteína de cubierta bien principal o secundaria de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentososa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Así pues, el fago mimetiza algunas de las propiedades del linfocito B. (Johnson *et al* (1993) "Current Opinion in Structural Biology" 3:564-571; Clackson *et al* (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks *et al* (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597; Griffith *et al* (1993) *EMBO J.* 12:725-734; US 5565332; US 5573905; US 5567610; US 5229275).

Los anticuerpos anti-TENB2 se pueden sintetizar químicamente usando la metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o se pueden preparar y purificar usando la tecnología recombinante. La secuencia de aminoácidos apropiada, o partes de la misma, se puede producir mediante síntesis directa de péptidos usando técnicas de fase sólida (Stewart *et al.*, "Solid-Phase Peptide Synthesis", (1969) W. H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154). La síntesis *in vitro* de proteínas se puede realizar usando técnicas manuales o automáticas. La síntesis automática en fase sólida se puede realizar, por ejemplo, empleando aminoácidos protegidos con *t*-BOC o Fmoc y usando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente varias partes del anticuerpo anti-TENB2 o polipéptido TENB2 por separado y combinarse usando métodos químicos o enzimáticos para producir el anticuerpo anti-TENB2 o polipéptido TENB2 deseado.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (Morimoto *et al.* (1992), *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117; y Brennan *et al.* (1985), *Science* 229:81) o se producían directamente mediante células huésped recombinantes. Todos los fragmentos de anticuerpo anti-TENB2 Fab, Fv y ScFv se pueden expresar y secretar de *E. coli*, permitiendo así la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpos en fagos descritas en el presente documento. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y se pueden acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.* (1992), *Bio/Technology* 10:163-167) o aislarse directamente del cultivo de células huésped recombinantes. El anticuerpo anti-TENB2 puede ser un fragmento Fv monocatenario (scFv) (WO 93/16185; US 5571894; y US 5587458). El fragmento de anticuerpo anti-TENB2 también puede ser un "anticuerpo lineal" (US 5641870). Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de anticuerpos anti-TENB2 mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-TENB2. El ADN que codifica los anticuerpos anti-TENB2 se puede obtener de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm de anticuerpo anti-TENB2 y expresarlo a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN de anticuerpo anti-TENB2 o polipéptido TENB2 humano se puede obtener convenientemente de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen que codifica el anticuerpo anti-TENB2

también se puede obtener de una biblioteca genómica o mediante procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis automática de ácidos nucleicos).

Las bibliotecas se pueden explorar con sondas (tales como oligonucleótidos de al menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. La exploración del ADNc o de la biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede realizar usando procedimientos convencionales, tal como se describe en Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el anticuerpo anti-TENB2 o polipéptido TENB2 es mediante la metodología de PCR [Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, "PCR Primer: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995).

Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en el presente documento para la producción del anticuerpo anti-TENB2 o polipéptido TENB2 y se cultivan en medios de nutrientes convencionales modificados para que sean adecuados para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, pueden ser seleccionadas por un experto en la materia sin necesidad de experimentación. En general, los principios, los protocolos y las técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares se pueden encontrar en "Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach", M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al.*, *supra*.

Las células huésped adecuadas para la clonación o la expresión del ADN en los vectores del presente documento incluyen células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Las procariotas adecuadas incluyen, pero sin limitación, eubacterias tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, enterobacterias tales como *E. coli*. Hay varias cepas de *E. coli* disponibles para el público, tales como la cepa de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) y K5772 (ATCC 53.635). Otras células huésped procariotas adecuadas incluyen enterobacterias tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P desvelado en DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos, y no limitantes. La cepa W3110 es una cepa de huésped a modo de ejemplo para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferentemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para realizar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al huésped, incluyendo los ejemplos de dichos huéspedes la cepa de *E. coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; la cepa de *E. coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^r*; la cepa de *E. coli* W3110 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; la cepa de *E. coli* W3110 40B4, que es una cepa 37D6 con una mutación de eliminación *degP* no resistente a kanamicina y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante (US 4946783). Como alternativa, son adecuados métodos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de ácido nucleico polimerasa.

El anticuerpo de longitud completa, los fragmentos de anticuerpo y las proteínas de fusión de anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular, cuando no son necesarias la glucosilación ni la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunocombinado por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de la célula tumoral. Los anticuerpos de longitud completa presentan una semivida mayor en la circulación. La producción en *E. coli* puede ser más rápida y más rentable usando, por ejemplo, la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias con la región de iniciación de la traducción (TIR) y las secuencias señal para optimizar la expresión y secreción (US 5.648.237; US 5789199; US 5840523). Después de la expresión, se aísla el anticuerpo de la pasta celular de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar a través de, por ejemplo, una columna de proteína A o G, dependiendo del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de forma similar al proceso para purificar el anticuerpo expresado, por ejemplo, en células CHO.

Además de las procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican el anticuerpo anti-TENB2 o el polipéptido TENB2. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior usado habitualmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, (1981) *Nature*, 290: 140; EP 139.383); huéspedes *Kluyveromyces* (US 4943529; Fleer *et al.* (1991), *Bio/Technology*, 9:968-975) tal como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS574; Louvencourt *et al* (1983) *J. Bacteriol.*, 154(2):737-742), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906; Van den Berg *et al* (1990) *Bio/Technology*, 8:135), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183070; Sreekrishna *et al* (1988) *J. Basic Microbiol.*, 28:265-278); *Candida: Trichoderma reesia* (EP 244234); *Neurospora crassa* (Case *et al* (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 76:5259-5263); *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394538); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyposcladium* (WO 91/00357) y huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance *et al* (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289; Tilburn *et al* (1983) *Gene*, 26:205-221; Yelton *et al* (1984) *Proc.*

Natl. Acad. Sci. EE.UU., 81: 1470-1474) y *A. niger* Kelly y Hynes, (1985) *EMBO J.*, 4:475-479). Las levaduras metilotrópicas son adecuadas en el presente documento, e incluyen, pero sin limitación, levadura capaz de crecer en metanol seleccionada de entre los géneros que consisten en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*.

5 Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpo anti-TENB2 o polipéptido TENB2 glucosilado se obtienen de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insectos tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales, tales como cultivos celulares de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco. Se han modificado numerosas cepas baculovíricas y variantes, y las correspondientes células huéspedes de insecto permisivas de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Hay varias cepas víricas para la transfección disponibles para el público, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden usar como el virus en el presente documento de acuerdo con la presente invención, particularmente, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

15 Los ejemplos de líneas celulares de huéspedes mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al.* (1977), *J. Gen Virol.*, 36:59); células de riñón de hámster neonato (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.* (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 77:4216); células de sertoli de ratón (TM4, Mather (1980), *Biol. Reprod.*, 23:243-251); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL34); 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 *et al.* (1982), *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

20 Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción del anticuerpo anti-TENB2 y se cultivan en medios de nutrientes convencionales modificados para que sean adecuados para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica el anticuerpo anti-TENB2 o polipéptido TENB2 se puede insertar en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula viral o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada se puede insertar en el vector mediante varios procedimientos.

30 La inhibición del crecimiento de células tumorales *in vitro* o *in vivo* se puede determinar de varias maneras conocidas en la técnica, tales como la inhibición de la proliferación celular de una célula tumoral que expresan TENB2 *in vitro* o *in vivo* en aproximadamente el 25-100 % en comparación con la célula tumoral sin tratar, o en aproximadamente el 30-100 %, o en aproximadamente el 50-100 % o 70-100 %, en una realización, a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. Los efectos inhibidores del crecimiento de un anticuerpo anti-TENB2 *in vitro* se pueden evaluar mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando células que expresan un polipéptido TENB2 bien endógenamente o tras la transfección con el gen TENB2. Por ejemplo, las líneas celulares tumorales apropiadas y las células transfectadas con TENB2 se pueden tratar con un anticuerpo monoclonal anti-TENB2 a varias concentraciones durante unos días (por ejemplo, 2-7 días) y teñirlas con violeta cristal o MTT o analizarlas mediante algún otro ensayo colorimétrico. Una señal reducida indica la inhibición del crecimiento. Otro método de medición de la proliferación sería mediante la comparación de la captación de ³H-timidina por las células tratadas en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-TENB2. Después del tratamiento, se recogen las células y se cuantifica la cantidad de radiactividad incorporada en el ADN en un contador de centelleo. La inhibición de la proliferación se demostraría por una reducción de la radiactividad. Para seleccionar un anticuerpo anti-TENB2 que induzca la muerte celular, se puede evaluar la pérdida de integridad de la membrana según lo indicado por, por ejemplo, captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano o 7AAD, con respecto al control. Los controles positivos apropiados incluyen el tratamiento de una línea celular seleccionada con un anticuerpo inhibidor del crecimiento conocido por inhibir el crecimiento de esa línea celular. La inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti-TENB2 a aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal genera la reducción del tamaño del tumor o la reducción de la proliferación de las células tumorales a los aproximadamente 5 días a 3 meses de la primera administración del anticuerpo, preferentemente en el transcurso de aproximadamente 5 a 30 días.

Preparación de anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína

65 Los métodos de diseño, selección y preparación de la invención permiten que los anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína sean reactivos con funcionalidades electrófilas. Estos métodos permiten además la conjugación de los anticuerpos a compuestos tales como compuestos conjugados de anticuerpo

y fármaco (ADC) con moléculas de fármacos en los sitios designados, diseñados y selectivos. Los restos de cisteína reactivos en la superficie de un anticuerpo permiten específicamente la conjugación de un resto farmacológico a través de un grupo reactivo tiol, tal como maleimida o haloacetilo. La reactividad nucleófila de la funcionalidad tiol de un resto de Cys en un grupo maleimida es aproximadamente 1.000 veces superior en comparación con cualquier otra funcionalidad de aminoácido en una proteína, tal como un grupo amino de restos de lisina o el grupo amino N-terminal. La funcionalidad específica de tiol en los reactivos de yodoacetilo y maleimida puede reaccionar con grupos amina, pero se requieren pH superiores (>9,0) y tiempos de reacción más prolongados (Garman, 1997, "Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach", Academic Press, Londres). La cantidad de tiol libre de una proteína se puede estimar mediante el ensayo de Ellman convencional. La inmunoglobulina M es un ejemplo de un pentámero unido a disulfuro, mientras que la inmunoglobulina G es un ejemplo de una proteína con puentes disulfuro internos que unen las subunidades entre sí. En proteínas tales como ésta, la reducción de los enlaces disulfuro con un reactivo, tal como ditioneitol (DTT) o sclenol (Singh *et al* (2002) *Anal. Biochem.* 304: 147-156) es necesaria para generar el tiol libre reactivo. Este enfoque puede dar lugar a una pérdida de la estructura terciaria del anticuerpo y de especificidad de unión al antígeno.

El ensayo PHESELECTOR (Phage ELISA for Selection of Reactive Thiols) permite la detección de grupos de cisteína reactivos en Fab de anticuerpos en un formato de fagos para ELISA ayudando así en el diseño de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína (US 20007/0092940). El antígeno que se une al anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína se recubre en las superficies del pocillo, seguido de la incubación con partículas de fago que presentan Fab modificados por ingeniería genética con cisteína, la adición de anticuerpo secundario marcado con HRP y la detección de la absorbancia. Las proteínas mutantes presentadas en fagos se pueden explorar de una manera rápida, potente y con alto rendimiento. Las bibliotecas de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína se pueden producir y someter a la selección de unión usando el mismo enfoque usado para identificar sitios apropiadamente reactivos de incorporación de Cys libres a partir de bibliotecas de anticuerpos u otras proteínas en fagos de proteínas aleatorias. Esta técnica incluye la reacción de proteínas mutantes de cisteína presentadas en fagos con un reactivo de afinidad o grupo indicador que también es reactivo con tiol.

El ensayo PHESELECTOR permite la exploración de grupos tiol reactivos en anticuerpos. La identificación de la variante A121C mediante este método es un ejemplo. La molécula Fab completa se puede buscar de manera eficaz para identificar más variantes de TioFab con grupos tiol reactivos. Se empleó un parámetro, la accesibilidad de la superficie fraccionaria, para identificar y cuantificar la accesibilidad del disolvente a los restos de aminoácidos en un polipéptido. La accesibilidad de la superficie se puede expresar como el área superficial (\AA^2) que se puede poner en contacto por una molécula disolvente, por ejemplo, agua. El espacio ocupado de agua es aproximadamente una esfera de radio 1,4 \AA . El programa informático se puede obtener con o sin licencia (para CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, Reino Unido, Fax: (+44) 1925 603825, o por internet: www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html) como paquete CCP4 de programas de cristalografía que emplea algoritmos para calcular la accesibilidad de superficie de cada aminoácido de una proteína con coordenadas conocidas derivadas de cristalografía con rayos X ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) *Acta. Cryst.* D50:760763). Dos módulos de programa informático de ejemplo que realizan los cálculos de accesibilidad de superficie son "AREAIMOL" y "SURFACE", basándose 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 como el locus del centro de una esfera sonda (que representa una molécula de disolvente) a medida que gira sobre la superficie de Van der Waals de la proteína. AREAIMOL calcula la superficie accesible al disolvente mediante la generación de puntos superficiales en una esfera extendida alrededor de cada átomo (a una distancia desde el centro del átomo igual a la suma del átomo y los radios de las sondas) y la eliminación de los que se encuentran en esferas equivalentes asociadas con átomos vecinos. AREAIMOL encuentra el área accesible al disolvente de los átomos en un archivo de coordenadas PDB y resume el área accesible por resto, por cadena y para la molécula completa. Las áreas accesibles (o diferencias de área) para cada uno de los átomos se puede escribir en un archivo de salida pseudo-PDB. AREAIMOL asume un radio único para cada elemento y solo reconoce un número limitado de elementos diferentes.

AREAIMOL y SURFACE describen accesibilidades absolutas, es decir, el número de Angstroms (\AA) al cuadrado. La accesibilidad de superficie fraccionada se calcula en referencia a un estado estándar relevante para un aminoácido en un polipéptido. El estado de referencia es un tripéptido Gly-X-Gly, donde X es el aminoácido de interés, y el estado de referencia debe estar en una configuración "extendida", es decir como las de las cadenas beta. La configuración extendida maximiza la accesibilidad de X. Un área de accesibilidad calculada se divide entre el área accesible en un estado de referencia de tripéptido Gly-X-Gly y describe el cociente, que es la accesibilidad fraccionada. El porcentaje de accesibilidad es la accesibilidad fraccionada multiplicada por 100. Otro algoritmo de ejemplo para calcular la accesibilidad de la superficie se basa en el módulo SOLV del programa xsae (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche. Basel, que calcula la accesibilidad fraccionada de un resto de aminoácido con respecto a una esfera de agua basándose en las coordenadas de rayos X del polipéptido. La accesibilidad de superficie fraccionada para cada aminoácido en un anticuerpo se puede calcular usando la información de la estructura cristalina disponible (Eigenbrot *et al.* (1993) *J Mol Biol.* 229:969-995).

El ADN que codifica los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que sean capaces de unirse específicamente a genes que codifiquen las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión que, a continuación, se transfieren en células huésped tales como células *E. coli*, células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), u otras células huésped de mamífero tales como células de mieloma (US 58077715; US 2005/0048572; US 2004/0229310), que de otro modo no producen la proteína anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes.

Tras el diseño y la selección, se pueden producir anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína, por ejemplo, TioFab, con restos Cys diseñados por ingeniería genética no emparejados altamente reactivos, mediante: (i) la expresión en un sistema bacteriano, por ejemplo, *E. coli* (Skerra *et al* (1993) *Curr. Opin. Immunol.* 5:256-262; Plückerthun (1992) *Immunol. Revs.* 130: 151-188) o un sistema de cultivo de células de mamífero (WO 01/00245), por ejemplo células de Ovario de Hámster Chino (CHO); y (ii) la purificación usando técnicas comunes de purificación de proteínas (Lowman *et al* (1991) *J. Biol. Chem.* 266 (17):10982-10988).

Los grupos tiol de Cys diseñados por ingeniería genética reaccionan con reactivos enlazadores electrófilos y productos intermedios de fármaco y enlazador para formar conjugados de anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína y fármaco, y otros anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína marcados. Los restos de Cys de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína y presentes en los anticuerpos parentales, que están emparejados y forman puentes disulfuro intercatenarios e intracatenarios no tienen ningún grupo tiol reactivo (a menos que se traten con un agente reductor) y no reaccionan con reactivos enlazadores electrófilos o productos intermedios de fármaco y enlazador. El resto de Cys recién diseñado puede permanecer sin emparejarse y ser capaz de reaccionar con, es decir conjugarse a, un reactivo enlazador electrófilo o producto intermedio de fármaco y enlazador, tal como un producto de fármaco y maleimida. Los productos intermedios de fármaco y enlazador de ejemplo incluyen: MC-MMAE, MC-MMAF, MC-vc-PAB-MMAE y MC-vc-PAB-MMAF. Las posiciones de estructura de los restos de Cys diseñados de las cadenas pesada y ligera se enumeran de acuerdo con un sistema de numeración secuencial. Este sistema de numeración secuencial se correlaciona con el sistema de numeración Kabat (Kabat *et al.*, (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", V Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) que empieza en el extremo N, y difiere del esquema de numeración de Kabat (fila inferior) en las inserciones indicadas por a, b, c. Usando el sistema de numeración Kabat, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento de o una inserción en una FR o CDR del dominio variable. Los sitios variantes de la cadena pesada modificada por ingeniería genética con cisteína se identifican por la numeración secuencial y los esquemas de numeración de Kabat.

En una realización, el anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína se prepara mediante un proceso que comprende:

(a) reemplazar uno o más restos de aminoácidos de un anticuerpo anti-TENB2 parental por cisteína; y
(b) determinar la reactividad del tiol del anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína mediante la reacción del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con un reactivo que reaccione con tiol.

El anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína puede ser más reactivo que el anticuerpo parental con el reactivo que reacciona con tiol.

Los restos de aminoácidos de cisteína libres se pueden ubicar en las cadenas pesada o ligera, o en los dominios constante o variable. Los fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, Fab, también se pueden diseñar por ingeniería genética con uno o más aminoácidos de cisteína que reemplacen a los aminoácidos del fragmento de anticuerpo, formando los fragmentos de anticuerpo modificados por ingeniería genética con cisteína.

También se describe en el presente documento un método de preparación (fabricación) de un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, que comprende:

(a) introducir uno o más aminoácidos de cisteína en un anticuerpo anti-TENB2 parental para generar un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína; y
(b) determinar la reactividad del tiol del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con un reactivo que reacciona con tiol;

en el que el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína es más reactivo que el anticuerpo parental con el reactivo que reacciona con tiol.

La etapa (a) del método de preparación de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína puede comprender:

- (i) mutagenizar una secuencia de ácido nucleico que codifique el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína;
- (ii) expresar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína; y
- (iii) aislar y purificar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína.

5 La etapa (b) del método de preparación de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína puede comprender expresar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína en una partícula viral seleccionada de entre un fago o una partícula de fagémido.

10 La etapa (b) del método de preparación de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína también puede comprender:

- (i) hacer reaccionar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con un reactivo de afinidad que reacciona con tiol para generar un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína marcado por afinidad; y
- (ii) medir la unión del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína marcado por afinidad a un medio de captura.

20 También se describe en el presente documento un método de exploración de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína con aminoácidos de cisteína no emparejados altamente reactivos en cuanto a la reactividad del tiol que comprende:

- (a) introducir uno o más aminoácidos de cisteína en un anticuerpo parental para generar un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína;
- (b) hacer reaccionar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con un reactivo de afinidad que reacciona con tiol para generar un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína marcado por afinidad; y
- (c) medir la unión del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína marcado por afinidad a un medio de captura, y
- (d) determinar la reactividad del tiol del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con el reactivo que reacciona con tiol.

35 La etapa (a) del método de exploración de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína puede comprender:

- (i) mutagenizar una secuencia de ácidos nucleicos que codifique el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína;
- (ii) expresar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína; y
- (iii) aislar y purificar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína.

40 La etapa (b) del método de exploración de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína puede comprender expresar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína en una partícula viral seleccionada de entre un fago o una partícula de fagémido.

45 La etapa (b) del método de exploración de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína también puede comprender:

- (i) hacer reaccionar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con un reactivo de afinidad que reacciona con tiol para generar un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína marcado por afinidad; y
- (ii) medir la unión del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína marcado por afinidad a un medio de captura.

Modificación genética con cisteína de variantes IgG de TMEFF2 N° 19

55 La cisteína se introdujo en el sitio 121 de la cadena pesada (numeración secuencial excluyendo la secuencia señal) de anticuerpos TMEFF2 N° 19 anti-TENB2 monoclonales parentales humanizados, de longitud completa, mediante los métodos de ingeniería genética con cisteína descritos en el presente documento, dando la variante humanizada de TMEFF2 N° 19 anti-TENB2 tio hu A121C con secuencia de la cadena pesada: SEC ID N°: 3, y la secuencia de la
60 cadena ligera: SEC ID N°: 2, Figura 1. Estos anticuerpos monoclonales modificados por ingeniería genética con cisteína se expresaron en células CHO (ovario de hámster chino) por fermentación transitoria en medios que contenían cisteína 1 mM.

65 De acuerdo con una realización, los anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína TMEFF2 N° 19 humanizados comprenden una o más de las siguientes secuencias de cadena pesada de la región variable con un aminoácido de cisteína libre (Tabla 1).

Tabla 1 Comparación de la numeración secuencial, Kabat y Eu de la cadena pesada para variantes de anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína TMEFF2 N° 19 hu

Secuencia cercana a la mutación de Cys	Numeración secuencial	Numeración Kabat	Numeración Eu	ID de secuencia
DVQLCESGPG	Q5C	Q5C		8
LSLTCCVSGYS	A23C	A23C		9
LSSVTCADTAV	A88C	A84C		10
TLVTVCASSTK	S119C	S112C		11
VTVSSCSTKGP	A121C	A114C	A118C	12
VSSASCKGPSV	T123C	T116C	T120C	13
WYVDGCEVHNA	V285C	V278C	V282C	14
KGFYPCDIAVE	S378C	S371C	S375C	15
PPVLDCDGSFF	S403C	S396C	S400C	16

- 5 De acuerdo con una realización, los anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína TEMFF2 N° 19 humanizados comprenden una o más de las siguientes secuencias de cadena ligera de la región variable con un aminoácido de cisteína libre (Tabla 2).

Tabla 2 Comparación de la numeración secuencial y Kabat de la cadena ligera para variantes de anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína TMEFF2 N° 19 hu

Secuencia cercana a la mutación de Cys	Numeración secuencial	Numeración Kabat	ID de secuencia
SLSASCGDRVT	V15C	V15C	17
EIKRTCAAPSV	V110C	V110C	18
TVAAPCVFIFP	S114C	S114C	19
FIFPPCDEQLK	S121C	S121C	20
DEQLKCGTASV	S127C	S127C	21
VTEQDCKDSTY	S168C	S168C	22
GLSSPCKTSFN	V205C	V205C	23

10

Anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína marcados

- 15 Los anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína se pueden acoplar específicamente a un sitio y de manera eficaz con un reactivo que reacciona con tiol. El reactivo que reacciona con tiol puede ser un reactivo enlazador multifuncional, un reactivo marcador de captura, es decir, de afinidad (por ejemplo, un reactivo enlazador de biotina), un marcador 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 y enlazador. Un ejemplo de reactivo que reacciona con tiol es *N*-etil-maleimida (NEM). En una realización de ejemplo, la reacción de un TioFab con un reactivo enlazador de biotina proporciona un TioFab biotinilado mediante el cual se puede detectar y medir la presencia y reactividad del resto de cisteína diseñado por ingeniería genética. La reacción de un TioFab con un reactivo enlazador multifuncional proporciona un TioFab con un enlazador funcionalizado que se puede hacer reaccionar posteriormente con un reactivo de resto farmacológico u otro marcador. La reacción de un TioFab con un producto intermedio de fármaco y enlazador proporciona un conjugado de TioFab y fármaco.

- 25 Los métodos ilustrativos descritos en el presente documento se pueden aplicar, en general, a la identificación y producción de anticuerpos, y más en general, a otras proteínas a través de la aplicación de las etapas de diseño y exploración descritas en el presente documento.

- 30 Dicho enfoque se puede aplicar a la conjugación de otros reactivos que reaccionan con tiol en los que el grupo reactivo es, por ejemplo, una maleimida, una yodoacetamida, un disulfuro de piridilo u otra pareja de conjugación reactiva 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 que reacciona con tiol puede ser un resto farmacológico, un fluoróforo, tal como un colorante fluorescente como fluoresceína o rodamina, un agente quelante para la obtención de imágenes o metal radioterapéutico, un marcador o marcador de detección de peptidilo o no peptidilo, o un agente modificador del aclarado tal como varios siómeros de polietilenglicol, un péptido que se une a un tercer componente u otro agente de hidrato de carbono o lipófilo.

Usos de los anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína

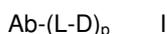
Los anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína, y los conjugados de los mismos, pueden ser útiles como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico. En el presente documento, se describen además métodos para prevenir, manejar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con un trastorno relacionado con TENB2. En particular, se describen métodos para prevenir, manejar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con un trastorno proliferativo celular, tal como cáncer, por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer uterino, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón o cáncer de mama.

También se describen métodos para el diagnóstico de un trastorno relacionado con TENB2 o de la predisposición a desarrollar dicho trastorno, así como métodos para identificar anticuerpos, y fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos, que se unen preferentemente a los polipéptidos TENB2 asociados a células.

También se describe el uso de un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una afección que es sensible a un trastorno relacionado con TENB2.

CONJUGADOS DE ANTICUERPO ANTI-TENB2 MODIFICADO POR INGENIERÍA GENÉTICA CON CISTEÍNA Y FÁRMACO

Otro aspecto de la invención es un compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco que comprende un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína (Ab), y un resto farmacológico de auristatina (D), en el que el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína está unido a través de uno o más aminoácidos de cisteína libres por un resto enlazador (L) a D; teniendo el compuesto la Fórmula I:



donde p es 1, 2, 3 o 4; y en el que el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína se prepara mediante un proceso que comprende reemplazar uno o más restos de aminoácidos de un anticuerpo anti-TENB2 parental por uno o más aminoácidos de cisteína libres según lo expuesto en las reivindicaciones.

La Figura 5 muestra realizaciones de conjugados de anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína y fármaco (ADC) donde un resto farmacológico de auristatina está unido a un grupo de cisteína diseñado por ingeniería genética en: la cadena ligera (LC-ADC); la cadena pesada (HC-ADC); y la región Fc (Fc-ADC).

Las ventajas potenciales de los conjugados de anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína y fármaco incluyen una mayor seguridad (mayor índice terapéutico), mejores parámetros PK, se mantienen los enlaces disulfuro intercatenarios del anticuerpo que pueden estabilizar el conjugado y mantener su configuración de unión activa, los sitios de la conjugación al fármaco están definidos y la preparación del conjugados de anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína y fármaco a partir de la conjugación de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína a reactivos enlazadores de fármacos da lugar a un producto más homogéneo.

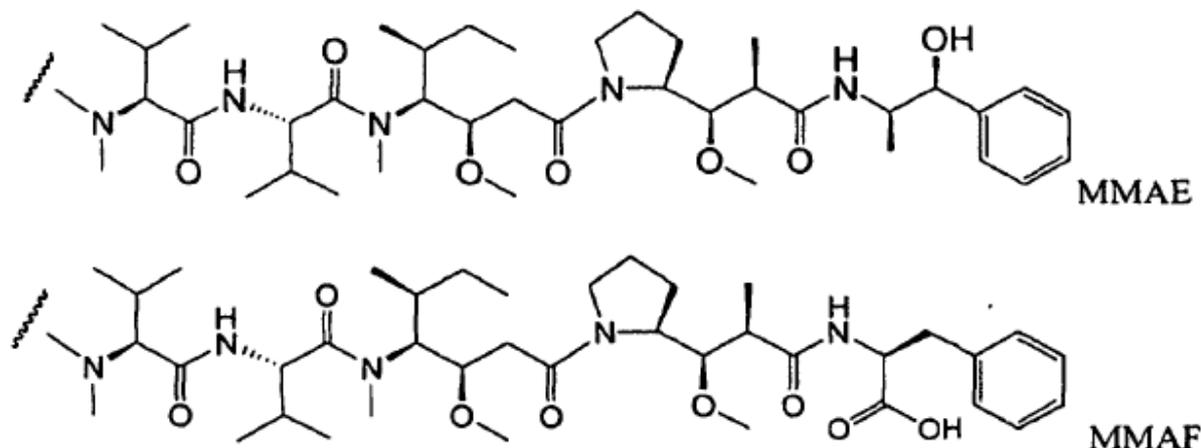
Restos farmacológicos

Los restos farmacológicos de auristatina de los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) de Fórmula I incluyen dolastatinas, auristatinas (US 5635483; US 5780588; US 5767237; US 6124431), y análogos y derivados de las mismas. Se ha observado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren en la dinámica de microtúbulos, hidrólisis de GTP, y división nuclear y celular (Woyke *et al* (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12): 3580-3584) y tienen actividad anticancerosa (US 5663149) y antifúngica (Pettit *et al* (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). Varias formas de resto farmacológico de dolastatina o auristatina se pueden unir covalentemente a un anticuerpo a través del extremo N (amino) o C (carboxilo) del resto farmacológico peptídico (WO 02/088172; Doronina *et al* (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784; Francisco *et al* (2003) “Blood” 102(4):1458-1465).

Las realizaciones de auristatina a modo de ejemplo incluyen los restos farmacológicos DE y DF de monometilauristatina unidos por el extremo N desvelados en el documento WO 2005/081711; Senter *et al*, “Proceedings of the American Association for Cancer Research”, Volumen 45, Sumario N° 623, presentado del 28 de marzo de 2004. Los restos farmacológicos de auristatina a modo de ejemplo incluyen MMAE y MMAF.

El resto farmacológico (D) de auristatina de los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) de Fórmula I incluyen restos farmacológicos de monometilauristatina MMAE y MMAF. El extremo N del resto farmacológico MMAE o

MMAF está unido covalentemente a través de un enlazador a una cisteína diseñada por ingeniería genética del anticuerpo.



5 Otros restos farmacológicos de auristatina a modo de ejemplo incluyen compuestos de monometilvalina que tienen modificaciones de carboxi de fenilalanina en el extremo C del resto farmacológico pentapeptídico de auristatina (WO 2007/008848) y compuestos de monometilvalina que tienen modificaciones en la cadena lateral de fenilalanina en el extremo C del resto farmacológico pentapeptídico de auristatina (WO 2007/008603).

10 Por lo general, se pueden preparar restos farmacológicos a base de péptidos mediante la formación de un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pág 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos.

15 Enlazadores

"Enlazador", "unidad enlazadora" o "enlace" significa un resto químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo a un resto farmacológico. En varias realizaciones, un enlazador se especifica como L. Un "enlazador" (L) es un resto bifuncional o multifuncional que se puede usar para unir uno o más restos farmacológicos (D) y una unidad de anticuerpo (Ab) para formar conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) de Fórmula I. Los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) se pueden preparar convenientemente usando un enlazador que tenga una funcionalidad reactiva para la unión al fármaco y al anticuerpo. Un tiol de cisteína de un anticuerpo (Ab) modificado por ingeniería genética con cisteína puede formar un enlace con un grupo funcional electrófilo de un reactivo enlazador, un resto farmacológico o un producto intermedio de fármaco y enlazador.

En un aspecto, un enlazador tiene un sitio reactivo que tiene un grupo electrófilo que es reactivo a una cisteína nucleófila presente en un anticuerpo. El tiol de cisteína del anticuerpo es reactivo con un grupo electrófilo en un enlazador y forma un enlace covalente con un enlazador. Los grupos electrófilos útiles incluyen, pero sin limitación, grupos maleimida y haloacetamida.

Los enlazadores incluyen un radical divalente, tal como alquildilio, un arileno, un heteroarileno, restos tales como: $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, unidades de repetición de alquiloxi (por ejemplo, polietilenoxi, PEG, polimetilenoxi) y alquilamino (por ejemplo, polietilenoamino, Jeffamine™); y éster de diácido y amidas incluyendo succinato, succinamida, diglicolato, malonato y caproamida.

Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína reaccionan con reactivos enlazadores o productos intermedios de fármaco y enlazador, con grupos funcionales electrófilos tales como maleimida o α -halo-carbonilo, de acuerdo con el método de conjugación en la página 766 de Klussman, *et al* (2004), "Bioconjugate Chemistry" 15(4):765-773, y de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 3.

El enlazador puede estar compuesto de uno o más componentes enlazadores. Los ejemplos de componentes enlazadores incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit" o "vc"), alanina-fenilalanina ("alaph" o "af"), *p*-aminobenciloicarbonylo ("PAB"), *N*-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato ("SPP"), *N*-succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato ("SMCC"), *N*-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato ("SIAB"), etilenoxi $-CH_2CH_2O-$ como una o más unidades de repetición ("EO" o "PEO"). En la técnica, se conocen otros componentes enlazadores adicionales, y algunos se describen en el presente documento.

En una realización, el enlazador L de un ADC tiene la fórmula:

-A_a-W_w-Y_y-

en la que:

- 5 -A- es unidad de extensión unida covalentemente a un tiol de cisteína del anticuerpo (Ab);
a es 0 o 1;
cada -W- es, de manera independiente, una unidad de aminoácido;
w es, de manera independiente, un número entero que varía de 0 a 12;
-Y- es una unidad espaciadora unida covalentemente al resto farmacológico; e
10 y es 0, 1 o 2.

Unidad de extensión

15 La unidad de extensión (-A-), cuando está presente, es capaz de unir una unidad de anticuerpo a una unidad de aminoácido (-W-). En este sentido, un anticuerpo (Ab) tiene un grupo tiol de cisteína libre que puede formar un enlace con un grupo funcional electrófilo de una unidad de extensión. Las unidades de extensión a modo de ejemplo en los conjugados de Fórmula I están representadas por las Fórmulas II y III, en las que Ab-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se han definido anteriormente, y R¹⁷ es un radical divalente seleccionado de entre (CH₂)_r, carbociclilo C₃-C₈, O-(CH₂)_r, arileno, (CH₂)_r-arileno, -arilen-(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, de manera independiente, un número entero que varía de 1 a 10.

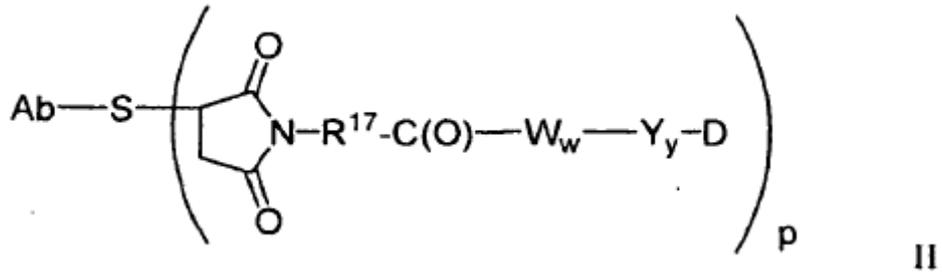
25 Arileno incluye radicales hidrocarburo aromáticos divalentes de 6-20 átomos de carbono obtenidos mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno del sistema de anillo aromático. Los grupos arileno más comunes incluyen, pero sin limitación, radicales derivados de benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares.

30 Los grupos heterociclilo incluyen un sistema de anillo en el que uno o más átomos del anillo son un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre. El radical heterociclo comprende de 1 a 20 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre N, O, P y S. Un heterociclo puede ser un monociclo que tenga de 3 a 7 miembros por anillo (2 a 6 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre N, O, P y S) o un biciclo que tiene de 7 a 10 miembros por anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre N, O, P y S), por ejemplo: un sistema 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), en concreto, en 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 la actualidad), en particular, los Volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y *J. Am. Chem. Soc.* (1960) 82:5566.

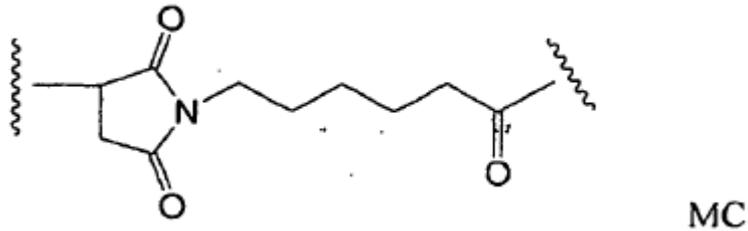
40 Los ejemplos de heterociclos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo oxidado con azufre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, bis-tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, bis-tetrahidropiranilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, octahidroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, 45 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, 4H-carbazolilo, carbazolilo, β-carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, 50 benzotriazolilo, bencisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo e isatinoílo.

Los grupos carbociclilo incluyen un anillo saturado o insaturado que tiene de 3 a 7 átomos de carbono como un monociclo o de 7 a 12 átomos de carbono como un biciclo. Los carbociclos monociclos tienen de 3 a 6 átomos por anillo, aún más normalmente 5 o 6 átomos por anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen de 7 a 12 átomos por anillo, por ejemplo, dispuestos como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], o 9 o 10 átomos por anillo dispuestos como un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. Los 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.

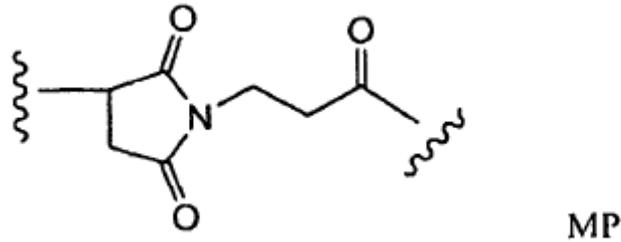
60 Se ha de entender, a partir de todas las realizaciones a modo de ejemplo de ADC de Fórmula I, tal como II-V, que incluso cuando no se indica expresamente, de 1 a 4 restos farmacológicos están unidos a un anticuerpo (p = 1-4), dependiendo del número de restos de cisteína diseñados por ingeniería genética.



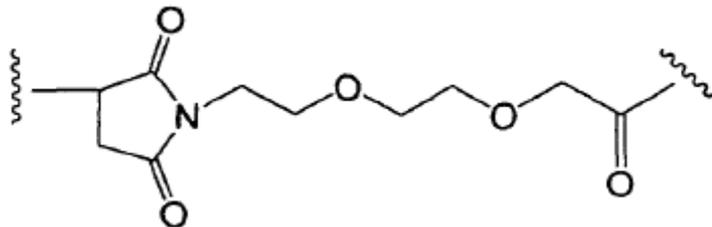
Una unidad de extensión de Fórmula II ilustrativa deriva de maleimido-caproílo (MC), en la que R¹⁷ es -(CH₂)₅-;



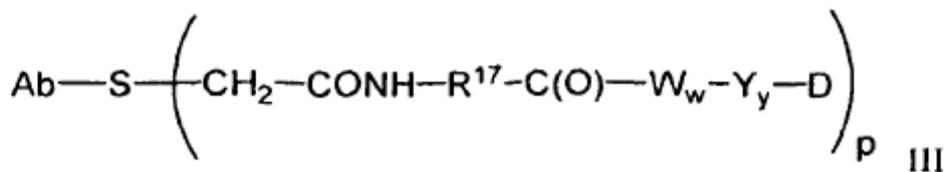
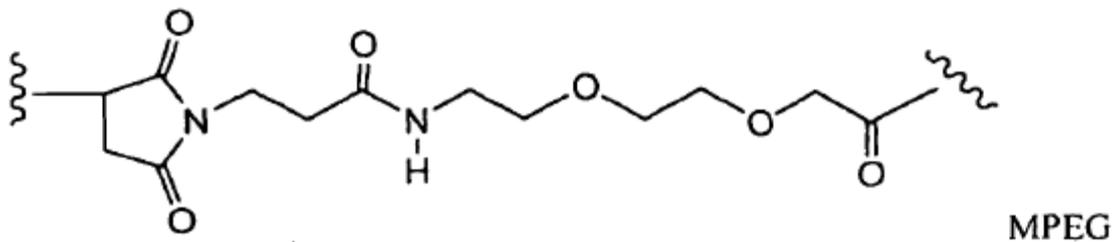
Una unidad de extensión de Fórmula II ilustrativa deriva de maleimido-propanoílo (MP), en la que R¹⁷ es -(CH₂)₂-:



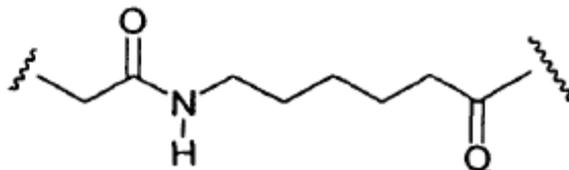
5 Otra unidad de extensión de Fórmula II ilustrativa, en la que R¹⁷ es -(CH₂CH₂O)_r-CH₂- y r es 2:



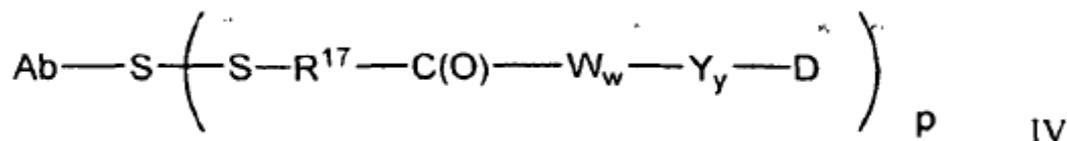
Otra unidad de extensión de Fórmula II ilustrativa, en la que R¹⁷ es -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, donde R^b es H y cada r es 2:



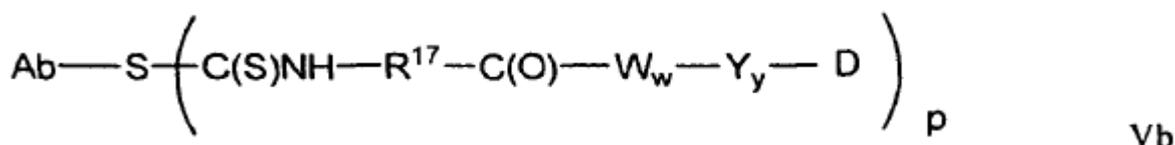
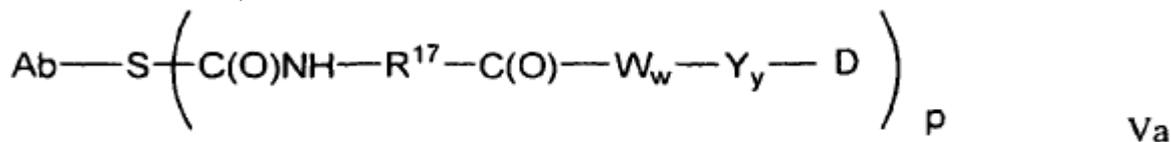
Una unidad de extensión de Fórmula III ilustrativa, en la que R¹⁷ es -(CH₂)₅-;



5 En otra realización, la unidad de extensión está unida al anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína a través de un enlace disulfuro entre el átomo de azufre de la cisteína diseñada por ingeniería genética del anticuerpo y el átomo de azufre de la unidad de extensión. Una unidad de extensión representativa de la presente realización se representa mediante la Fórmula IV, en la que R¹⁷, Ab-, -W_w-, -Y_y-, -D, w e y son como se han definido anteriormente.



10 En otra realización más, el grupo reactivo del extensor contiene un grupo funcional reactivo con tiol que puede formar un enlace con un tiol de cisteína libre de un anticuerpo. Los ejemplos de grupos funcionales de reacción con tiol incluyen, pero sin limitación, maleimida, α-haloacetilo, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Las unidades de extensión representativas de la presente realización se representan mediante las fórmulas Va y Vb, en las que -R¹⁷-, Ab-, -W_w-, -Y_y-, -D, w e y son como se han definido anteriormente;



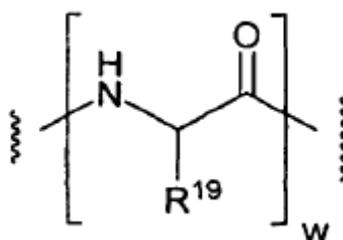
20 En otra realización, el enlazador puede ser un enlazador de tipo dendrítico para la unión covalente de más de un resto farmacológico a través de un resto enlazador multifuncional de ramificación a un anticuerpo (Sun *et al* (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215; Sun *et al* (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768; King (2002) *Tetrahedron Letters* 43:1987-1990). Los enlazadores dendríticos pueden aumentar la proporción molar del fármaco con respecto al anticuerpo, es decir, la carga, que está relacionada con la potencia del ADC. De este modo, cuando un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína porta solamente un grupo tiol de cisteína reactivo, se pueden unir una multitud de restos farmacológicos a través de un enlazador dendrítico.

25 Unidad de aminoácido

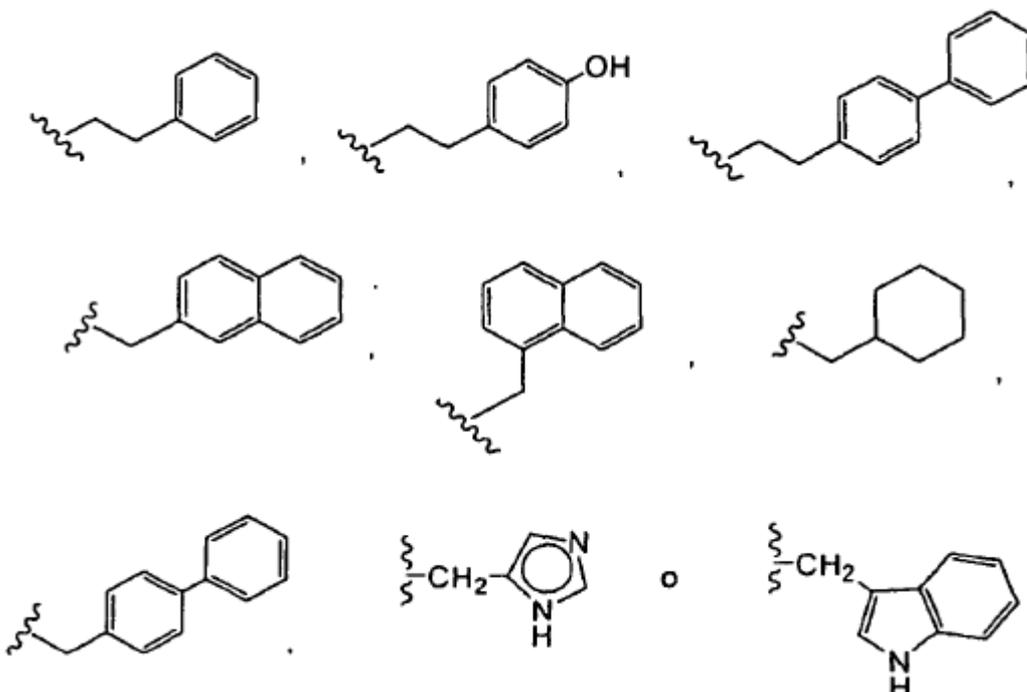
El enlazador puede comprender restos de aminoácidos. La unidad de aminoácido (-W_w-), cuando está presente, une el anticuerpo (Ab) al resto farmacológico (D) del conjugado de anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína y fármaco (ADC) de la invención.

30 -W_w- es una unidad de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido. Los restos de aminoácidos que comprenden la unidad de aminoácido incluyen aquellos naturales, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos no naturales, tales como citrulina. Cada unidad de -W- tiene, de manera independiente, la fórmula indicada a continuación entre corchetes, y w es un número entero que varía de 0 a 12:

35



- 5 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-piridilmetilo-, 3-piridilmetilo-, 4-piridilmetilo-, fenilo, ciclohexilo,



- 10 Cuando R^{19} es distinto de hidrógeno, el átomo de carbono al que R^{19} está unido es quiral. Cada átomo de carbono al que R^{19} está unido está, de manera independiente, en configuración (*S*) o (*R*), o una mezcla racémica. Las unidades de aminoácido pueden ser, por tanto, enantioméricamente puras, racémicas o diastereoméricas.

- 15 Las unidades de aminoácido $-\text{W}_w-$ a modo de ejemplo incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los ejemplos de dipéptidos incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los ejemplos de tripéptidos incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los restos de aminoácidos que comprenden un componente enlazador de aminoácido incluyen los naturales, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos no naturales tales como la citrulina.

- 20 La unidad de aminoácido puede ser escindida enzimáticamente por una o más enzimas, incluyendo una proteasa asociada a un tumor, para liberar el resto farmacológico ($-\text{D}$), que en una realización es protonado *in vivo* tras su liberación para proporcionar un Fármaco (D). Los componentes enlazadores de aminoácido se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para la escisión enzimática mediante una determinada enzima, por ejemplo, una proteasa asociada a un tumor, cathepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.

25 Unidad espaciadora

- 30 La unidad espaciadora ($-\text{Y}_y-$), cuando está presente ($y = 1$ o 2), une una unidad de aminoácido ($-\text{W}_w-$) al resto farmacológico (D) cuando hay una unidad de aminoácido presente ($w = 1-12$). Como alternativa, la unidad espaciadora une la unidad de extensión al resto farmacológico cuando la unidad de aminoácido está ausente. La unidad espaciadora también une el resto farmacológico a la unidad de anticuerpo cuando tanto la unidad de aminoácido como la unidad de extensión están ausentes ($w, y = 0$). Las unidades espaciadoras son de dos tipos generales: autoinmolativas y no autoinmolativas. Una unidad espaciadora no autoinmolativa es aquella en la que

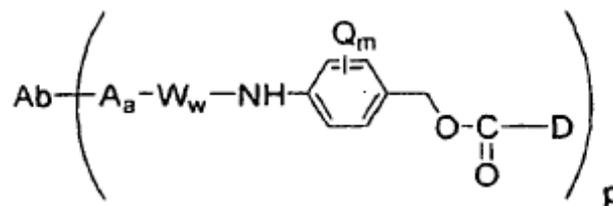
parte o toda la unidad espaciadora permanece unida al resto farmacológico tras la escisión, particularmente enzimática, de una unidad de aminoácido del conjugado de anticuerpo y fármaco o el enlazador del fármaco. Cuando un ADC que contiene una unidad espaciadora glicina-glicina o una unidad espaciadora de glicina experimenta una escisión enzimática a través de una proteasa asociada a una célula tumoral, una proteasa asociada a una célula cancerosa o una proteasa asociada a un linfocito, un resto farmacológico-glicina-glicina o un resto farmacológico-glicina se escinde de Ab-A_a-W_w⁻. En una realización, tiene lugar una reacción de hidrólisis independiente en la célula diana, escindiendo la glicina-resto farmacológico y liberando el fármaco.

En otra realización, -Y_y⁻ es una unidad de *p*-aminobencilcarbamoilo (PAB) cuya parte de fenileno está sustituida con Q_m, en el que Q es alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0 a 4.

Las realizaciones a modo de ejemplo de una unidad espaciadora no autoinmolativa (-Y_y⁻) son: -Gly-Gly-; -Gly-; -Ala-Phe-; -Val-Cit-.

En una realización, se proporciona un enlazador de resto farmacológico o un ADC en el que la unidad espaciadora está ausente (y = 0), o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

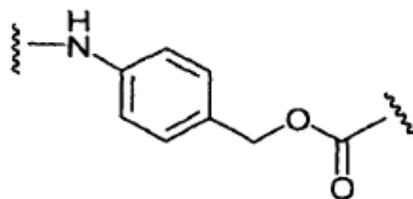
Como alternativa, un ADC que contiene una unidad espaciadora autoinmolativa puede liberar -D. En una realización, -Y_y⁻ es un grupo PAB que está unido a -V_w⁻ a través del átomo de nitrógeno de amino del grupo PAB, y conectado directamente a -D a través de un grupo carbonato, carbamato o éter, donde el ADC tiene la estructura ilustrativa:



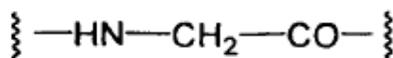
en la que Q es alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0 a 4; y p varía de 1 a 4.

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

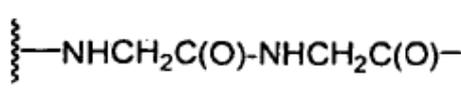
Las unidades espaciadoras a modo de ejemplo (-Y_y⁻) se representan por las Fórmulas X-XII:



X



XI

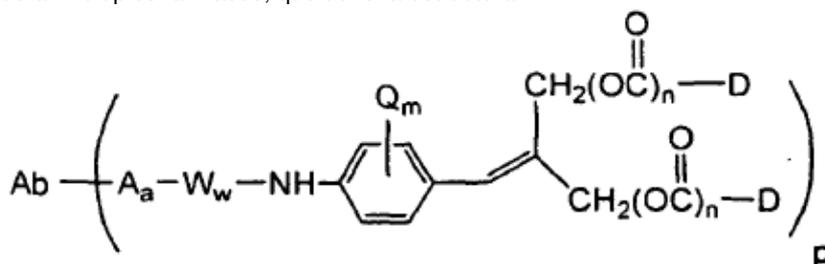


XII

Enlazadores dendríticos

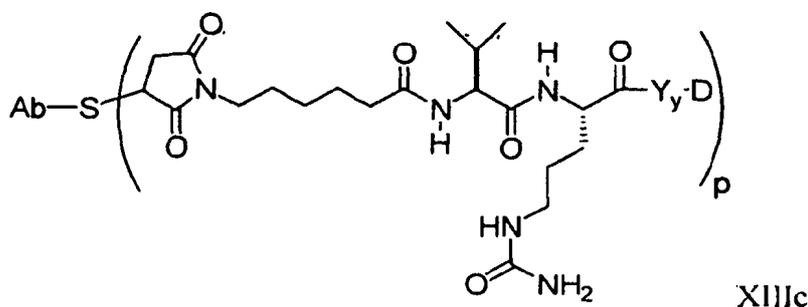
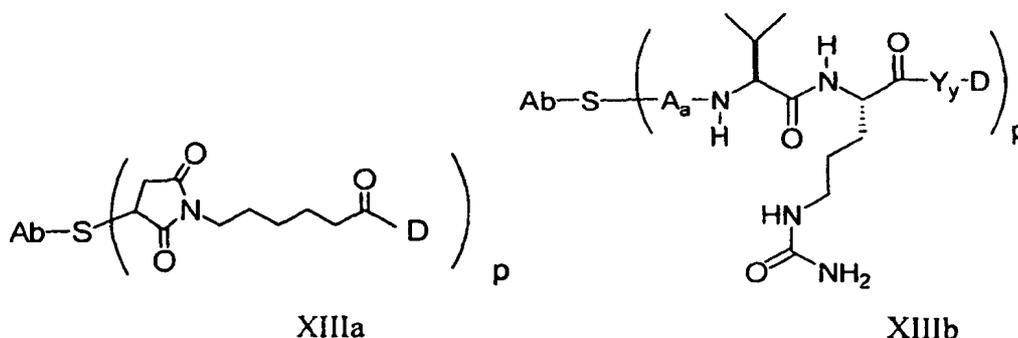
En otra realización, el enlazador L puede ser un enlazador de tipo dendrítico para la unión covalente de más de un resto farmacológico a través de un resto enlazador multifuncional, de ramificación, a un anticuerpo (Sun *et al* (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215; Sun *et al* (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768). Los enlazadores dendríticos pueden aumentar la proporción molar del fármaco con respecto al anticuerpo, es decir, la carga, que está relacionada con la potencia del ADC. Por lo tanto, cuando un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína porta solo un grupo tiol de cisteína reactivo, se puede unir una multitud de restos farmacológicos a través de un enlace dendrítico. Las realizaciones a modo de ejemplo de enlazadores dendríticos, ramificados, incluyen unidades de dendrímeros de 2,6-bis(hidroximetil)-*p*-cresol y 2,4,6-tris(hidroximetil)-fenol (WO 2004/01993; Szalai *et al* (2003) *J. Amer. Chem. Soc.* 125:15688-15689; Shamis *et al* (2004) *J. Amer. Chem. Soc.* 126:1726-1731; Amir *et al* (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 4494-4499).

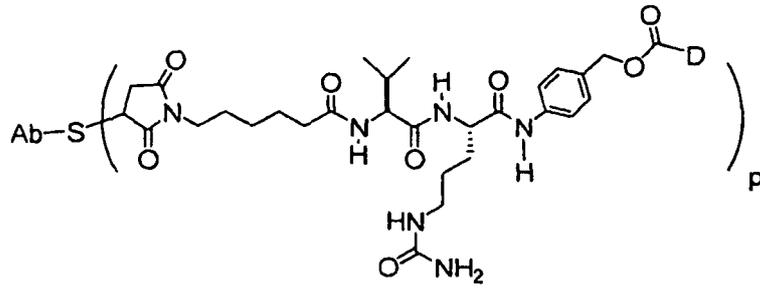
En una realización, la unidad espaciadora es un bis(hidroximetil)estireno (BHMS) ramificado, que se puede usar para incorporar y liberar múltiples fármacos, que tiene la estructura:



que comprende una unidad de dendrímero 2-(4-aminobenciliden)propano-1,3-diol (WO 2004/043493; de Groot *et al* (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 varía de 0 a 4; n es 0 o 1; y p varía de 1 a 4

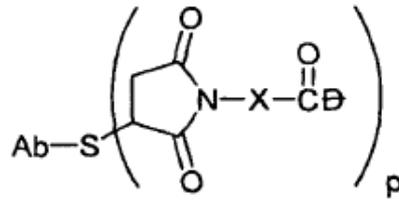
Las realizaciones a modo de ejemplo de compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco de Fórmula I incluyen XIIIa (MC), XIIIb (val-cit), XIIIc (MC-val-cit) y XIId (MC-val-cit-PAB):



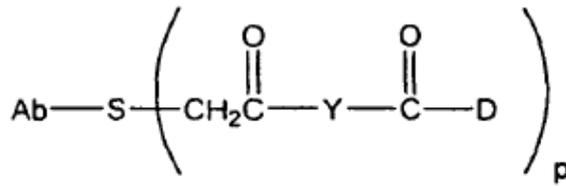


XIIIId

Otras realizaciones a modo de ejemplo de los compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco de Fórmula la incluyen XIVa-e:

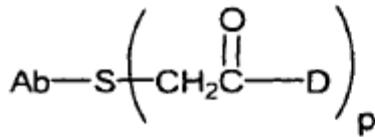


XIVa

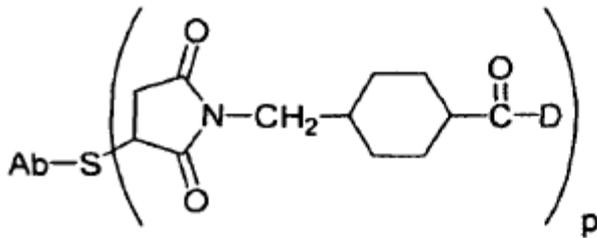


XIVb

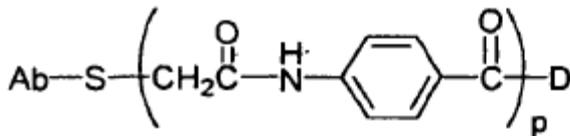
5



XIVc

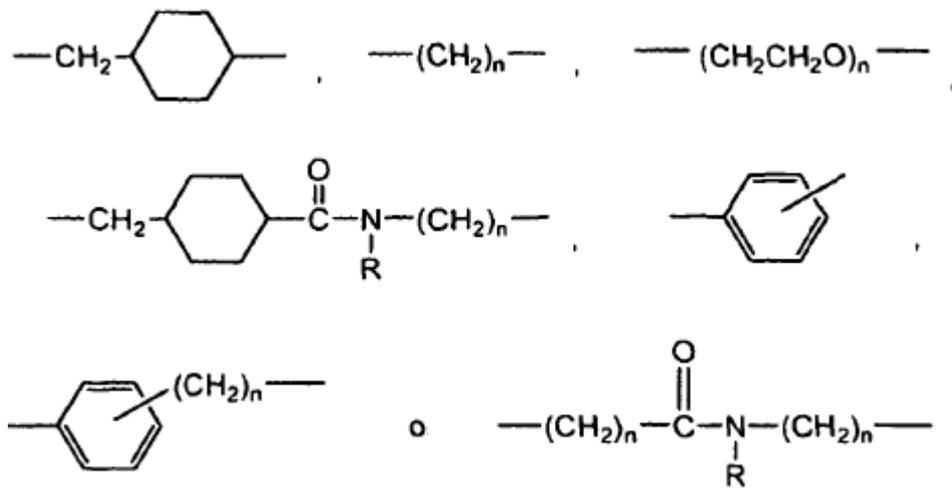


XIVd

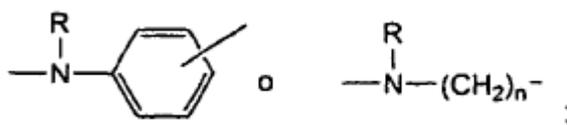


XIVe

donde X es:



Y es:



5 donde R es, de manera independiente, H o alquilo C₁-C₆; y n es 1 a 12.

10 En otra realización, un enlazador tiene un grupo funcional reactivo que tiene un grupo nucleófilo que es reactivo hacia un grupo electrófilo presente en un anticuerpo. Los grupos electrófilos útiles en un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, grupos carbonilo de aldehído y cetona. El heteroátomo de un grupo nucleófilo de un enlazador puede reaccionar con un grupo electrófilo en un anticuerpo y forma un enlace covalente a una unidad de anticuerpo. Los grupos nucleófilos útiles en un enlazador incluyen, pero sin limitación, hidrazina, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida. El grupo electrófilo en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión a un enlazador.

15 Por lo general, los enlazadores de tipo péptido se pueden preparar mediante la formación de un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (E. Schröder y K. Lübke (1965) "The Peptides", volumen 1, pág. 76-136, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los productos intermedios enlazadores se pueden ensamblar con cualquier combinación o secuencia de reacciones que incluyen unidades de espaciadores, de extensión y aminoácidos. Las unidades de espaciadores, de extensión y aminoácidos pueden emplear grupos funcionales reactivos que sean electrófilos, nucleófilos o radicales libres en la naturaleza. Los grupos funcionales reactivos incluyen, pero sin limitación, grupos carboxilo, hidroxilo, *para*-nitrofenilcarbonato, isotiocianato y salientes, tales como *O*-mesilo, *O*-tosilo, -Cl, -Br, -I o maleimida.

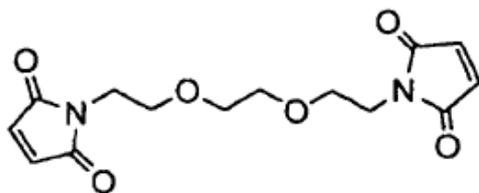
25 En otra realización, el enlazador se puede sustituir con grupos que con solubilidad modulada o reactividad. Por ejemplo, un sustituyente cargado, tal como sulfonato (-SO₃⁻) o amonio, puede aumentar la solubilidad en agua del reactivo y facilitar la reacción de acoplamiento del reactivo enlazador con el anticuerpo o el resto farmacológico, o facilitar la reacción de acoplamiento de Ab-L (producto intermedio de anticuerpo y enlazador) con D o D-L (producto intermedio de fármaco y enlazador) con Ab dependiendo de la ruta sintética empleada para preparar el ADC.

30 Reactivos enlazadores

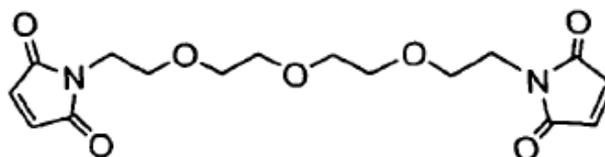
35 Se pueden preparar conjugados del anticuerpo y auristatina usando varios reactivos enlazadores bifuncionales tales como propionato de *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(*N*-maleimidometilo) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos 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).

40

Los conjugados de anticuerpo y fármaco también se pueden preparar con reactivos enlazadores: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) y que incluyen reactivos de bis-maleimida: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, (BM(PEO)₃) y (BM(PEO)₄) que se encuentran disponibles en el mercado en Pierce Biotechnology, Inc., P. O. Box 117, Rockford, IL. 61105, EE.UU. Los reactivos de bis-maleimida permiten la unión del grupo tiol a un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína a un resto farmacológico que contiene tiol, marcador o producto intermedio enlazador, de una manera secuencial o simultánea. Otros grupos funcionales además de maleimida, que son reactivos con un grupo tiol de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína, resto farmacológico, marcador o producto intermedio enlazador incluyen yodoacetamida, bromoacetamida, vinil-piridina, disulfuro, disulfuro de piridilo, isocianato e isotiocianato.



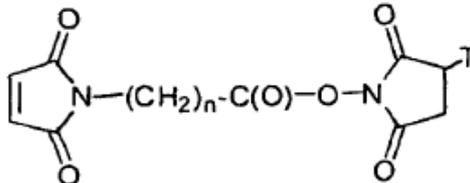
BM(PEO)₃



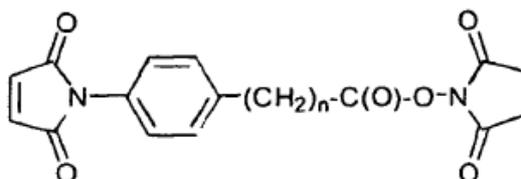
BM(PEO)₄

También se pueden obtener reactivos enlazadores útiles a través de otras fuentes comerciales tales como Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), o sintetizarse de acuerdo con procedimientos descritos en Toki *et al* (2002) *J. Org. Chem.* 67:1866-1872; Walker, M. A. (1995) *J. Org. Chem.* 60:5352-5355; Frisch *et al* (1996) *Bioconjugate Chem.* 7:180-186; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; y WO 04/032828.

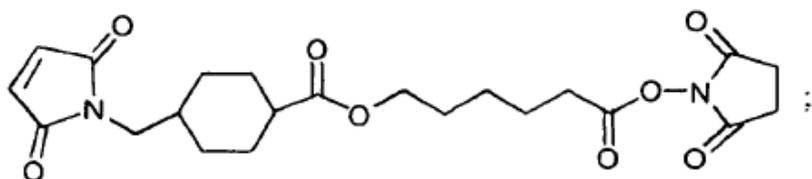
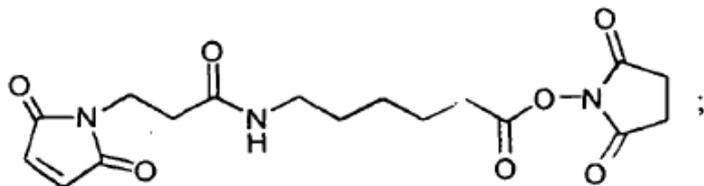
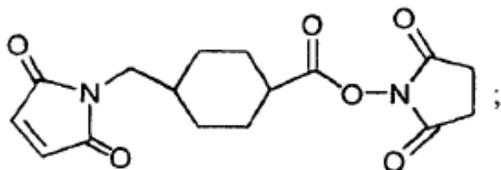
Los extensores de Fórmula (IIIa) se pueden introducir en un enlazador mediante la reacción de los siguientes reactivos enlazadores con el extremo N de una unidad de aminoácido:



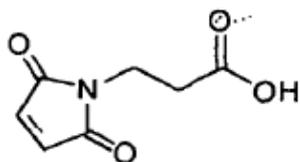
donde n es un número entero que varía de 1 a 10 y T es -H o -SO₃Na;



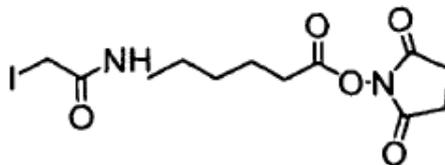
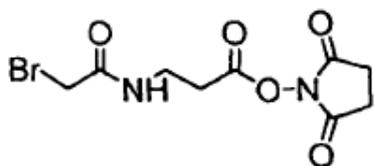
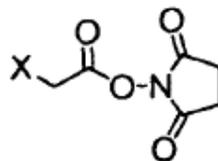
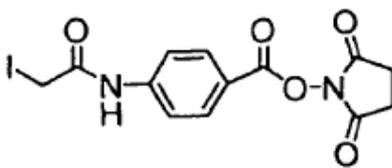
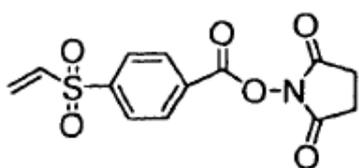
donde n es un número entero que varía de 0 a 3;



y

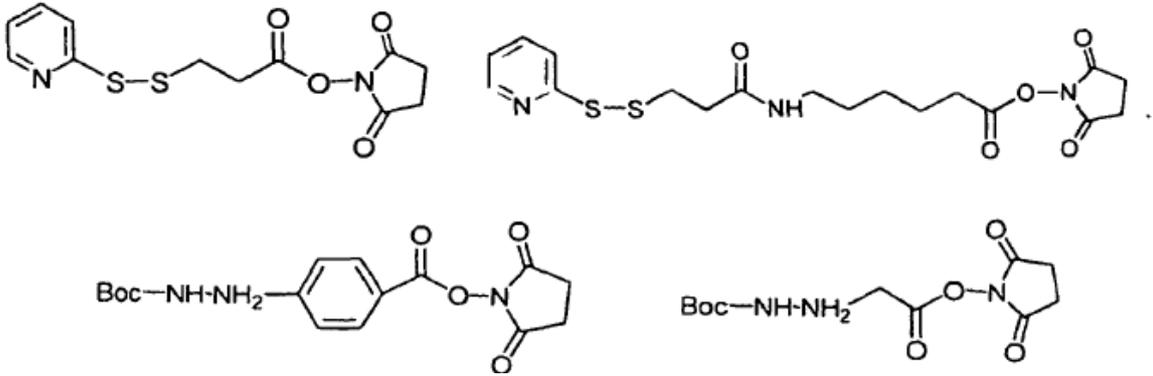


- 5 Las unidades de extensión se pueden introducir en un enlazador mediante la reacción de los siguientes reactivos bifuncionales con el extremo N de una unidad de aminoácido:

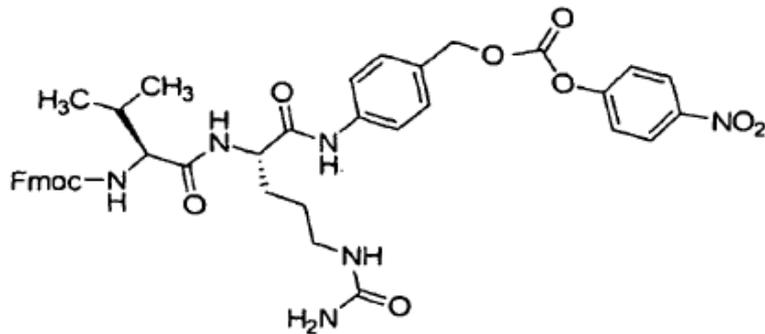


donde X es Br o I.

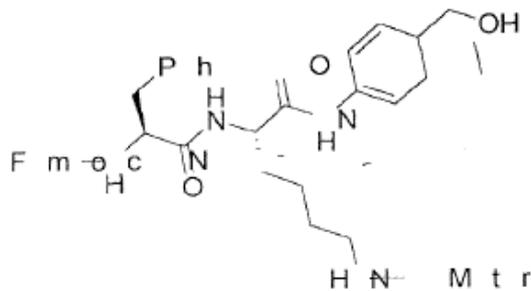
- 10 Las unidades de extensión de las fórmulas también se pueden introducir en un enlazador mediante la reacción de los siguientes reactivos funcionales con el extremo N de una unidad de aminoácido:



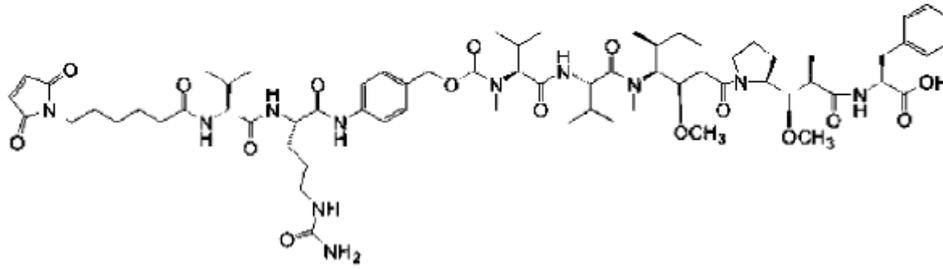
Un ejemplo de reactivo enlazador de dipéptido valina-citulina (val-cit o vc) que tiene un extensor de maleimida y un espaciador autoinmolativo de *para*-aminobencilcarbamoilo (PAB) tiene la estructura:



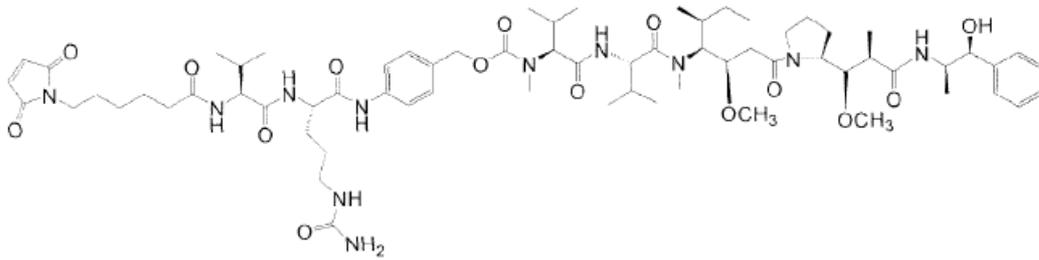
- 5 De acuerdo con Dubowchik, *et al.* (1997) *Tetrahedron Letters*, 38: 5257-60, se puede preparar un ejemplo de reactivo enlazador de dipéptido de phe-lys(Mtr, mono-4-metoxitritilo) que tiene una unidad de extensión de maleimida y una unidad espaciadora autoinmolativa de PAB, y tiene la estructura:



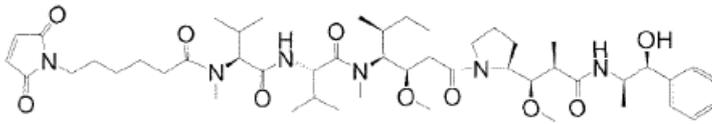
- 10 Los productos intermedios de fármaco y enlazador a modo de ejemplo 1



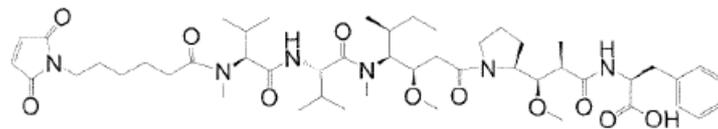
MC-val-cit-PAB



MC-val-cit-PAB-MMAE

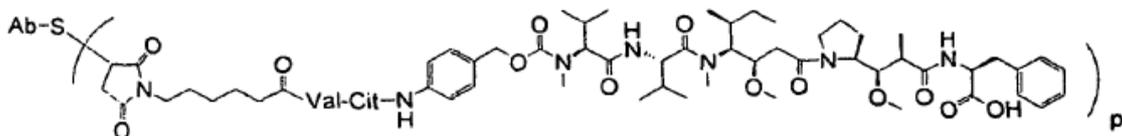


MC-MMAE

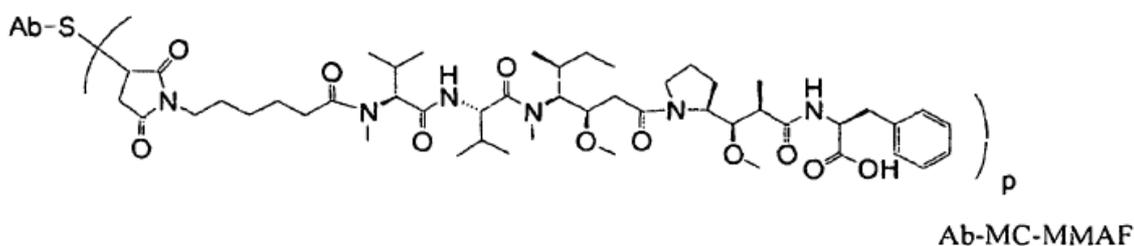
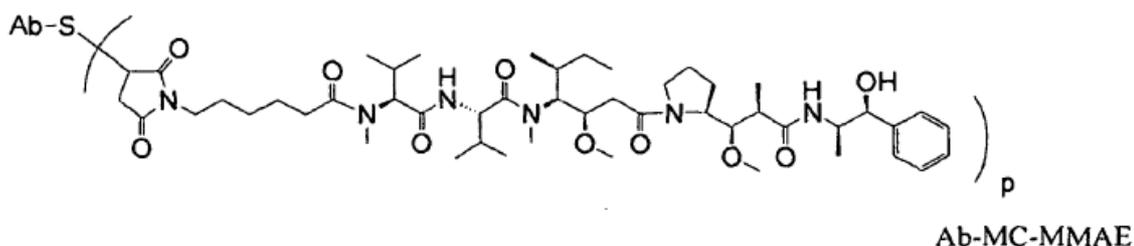
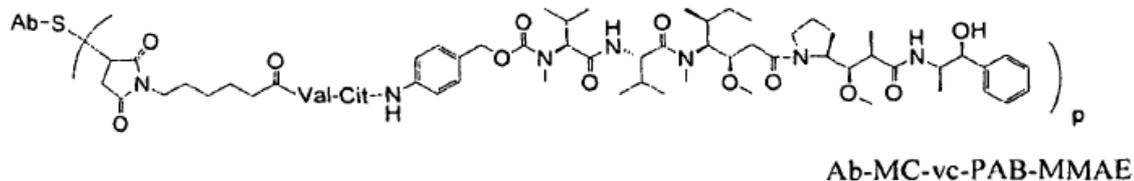


MC-MMAF

Los compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco a modo de ejemplo de la invención incluyen:



Ab-MC-vc-PAB-MMAF



donde Val es valina; Cit es citrulina; p es 1, 2, 3 o 4; y Ab es un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína.

5 Preparación de conjugados de anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína y fármacos

El ADC de Fórmula I se puede preparar mediante varias rutas que emplean reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo cisteína de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con un reactivo enlazador para formar un producto intermedio de anticuerpo y enlazador Ab-L, a través de un enlace covalente, seguida de la reacción con un resto farmacológico activado D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto farmacológico con un reactivo enlazador para formar un producto intermedio de fármaco y enlazador D-L, a través de un enlace covalente, seguida de la reacción con un grupo cisteína de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína. Los métodos de conjugación (1) y (2) se pueden emplear con varios anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína, restos farmacológicos y enlazadores para preparar los conjugados de anticuerpo y fármaco de Formula I.

Los grupos tioles de cisteína de anticuerpos son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en reactivos enlazadores y productos intermedios de fármaco y enlazador, incluyendo: (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) grupos aldehídos, cetonas, carboxilo y maleimida; y (iv) disulfuros, incluyendo disulfuros de piridilo, a través del intercambio de disulfuros. Los grupos nucleófilos de un resto farmacológico incluyen, pero sin limitación: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazina, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores.

Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (reactivo de Cleland, ditiotritol) o TCEP clorhidrato de (tris(2-carboxietil)fosfina; Getz *et al* (1999) *Anal. Biochem.* Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA), seguido de la reoxidación para volver a formar enlaces disulfuro intercatenarios e intracatenarios (Ejemplo 2). Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales modificados por ingeniería genética con cisteína de longitud completa (TioMab) expresados en células CHO se reducen con un exceso de aproximadamente 50 veces de TCEP durante 3 horas a 37 °C para reducir los enlaces disulfuro en aductos de cisteína que se pueden formar entre los restos de cisteína recién introducidos y la cisteína presente en el medio de cultivo. El TioMab reducido se diluye y se carga en una columna HiTrap S en acetato de sodio 10 mM, pH 5 y se eluye con PBS que contiene cloruro de sodio 0,3 M. Se reestablecieron los enlaces disulfuro entre los restos de cisteína presentes en el Mab parental con sulfato de cobre (CuSO₄) acuoso (200 nM) diluido a temperatura ambiente, durante una noche. Como alternativa, el ácido deshidroascórbico (DHAA) es un oxidante eficaz para restablecer los grupos disulfuro intercatenarios del anticuerpo

modificado por ingeniería genética con cisteína tras la escisión reductora de los aductos de cisteína. Se pueden usar otros oxidantes, es decir agentes oxidantes, y condiciones de oxidación, que son conocidas en la técnica. La oxidación con aire del ambiente también es eficaz. Esta etapa de reoxidación parcial suave forma enlaces disulfuro intracatenarios de manera eficaz con una fidelidad elevada y conserva los grupos tiol de los restos de cisteína recién introducidos. Se añadió un exceso de aproximadamente 3 veces de producto intermedio de fármaco y enlazador, por ejemplo, MC-vc-PAB-MMAE, con respecto al anticuerpo (un exceso de aproximadamente 1,5 veces con respecto a los restos de cisteína recién introducidos), se mezcló y se dejó reposar durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente para realizar la conjugación y formar el conjugado de anticuerpo anti-TENB2 TMEFF2 N° 19 y fármaco. Se filtró en gel la mezcla de conjugación, y se cargó y eluyó a través de una columna HiTrap S para eliminar el exceso de producto intermedio de fármaco y enlazador, y otras impurezas.

La Figura 6 muestra el proceso general para preparar un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína expresado a partir del cultivo celular para la conjugación. Cuando el medio del cultivo celular contiene cisteína, se pueden formar aductos de disulfuro entre el aminoácido de cisteína recién introducido y la cisteína del medio. Estos aductos de cisteína, representados como un círculo en el TioMab a modo de ejemplo (izquierda) de la Figura 6, se deben reducir para generar anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína reactivos para la conjugación. Los aductos de cisteína, presumiblemente junto con diversos enlaces disulfuro intercatenarios, se escinden de forma reductora, dando una forma reducida del anticuerpo con agentes reductores tales como TCEP. Los enlaces disulfuro intercatenarios entre los restos de cisteína emparejados se vuelven a formar en condiciones de oxidación parcial con sulfato de cobre, DHAA o la exposición a oxígeno ambiente. Los restos de cisteína recién introducidos, diseñados por ingeniería genética y emparejados permanecen disponibles para la reacción con reactivos enlazadores o productos intermedios de fármaco y enlazador para formar los conjugados de anticuerpo de la invención. Los TioMab expresados en líneas celulares de mamífero dan lugar a aductos de Cys conjugados externamente a una Cys diseñada por ingeniería genética a través de la formación de enlaces -S-S-. De ahí que los TioMab purificados se traten con los procedimientos de reducción y reoxidación según lo descrito en el Ejemplo 2 para producir TioMab reactivos. Estos TioMab se usan para conjugarse con fármacos citotóxicos que contienen maleimida, fluoróforos y otros marcadores.

El análisis de las reacciones de los conjugados de anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína y fármaco muestra una menor heterogeneidad con respecto a conjugados de anticuerpo y fármaco preparados mediante la reducción de enlaces disulfuro intercatenarios o intracatenarios seguida de la conjugación (ADC convencionales) con un producto intermedio de fármaco y enlazador reactivo con tiol.

Métodos de exploración

Otra realización más de la presente invención se dirige a un método para determinar la presencia de un polipéptido TENB2 en una muestra sospechosa de contener el polipéptido TENB2, en el que el método comprende exponer la muestra a un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, que se une al polipéptido TENB2 y determinar la unión del anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o del conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, con el polipéptido TENB2 en la muestra, en el que la presencia de dicha unión indica la presencia del polipéptido TENB2 en la muestra según lo expuesto en las reivindicaciones. Opcionalmente, la muestra puede contener células (que pueden ser células cancerosas) sospechosas de expresar el polipéptido TENB2. El anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o el conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, empleado en el método se puede marcar opcionalmente de forma detectable, unir a un soporte sólido, o similares.

También se describe un método para diagnosticar la presencia de un tumor en un mamífero, en el que el método comprende (a) poner en contacto una muestra de ensayo que comprende células de tejido obtenidas del mamífero con un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, que se une a un polipéptido TENB2; y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o el conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, y el polipéptido TENB2 en la muestra de ensayo, en el que la formación de un complejo indica la presencia de un tumor en el mamífero. Opcionalmente, el anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o el conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, está marcado de manera detectable, unido a un soporte sólido, o similar, y/o la muestra de ensayo de células de tejido se obtiene de un individuo sospechoso de tener un tumor canceroso.

Ensayos de proliferación celular *in vitro*

También se describe un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa un polipéptido TENB2, en el que el método comprende poner en contacto la célula con un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, con el polipéptido TENB2, provocando la inhibición del crecimiento de la célula que expresa el TENB2. La célula puede ser una célula cancerosa, y la unión del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína, o el conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, con el polipéptido TENB 2 provoca la muerte de la célula que expresa el polipéptido TENB2. En general, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) se mide mediante: la

exposición de células de mamífero que expresan polipéptido TENB2 al ADC en un medio de cultivo celular; el cultivo de las células durante un período de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 5 días; y la medición de la viabilidad celular. Las células de mamífero útiles para los ensayos de proliferación celular incluyen: (1) un xenoinjerto tumoral LuCaP77 que expresa el polipéptido TENB2; (2) una línea celular derivada de PC3 modificada por ingeniería genética para expresar de forma estable una porción del polipéptido TENB2 en su superficie celular (PC3/TENB2); y (3) una línea celular PC3 que no expresa el polipéptido TENB2 (PC3/neo). Los ensayos *in vitro* basados en células se usan para medir la viabilidad (proliferación), citotoxicidad e inducción de la apoptosis (activación de caspasas) del ADC de la invención.

10 Farmacocinética – eliminación y estabilidad en suero

Se analizó la disposición de los conjugados de anticuerpo anti-TENB2 y fármaco *in vivo* midiendo las concentraciones en suero de anticuerpo y de conjugado de fármaco tras una sola dosis en bolo intravenosa en ratas Sprague-Dawley. Se midieron las concentraciones de los conjugados de anticuerpo y fármaco que portaban al menos un fármaco citotóxico con un ELISA, usando anti-MMAE para la captura, y dominio extracelular (ECD) de TENB2 biotinilado y estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) para la detección. Se midieron las concentraciones totales de TMEFF2 N° 19 y TioTMEFF2 N° 19 en suero con un ELISA, usando ECD de TENB2 para la captura y HRP anti-Fc humano como anticuerpo secundario. Este ensayo midió cualquier anticuerpo anti-TENB2, con y sin MMAE conjugado. Los ensayos tenían límites inferiores de cuantificación de 16,4 ng/ml con una dilución mínima de 1:100. Se analizaron los datos de concentración en suero-tiempo de cada animal mediante un modelo de dos compartimentos con entrada de bolo IV, eliminación de primer orden y macro-constantes de velocidad (Modelo 8, WinNonlin Pro v. 5.0.1, Pharsight Corporation, Mountain View, CA). El buen ajuste global se basó en la estimación predicha, el error estándar para la predicción y el porcentaje del coeficiente de variación para los parámetros primarios y secundarios, así como el examen de los gráficos residuales entre los datos de concentración-tiempo observados y predichos. Los parámetros PK primarios individuales comprendían los interceptos en el punto temporal cero (A y B) asociados con las fases alfa y beta, respectivamente, y las microconstantes de velocidad (alfa y beta). Se usaron las siguientes opciones de modelización: las estimaciones iniciales se determinaron usando WinNonlin; las concentraciones fueron ponderadas por el recíproco de la concentración predicha al cuadrado ($1/y^2$); se usó el algoritmo de minimización de Nelder-Mead. Se publicaron los siguientes parámetros farmacocinéticos: AUC_{0-1NF} , CL , C_{max} , MRT , $t_{1/2a}$, $t_{1/2b}$, V_1 y V_{ss} .

En la Figura 15, se muestran los resultados de los análisis farmacocinéticos de 28 días en ratas. Las ratas recibieron 5 mg/kg de peso corporal de TMEFF2 N° 19 tio-VC-MMAE o 5 mg/kg de TMEFF2 N° 19-VC-MMAE. Se extrajo suero de las ratas a los 5 minutos, 1 hora, 6 horas, 24 horas, y 2, 3, 4, 8, 11, 15, 21 y 28 días de la dosificación. Se observó la linealidad cinética de la dosis de TMEFF2 N° 19 ch-VC-MMAE entre 0,5 y 5 mg/kg de dosis, por lo que los datos de la dosis de 5 mg/kg se han convertido aritméticamente para que reflejen los datos predichos a 5 mg/kg para compararlos con TMEFF2 N° 19 tio-VC-MMAE.

40 Toxicidad en roedores

Se evaluó la toxicidad de los conjugados de anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína y fármaco en modelos de toxicidad aguda en rata y mono cangrejero. La toxicidad del ADC se investigó mediante el tratamiento de las ratas hembra Sprague-Dawley y los monos cangrejeros con el ADC, y el posterior examen y análisis de los efectos en diversos órganos. Basándose en las observaciones brutas (pesos corporales), los parámetros patológicos clínicos (química sérica y hematología) y la histopatología, se puede observar, caracterizar y medir la toxicidad del ADC. Se encontró que a niveles de dosis equivalentes, no aparecieron efectos dependientes de la diana. Se observaron toxicidades independientes de la diana a una dosis que superó las dosis eficaces en modelos de tumores en animales.

50 MÉTODOS DE TRATAMIENTO

También se describe un método para tratar terapéuticamente un mamífero que tiene un tumor canceroso que comprende células que expresan un polipéptido TENB2, método que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína, o un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, que se une al polipéptido TENB2, produciéndose así el tratamiento terapéutico eficaz del tumor.

También se describe un método para tratar o prevenir un trastorno proliferativo celular asociado con la expresión o actividad alterada, preferentemente aumentada, de un polipéptido TENB2, método que comprende administrar a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo. Un trastorno proliferativo celular a modo de ejemplo es el cáncer. El tratamiento o la prevención eficaz del trastorno proliferativo celular puede ser un resultado de la muerte directa o la inhibición del crecimiento de las células que expresan un polipéptido TENB2 o del antagonismo de la actividad potenciadora del crecimiento celular de un polipéptido TENB2 con el anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo.

También se describe un método de unión de un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con

cisteína, o un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, a una célula que expresa un polipéptido TENB2, método que comprende poner en contacto una célula que expresa un polipéptido TENB2 con dicho anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, en condiciones que sean adecuadas para la unión del anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, a dicho polipéptido TENB2 y permitir la unión entre ambos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, está marcado con una molécula o un compuesto que es útil para la determinación cualitativa y/o cuantitativa de la ubicación y/o la cantidad de unión del anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, a la célula.

También se describe el uso de un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, en la preparación de un medicamento útil para (i) el tratamiento terapéutico o detección de diagnóstico de un cáncer o tumor, o (ii) el tratamiento terapéutico o la prevención de un trastorno proliferativo celular.

También se describe un método para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa, en el que el crecimiento de dicha célula cancerosa es al menos en parte dependiente del/de los efecto/s potenciador/es del crecimiento de un polipéptido TENB2, método que comprende poner en contacto el polipéptido TENB2 con un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, antagonizando así la actividad potenciadora del crecimiento del polipéptido TENB2 y, a su vez, inhibiendo el crecimiento de la célula cancerosa, mediante lo que se inhibe el crecimiento de la célula cancerosa.

También se describe un método para tratar terapéuticamente un tumor en un mamífero, en el que el crecimiento de dicho tumor es al menos en parte dependiente del/de los efecto/s potenciador/es del crecimiento de un polipéptido TENB2, método que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, que se une al polipéptido TENB2, antagonizando así la actividad potenciadora del crecimiento de dicho polipéptido TENB2 y resultando en el tratamiento terapéutico eficaz del tumor.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y conjugados de los mismos reconocen epítopos extracelulares de las proteínas TENB2 de la membrana plasmática que se liberan en el fluido extracelular.

Se describen además métodos para la detección, el seguimiento y el tratamiento de tumores malignos tales como cáncer de mama y cáncer de ovario usando los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y conjugados.

Los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) de la presente invención se pueden usar para tratar diversas enfermedades o trastornos, por ejemplo, los caracterizados por la sobreexpresión de un antígeno tumoral TENB2. Los ejemplos de afecciones o trastornos hiperproliferativos incluyen tumores benignos o malignos, incluyendo el cáncer de próstata.

Los compuestos de ADC que se identifican en los modelos animales y ensayos basados en células se pueden ensayar posteriormente en ensayos clínicos con primates superiores y seres humanos portadores de tumores. El ensayo clínico se puede diseñar para evaluar la eficacia de un ADC en combinaciones con pautas terapéuticas conocidas, tales como la radiación y/o quimioterapia que implica agentes quimioterapéuticos y/o agentes citotóxicos conocidos.

En general, la enfermedad o el trastorno por tratar es una enfermedad hiperproliferativa tal como el cáncer. Los ejemplos de cáncer por tratar en el presente documento incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Los ejemplos más concretos de dichos cánceres incluyen el cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de la glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un ADC dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y curso de la enfermedad, si la molécula se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico tratante. La molécula se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de la molécula es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Una dosis de ADC a modo de ejemplo para su

administración a un paciente se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso del paciente.

5 Para administraciones repetidas durante varios días o más tiempo, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una pauta de dosificación a modo de ejemplo comprende la administración de una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg de un anticuerpo anti-TENB2. Pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales, incluyendo la formación de imágenes por ultrasonidos.

10 Administración de conjugados anticuerpo y fármaco

Los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) de la invención se pueden administrar por cualquier vía apropiada para la afección por tratar. Normalmente, el ADC se administra por vía parenteral, es decir, infusión, subcutánea, 15 intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural.

Formulaciones farmacéuticas

20 Las formulaciones farmacéuticas de los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) terapéuticos de la invención, normalmente, se preparan para la administración parenteral, es decir, inyección en bolo, intravenosa, intratumoral con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable y en una forma inyectable estéril de dosificación unitaria. Un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) que tiene el grado de pureza deseado se mezcla opcionalmente con diluyentes, vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables ("Remington's Pharmaceutical Sciences" (1980) XVI edición, Osol, A. Ed.) en forma de una formulación liofilizada o una solución acuosa.

25 Los diluyentes, vehículos, excipientes y estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butilo o alcohol bencílico; alquilparabenos 30 tales como metil- o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y *m*-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos), proteínas tales como albúmina sérica, 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, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; 35 contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína y Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

40 Los principios activos farmacéuticos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en "Remington's Pharmaceutical Sciences", XVI edición, Osol, A. Ed. (1980).

45 Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el ADC, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol 50 vinílico)), polilactidas (US 3773919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, acetato de etilvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico.

55 Las formulaciones incluyen las adecuadas para las vías de administración anteriores. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Las técnicas y las formulaciones generalmente se encuentran en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Publishing Co., Easton, PA). Dichos métodos incluyen la etapa de asociar el principio activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el principio activo con vehículos líquidos o vehículos 60 sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

Las suspensiones acuosas de la invención contienen los materiales activos en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, croscarmelosa, povidona, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, 65 polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma de acacia, y agentes dispersantes o humectantes tales como un fosfátido de origen natural (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileo con un

ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitán). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes tales como etil- o n-propil-*p*-hidroxi-benzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina.

Las composiciones farmacéuticas de ADC pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando aquellos agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como una solución en 1,3-butano-diol o preparada como un polvo liofilizado. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se pueden emplear convencionalmente los aceites fijos, estériles, como medio disolvente o de suspensión. Con este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo suave incluyendo los mono- o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables, también se pueden usar ácidos grasos tales como el ácido oleico.

La cantidad de principio activo que se puede combinar con el material portador para producir una sola forma de dosificación variará dependiendo del huésped tratado y del modo particular de administración. Por ejemplo, una solución acuosa destinada a la infusión intravenosa puede contener de aproximadamente 3 a 500 µg de principio activo por mililitro de solución para poderse producir una infusión de un volumen adecuado a una velocidad de aproximadamente 30 ml/h.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas y no acuosas estériles de inyección que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

Aunque la administración oral de proteínas terapéuticas se ve desfavorecida por la hidrólisis o la desnaturalización en el intestino, las formulaciones de ADC adecuadas para la administración oral se pueden preparar como unidades diferenciadas tales como cápsulas, obleas o comprimidos, conteniendo cada una cantidad predeterminada del ADC.

Las formulaciones se pueden envasar en envases monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en condiciones de criodesecación (liofilización) que solo requieren la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, de agua, para inyección inmediatamente antes de su uso. A partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito previamente, se preparan soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas. Las formulaciones de dosificación unitarias preferidas son las que contienen una dosis diaria o una subdosis diaria unitaria, como se ha indicado anteriormente en el presente documento, o una fracción apropiada de la misma, del principio activo.

Las composiciones de la invención también se pueden formular como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para la administración de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al* (1985) *Proc. Natl. Acad. Science. EE.UU.* 82:3688; Hwang *et al* (1980) *Proc. Natl. Acad. Science. EE.UU.* 77:4030; US 4485045; US 4544545; US 5013556, WO 97/38731. Los liposomas se pueden generar mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se pueden extraer a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' de las composiciones de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas (Martin *et al* (1982) *J. Biol. Chem.* 257:286-288), a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente, hay un agente quimioterapéutico contenido dentro del liposoma (Gabizon *et al* (1989) *J. National Cancer Inst.* 81 (19): 1484.

Terapia de combinación

Un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) de la invención se puede combinar en una formulación de combinación farmacéutica, o pauta de dosificación como terapia de combinación, con un segundo compuesto que tenga propiedades contra el cáncer. El segundo compuesto de la formulación de combinación farmacéutica o pauta de dosificación tiene preferentemente actividades complementarias al ADC de la combinación, de manera que no afectan de manera adversa entre sí.

El segundo compuesto puede ser un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal y/o cardioprotector. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin buscado. Una composición farmacéutica que contiene una

ADC de la invención también puede tener una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico tal como un inhibidor de la formación de la tubulina, un inhibidor de la topoisomerasa, un intercalador de ADN o un enlazador de ADN.

- 5 Se pueden combinar otras pautas terapéuticas con la administración de un agente anticanceroso identificado de acuerdo con la presente invención. La terapia de combinación se puede administrar como una pauta simultánea o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, la combinación se puede administrar en dos o más administraciones. La administración combinada incluye la coadministración, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente existe un período de tiempo en que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

15 En una realización, el tratamiento con un ADC implica la administración combinada de un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, y uno o más agentes quimioterapéuticos, agentes biológicos terapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluyendo la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitación: taxanos (tales como paclitaxel y docetaxel); compuestos que contienen platino tales como carboplatino; inhibidores del EGFR tales como erlotinib y gefitinib; inhibidores de la tirosina quinasa tales como imatinib; y antibióticos de antraciclina (tales como doxirubicina o doxil). Los agentes biológicos terapéuticos para su uso en la combinación con un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, incluyen bevacizumab (Avastatin®) o pertuzumab (Omnitarg™, Genentech Inc). La preparación y las pautas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o según lo determinado empíricamente por el experto en la materia. La preparación y las pautas de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en "Chemotherapy Service", (1992) Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

30 El ADC se puede combinar con un compuesto anti-hormonal, por ejemplo, un compuesto anti-estrógeno como el tamoxifeno; un anti-progesterona tal como la onapristona (EP 616812); o un anti-andrógeno tal como flutamida, en dosis conocidas para dichas moléculas. Cuando el cáncer que se va a tratar es un cáncer independiente de las hormonas, el paciente puede haber sido sometido previamente a la terapia anti-hormonal y, tras volver el cáncer independiente de las hormonas, se pueden administrar el ADC (y opcionalmente otros agentes según lo descrito en el presente documento) al paciente. Puede ser beneficioso coadministrar también un cardioprotector (para prevenir o reducir la disfunción miocárdica asociada con la terapia) o una o más citoquinas al paciente. Además de las pautas terapéuticas anteriores, el paciente puede ser sometido a la extirpación quirúrgica de las células cancerosas y/o a radioterapia.

35 Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriores son las usadas actualmente y se pueden disminuir debido a la acción combinada (sinergia) de los agentes recién identificados y otros agentes o tratamientos quimioterapéuticos.

40 La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y demostrar que es "sinérgica", es decir, el efecto conseguido cuando se usan los principios activos juntos es superior a la suma de los efectos producidos como consecuencia de usar los compuestos por separado. Se puede conseguir un efecto sinérgico cuando los principios activos se: (1) coformulan y administran o liberan simultáneamente en una formulación de dosis unitaria combinada; 45 (2) administran mediante formulaciones separadas alternadas o en paralelo; o (3) mediante alguna otra pauta. Cuando se administran en una terapia alternada, el efecto sinérgico se puede conseguir cuando los compuestos se administran o liberan secuencialmente, por ejemplo, mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia alternada, se administra secuencialmente una dosis eficaz de cada principio activo, es decir, en serie, mientras que en la terapia de combinación, se administran juntas dosis eficaces de dos o más principios activos.

Metabolitos de los conjugados anticuerpo y fármaco

55 También se describen productos metabólicos *in vivo* de los compuestos de ADC descritos en el presente documento, en la medida en que dichos productos sean nuevos y no evidentes frente a la técnica anterior. Dichos productos pueden resultar, por ejemplo, de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, esterificación, escisión enzimática, y similares, del compuesto administrado. Por consiguiente, se describen compuestos nuevos y no evidentes producidos por un proceso que comprende poner en contacto un compuesto de la presente invención con un mamífero durante un período de tiempo suficiente para producir un producto metabólico del mismo.

60 Por lo general, los productos metabólicos se identifican mediante la preparación de un ADC radiomarcado (por ejemplo, ¹⁴C o ³H), al administrarlo por vía parenteral en una dosis detectable (por ejemplo, superior a aproximadamente 0,5 mg/kg) a un animal tal como rata, ratón, cobaya, mono o ser humano, dejando suficiente tiempo para que se produzca el metabolismo (normalmente, de 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 mediante el uso de anticuerpos capaces de unirse a epítopos

que sobreviven en el metabolito). Las estructuras de los metabolitos se determinan de manera convencional, por ejemplo, EM, EMCL o análisis de RMN. En general, el análisis de metabolitos se hace de la misma manera que los estudios del metabolismo de fármacos convencionales bien conocidos por los expertos en la materia. Los productos de la conversión, siempre que no se encuentren de otra forma *in vivo*, son útiles en ensayos de diagnóstico para la dosificación terapéutica de los compuestos de ADC de la invención.

ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación, o "kit", que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente según lo expuesto en las reivindicaciones. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. El prospecto puede referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos y que contendrán información sobre las indicaciones, el uso, la dosis, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, envase blíster, etc. Los recipientes pueden estar formados de varios materiales tales como vidrio o plástico.

En una realización, el artículo de fabricación comprende un recipiente y una formulación de un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína, o un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, contenido en el recipiente. El artículo puede comprender además opcionalmente una etiqueta pegada al recipiente, o un prospecto incluido en el recipiente, que se refiera al uso de la composición en cuestión para el tratamiento terapéutico o la detección de diagnóstico de un tumor. El recipiente que contiene la formulación es eficaz para almacenar y administrar el agente terapéutico y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o vial de solución intravenosa que tenga un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta o el prospecto indican que la formulación se usa para el tratamiento de la afección seleccionada, tal como el cáncer. Como alternativa o además, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir también otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente a efectos ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ningún modo.

35 Ejemplos

Los reactivos disponibles en el mercado a los que se hace referencia en los ejemplos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario. El origen de estas células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de la memoria descriptiva, mediante números de acceso ATCC, es la colección de cultivo tipo de EE.UU., Manassas, VA.

Ejemplo 1 Preparación de anticuerpos anti-TMEFF2 N° 19

Los anticuerpos TMEFF2 N° 19 humanizados se prepararon de acuerdo con el documento PCT/US03/07209. La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (SEC ID N°: 1) y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (SEC ID N°: 2).

Ejemplo 2 Preparación de anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína para conjugación por reducción y reoxidación

Los anticuerpos monoclonales anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína, de longitud completa, (TioMab) se expresaron en células CHO que portaban aductos de cisteína (cisteínas) en las cisteínas diseñadas por ingeniería genética debido a las condiciones de cultivo celular. Para liberar los grupos tiol reactivos de las cisteínas modificadas por ingeniería genética, se disolvieron los TioMab en borato sódico 500 mM y cloruro sódico 500 mM a pH de aproximadamente 8,0 y se redujeron con un exceso de aproximadamente 50-100 veces de TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina; Getz *et al* (1999) *Anal. Biochem.* Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) 1 mM durante aproximadamente 1-2 horas a 37 °C. Se diluye el TioMab reducido (Figura 6) y se carga en una columna HiTrap S en acetato sódico 10 nM, pH 5, y se eluye con PBS que contenía cloruro sódico 0,3 M. Se trata el TioMab reducido y eluido con ácido deshidroascórbico (dhAA) 2 mM a pH 7 durante 3 horas, o sulfato de cobre acuoso 2 mM (CuSO₄) a temperatura ambiente durante una noche. También puede ser eficaz la oxidación con aire ambiental. Se intercambia el tampón mediante elución sobre resina Sephadex G25 y se eluye con PBS con DTPA 1 mM. Se estima el valor de tiol/Ab mediante la determinación de la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol mediante la reacción con DTNB (Aldrich, Milwattkee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm

Ejemplo 3 Conjugación de anticuerpos anti-TENB2 modificados por ingeniería genética con cisteína y productos

intermedios de fármaco y enlazador

Después de los procedimientos de reducción y reoxidación del Ejemplo 2, se disuelve el anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína en tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se enfría en hielo. Se disuelven en DMSO aproximadamente 1,5 equivalentes molares en relación con las cisteínas diseñadas por anticuerpo de un producto intermedio de fármaco y enlazador de auristatina, tal como MC-MMAE (maleimidocaproilmonometil-auristatina E), MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE o MC-val-cit-PAB-MMAF, con un grupo funcional reactivo de tiol tal como maleimido, se diluyen en acetonitrilo y agua, y se añaden al anticuerpo reoxidado, reducido y enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimido para inactivar la reacción y bloquear cualquier grupo tiol de anticuerpo sin reaccionar. Se concentra la mezcla de reacción mediante ultrafiltración centrífuga y se purifica el conjugado de anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína y fármaco, y se desala mediante elución a través de resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 µm en condiciones estériles, y se congela para su almacenamiento.

Mediante el procedimiento anterior, se prepararon los siguientes conjugados de anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína y fármaco:

TMEFF2 N° 19 tio hu -MC-MMAF por conjugación de A114C (Kabat) TMEFF2 N° 19 tio hu y MC-MMAF; y TMEFF2 N° 19 tio hu-MC-val-cit-PAB-MMAE por conjugación de A114C (Kabat) TMEFF2 N° 19 tio hu y MC-val-cit-PAB-MMAE.

Ejemplo 4 Materiales y métodos para IHC, estudios de interiorización, FACS, ensayos de destrucción celular, transferencias Western, estudios de xenoinjertos, estudios farmacocinéticos y evaluaciones de seguridad.

Los anticuerpos y las proteínas recombinantes: PR1 de Mab anti-tenb2 humanizado se obtuvo de PDL. PR1 anti-tenB2 TioMab (HC-A121C; numeración secuencial) y la proteína Flag tenB2ECD se produjeron como se ha explicado anteriormente.

Líneas celulares y xenoinjertos de tumores humanos: PC3 es una línea celular de carcinoma de próstata humano (ATCC). La línea celular estable en medio PC3TenB2 fue generada por Genentech. Los modelos de explantes de próstata humana, LuCap70, 77 y 96.1 se obtuvieron en la Universidad de Washington.

ARN y proteínas de expresión: el análisis de expresión de ARN, los procedimientos inmunológicos (IHC, Western), la unión de anticuerpos (FACS) y la interiorización siguieron los métodos publicados anteriormente (*Cancer Research* 64, 781-788 (2004)).

Preparación de complejo de anticuerpo y fármaco (ADC) de anti-TenB2 convencional o ThioMab-valina-citrulina(vc)-Monometilauristatina E (MMAE) y MC-MMA: La conjugación de Mab convencional, tio-mab y de control con vc-MMAE, MC-MMAF se realizó como se ha descrito anteriormente.

Estudios de destrucción celular *in vitro* e *in vivo*: el ensayo de destrucción celular se llevó a cabo como se describe en *Cancer research* 64, 781-788 (2004). Cada línea celular tumoral del modelo de explantes de próstata se mantuvo mediante el trasplante en serie en ratones SCID macho de color beis castrados (modelo independiente de los andrógenos, LuCap70) o no castrados (modelo dependiente de los andrógenos, LuCAP77 y LuCAP96.1) del laboratorio Charles River. Los tumores se midieron de una a dos veces por semana en el transcurso del estudio.

Modelos para la evaluación de la seguridad en ratas y monos cangrejeros: los Mab anti-TENB2 reconocieron específicamente la diana de TENB2 humano, de mono y de rata (dominio I de FS).

Estudio farmacocinético: se usaron el protocolo y los métodos de ensayo convencionales.

Los datos demuestran que el TenB2 humano (TMEFF2) se restringe generalmente a la expresión en la próstata y el SNC, con niveles significativamente elevados en la próstata cancerosa. También se demostró que los anticuerpos anti-TENB2 se interiorizaron rápidamente. Se observó que estos anticuerpos, cuando se conjugaron a MMAE y MMAF destruyen las células tumorales de próstata *in vitro* e *in vivo* en diversos ensayos destrucción celular. Además, las dosis eficaces de ADC de TENB2 fueron significativamente inferiores a las requeridas para provocar efectos tóxicos en roedores y primates.

La memoria descriptiva redactada en lo que precede se considera suficiente para permitir a un experto en la materia poner en práctica la invención. La presente invención no está limitada en su alcance por la construcción depositada, ya que la realización depositada pretende ser una mera ilustración de ciertos aspectos de la invención, estando dentro del alcance de la presente invención cualquier construcción que sea funcionalmente equivalente según lo expuesto en las reivindicaciones. El material depositado en el presente documento no constituye ninguna admisión de que la descripción redactada contenida en el presente documento sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni se ha de interpretar como una limitación del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa. De hecho, varias modificaciones,

de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

- 5
- <110> GENENTECH, INC.
MAO, WEIGUANG
JUNUTULA, JAGATH REDDY
POLAKIS, PAUL
- 10
- <120> ANTICUERPOS ANTI-TENB2 MODIFICADOS POR INGENIERÍA GENÉTICA CON CISTEÍNA, Y
CONJUGADOS DE ANTICUERPO Y FÁRMACO
- <130> GNE-0311PCT
- 15
- <140> Todavía sin asignar
<141> Junto con la presente
- 20
- <150> 60/981.411
<151> 19-10-2007
- <160> 27
- <170> Patent In versión 3.5
- 25
- <210> 1
<211> 469
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 30
- <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético
- <400> 1

ES 2 450 755 T3

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
 1 5 10 15

Val Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile
 35 40 45

Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
 50 55 60

Leu Glu Trp Met Gly Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Asn
 65 70 75 80

Pro Ser Leu Lys Asn Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn
 85 90 95

Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Asp Tyr Ser Met Asp Tyr

ES 2 450 755 T3

	115		120		125														
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly				
	130					135					140								
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly				
	145				150					155					160				
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val				
				165					170					175					
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe				
			180					185					190						
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val				
		195					200					205							
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val				
	210					215					220								
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys				
	225				230					235					240				
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu				
				245					250					255					
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr				
			260					265					270						
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val				
	275						280					285							
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val				
	290					295					300								
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser				
	305				310					315					320				
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu				
				325					330					335					
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala				
			340					345					350						
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro				
	355						360					365							

ES 2 450 755 T3

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
 465

<210>2
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 2

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser
 35 40 45

Gln Asn Val Val Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

5

10

ES 2 450 755 T3

				85					90					95			
Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln		
			100					105					110				
Tyr	Ser	Ser	Tyr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile		
		115					120					125					
Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp		
	130					135					140						
Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn		
145					150					155					160		
Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu		
				165					170					175			
Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp		
			180					185					190				
Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr		
		195					200					205					
Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser		
	210					215					220						
Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
225					230					235							

<210>3
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 3

Met	Ala	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Val	Thr	Phe	Pro	Ser	Cys
1				5					10					15	
Val	Leu	Ser	Asp	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys
			20					25					30		
Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile
		35					40					45			

ES 2 450 755 T3

Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
 50 55 60

Leu Glu Trp Met Gly Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Asn
 65 70 75 80

Pro Ser Leu Lys Asn Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn
 85 90 95

Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Asp Tyr Ser Met Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

ES 2 450 755 T3

290		295		300
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser				
305		310		315
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu				
		325		330
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala				
		340		345
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro				
		355		360
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln				
		370		375
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala				
		385		390
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr				
		405		410
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu				
		420		425
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser				
		435		440
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser				
		450		455
Leu Ser Pro Gly Lys				
465				

<210> 4
 <211> 214
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 4
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

ES 2 450 755 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 5
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 5

5

10

ES 2 450 755 T3

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 Ala Ser Gln Asn Val Val Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg His Thr 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 Ser Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210>6

<211> 450

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 450 755 T3

<400> 6

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 Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

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

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

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

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

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

 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

ES 2 450 755 T3

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210>7
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 450 755 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400>7

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asn Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Asp Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

ES 2 450 755 T3

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

ES 2 450 755 T3

<210>8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 8
 Asp Val Gln Leu Cys Glu Ser Gly Pro Gly
 1 5 10
 10
 <210>9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 9
 Leu Ser Leu Thr Cys Cys Val Ser Gly Tyr Ser
 1 5 10
 20
 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 10
 Leu Ser Ser Val Thr Cys Ala Asp Thr Ala Val
 1 5 10
 30
 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 11
 Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys
 1 5 10
 40
 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético
 <400> 12
 Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro
 1 5 10
 50

ES 2 450 755 T3

5
<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 13

10
Val Ser Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val
1 5 10

15
<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

20
<400> 14

Trp Tyr Val Asp Gly Cys Glu Val His Asn Ala
1 5 10

25
<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30
<400> 15

Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu
1 5 10

35
<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 16

Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe
1 5 10

45
<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 17

Ser Leu Ser Ala Ser Cys Gly Asp Arg Val Thr
1 5 10

55

ES 2 450 755 T3

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 18
 Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val
 1 5 10
 10
 <210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 19
 Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro
 1 5 10
 20
 <210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 20
 Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys
 1 5 10
 30
 <210>21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 21
 Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val
 1 5 10
 40
 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 22

ES 2 450 755 T3

Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr
1 5 10

5 <210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

10 <400> 23

Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10

15 <210> 24
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Synthetic 6x His tag

<400> 24

His His His His His His
1 5

25 <210> 25
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 25

His His His His His His His His
1 5

35 <210> 26
 <211>9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 26

Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

45 <210> 27
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 27

ES 2 450 755 T3

Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Ala Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg
1 5 10 15

Phe Arg Gly Lys Asp Leu Pro Val Leu
20 25

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína que comprende uno o más aminoácidos de cisteína libres, anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende:

**MAVLGLLLCLVTFPSCVLSSDVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYS
ITSGYYWSWIRQPPGKGLEWMGFISYDGSNKYNPSLKNRITISRDTSKNQF
SLKLSSVTAADTAVYYCARGLRRGDYSMDYWGQGLVTVSSCSTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPP
CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N° 3)**

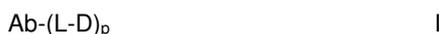
y una secuencia de cadena ligera que comprende:

**MDFQVQIFSLLISASVIMSRGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS
QNVVTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRHTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTSS
LQPEDFATYYCQQYSSYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC (SEC ID N° 2)**

2. El anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína de acuerdo con la reivindicación 1, que es producido en bacterias o células CHO.

3. El anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo está unido covalentemente a un resto farmacológico de auristatina mediante lo que se forma un conjugado de anticuerpo y fármaco.

4. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 3 que comprende un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína (Ab) y un resto farmacológico de auristatina (D), en el que el anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína está unido a través de uno o más aminoácidos de cisteína libres mediante un resto enlazador (L) a D; teniendo el compuesto la Fórmula I:



donde p es 1, 3, 4 o preferentemente 2.

5. El compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 4, en el que L tiene la fórmula:



donde:

A es unidad de extensión unida covalentemente a un tiol de cisteína del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína (Ab);

a es 0 o 1;

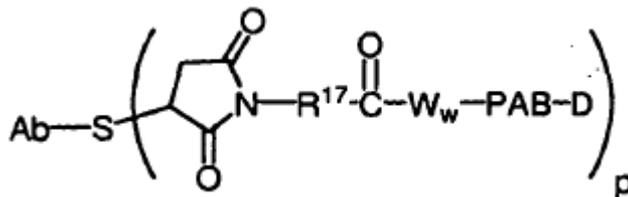
cada W es, de manera independiente, una unidad de aminoácido;

w es un número entero que varía de 0 a 12;

Y es una unidad espaciadora unida covalentemente al resto farmacológico; e

y es 0, 1 o 2.

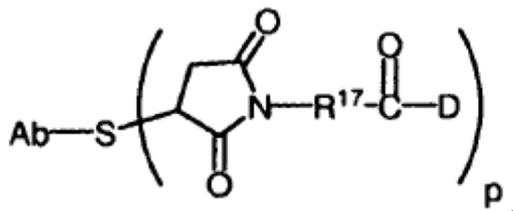
6. El compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 5 que tiene la fórmula:



5 donde PAB es *para*-aminobencilcarbamoilo, y R¹⁷ es un radical divalente seleccionado de entre (CH₂)_r, carbociclilo C₃-C₈, O-(CH₂)_r, arileno, (CH₂)_r-arileno, -arilen-(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, de manera independiente, un número entero que varía de 1 a 10.

7. El compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 5, en el que W_w es valina-citrulina.

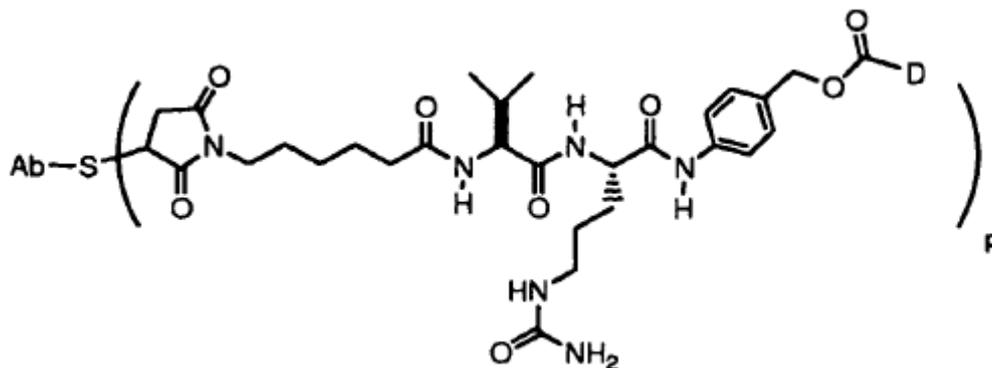
8. El compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 5 que tiene la fórmula:



15

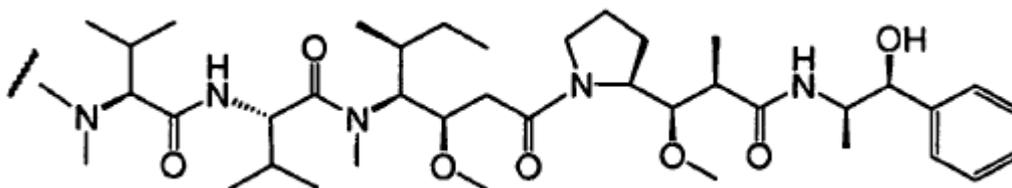
9. El compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 6 u 8, en el que R¹⁷ es (CH₂)₅ o (CH₂)₂.

20 10. El compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 5 que tiene la fórmula:

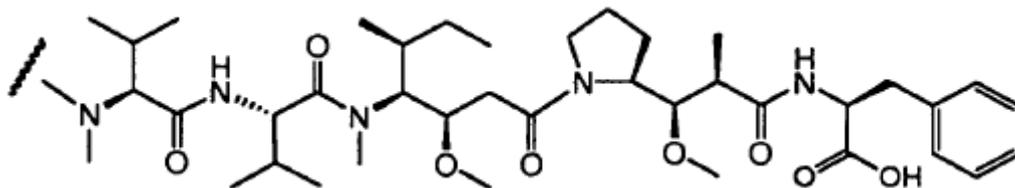


11. El compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 4, en el que L es SMCC o BMPEO.

25 12. El compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 4, en el que D es bien MMAE, que preferentemente tiene la estructura:

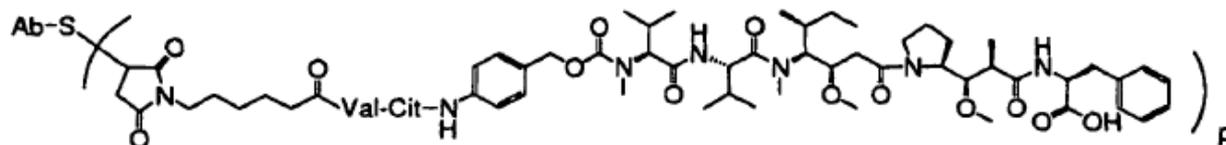


donde la línea ondulada indica el sitio de unión al enlazador L; o MMAF, que preferentemente tiene la estructura:

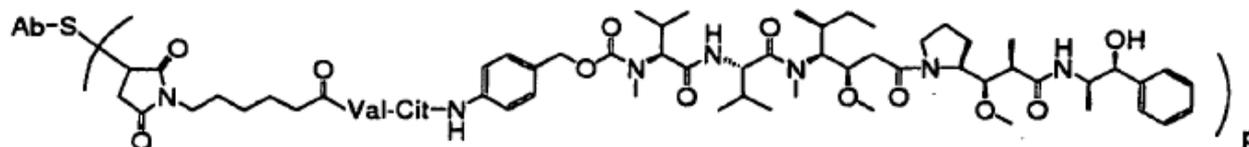


donde la línea ondulada indica el sitio de unión al enlazador L.

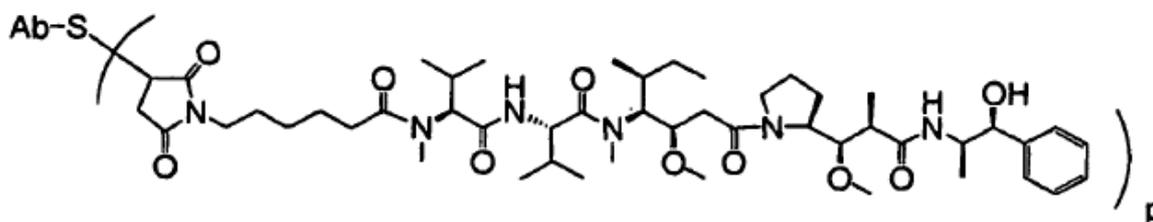
13. El anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína de la reivindicación 1 o 2, o el
 5 compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12, en donde el anticuerpo anti-TENB2 parental está seleccionado de entre un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano y un anticuerpo humanizado.
14. El anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína de las reivindicación 1 o 2, o el
 10 compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12, en el que el anticuerpo anti-TENB2 parental es un fragmento de anticuerpo, preferentemente un fragmento Fab.
15. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 3, en el que L es MC-val-cit-PAB o MC, SMCC, SPP o
 15 BMPEO.
16. Un compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco seleccionado de entre las estructuras:



Ab-MC-vc-PAB-MMAF

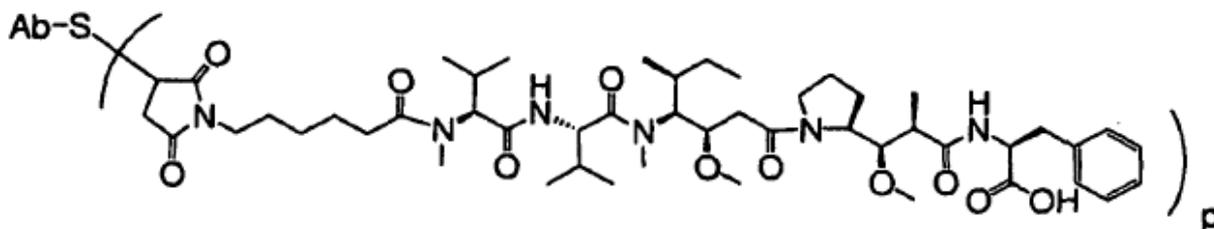


Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE

y



Ab-MC-MMAF

en las que Val es valina; Cit es citrulina; p es 1, 2, 3 o 4; y Ab es un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína de la reivindicación 1.

- 5 17. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína de la reivindicación 1 o el conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 3, y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptables.
- 10 18. La formulación farmacéutica que comprende un conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico seleccionado de entre letrozol, oxaliplatino, doxetaxel, 5-FU, lapatinib, capecitabina, leucovorina, erlotinib, pertuzumab, bevacizumab y gemcitabina.
- 15 19. Un artículo de fabricación que comprende la formulación farmacéutica que comprende un conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 17;
- 20 un recipiente y un prospecto o etiqueta que indica que el compuesto se puede usar para el tratamiento de cáncer **caracterizado por** la sobreexpresión de un polipéptido TENB2, en el que el cáncer está seleccionado preferentemente de entre cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de tracto urinario, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama o cáncer de colon.
- 25 20. Un método de determinación de la presencia de una proteína TENB2 en una muestra sospechosa de contener dicha proteína, comprendiendo dicho método la exposición de dicha muestra a un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína de la reivindicación 1 y la determinación de la unión de dicho anticuerpo a dicha proteína TENB2 en dicha muestra, en el que la unión del anticuerpo a dicha proteína indica la presencia de dicha proteína en dicha muestra.
- 30 21. El método de la reivindicación 20, en el que el anticuerpo es unido covalentemente a un marcador seleccionado de entre un colorante fluorescente, un radioisótopo, biotina o un ligando de complejación de metales; o en el que dicha muestra comprende una célula sospechosa de expresar dicha proteína TENB2; o en el que dicha célula es una célula de cáncer de próstata, ovario, mama, pulmón o páncreas.
- 35 22. Un ensayo para la detección de células cancerosas que comprende:
- (a) exponer las células a un compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 3; y
- (b) determinar el grado de unión del compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco a las células;
- 40 en el que preferentemente las células son células tumorales de próstata, páncreas, pulmón, mama, colon u ovario.
23. Un método de inhibición de la proliferación celular que comprende tratar células tumorales de mamífero en un medio de cultivo celular con un compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 3, mediante el que se inhibe la proliferación de las células tumorales, en el que las células tumorales de mamífero son preferentemente células tumorales de ovario.
- 45 24. La formulación farmacéutica de la reivindicación 17 para su uso en un método de tratamiento del cáncer, comprendiendo el método la administración de la formulación farmacéutica al paciente, en el que preferentemente el cáncer está seleccionado del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer del tracto urinario, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de ovario.
- 50 25. La formulación farmacéutica de la reivindicación 24 para su uso de acuerdo con la reivindicación 24, en la que el método comprende la administración de un agente quimioterapéutico al paciente en combinación con el compuesto

conjugado de anticuerpo y fármaco, donde el agente quimioterapéutico está seleccionado de entre letrozol, cisplatino, carboplatino, taxol, paclitaxel, oxaliplatino, doxetaxel, 5-FU, leucovorina, erlotinib, pertuzumab, bevacizumab, lapatinib y gemcitabina.

- 5 26. Un método para preparar un compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco que comprende un anticuerpo anti-TENB2 modificado por ingeniería genética con cisteína (Ab) de la reivindicación 1 y un resto farmacológico de auristatina (D), en el que el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína está unido a través de uno o más aminoácidos de cisteína diseñados por ingeniería genética mediante un resto enlazador (L) a D; compuesto que

10 tiene la Fórmula I:



donde p es 1, 3, 4; comprendiendo método las etapas de:

- 15 (a) hacer reaccionar el grupo cisteína diseñado por ingeniería genética del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con un reactivo enlazador para formar un producto intermedio de anticuerpo y enlazador Ab-L; y
 (b) hacer reaccionar el Ab-L con un resto farmacológico activado D; mediante lo que se forma el conjugado de anticuerpo y fármaco;

20 o que comprende las etapas de:

- (c) hacer reaccionar un grupo nucleófilo de un resto farmacológico con un reactivo enlazador para formar un producto intermedio de fármaco y enlazador D-L; y
 25 (d) hacer reaccionar D-L con un grupo cisteína diseñado por ingeniería genética del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína; mediante lo que se forma el conjugado de anticuerpo y fármaco;

en el que el método comprende opcionalmente la etapa de expresar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína en células de ovario de hámster chino (CHO).

- 30 27. El método de la reivindicación 26 que comprende además la etapa de tratar con un agente reductor el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína expresado, en el que el agente reductor está seleccionado preferentemente de entre TCEP y DTT.

- 35 28. El método de la reivindicación 27 que comprende además la etapa de tratar con un agente de oxidación el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína expresado, tras el tratamiento con el agente reductor, en el que el agente de oxidación está seleccionado preferentemente de entre sulfato de cobre, ácido deshidroascórbico y aire.

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del Ac anti-TENB2 TMEFF2 N° 19 humano (Pr1)
(el péptido señal está subrayado)

MAVLGLLCLVTFPSCVLSDVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSGYYWSWIRQPPGKGLEWMGFIS
 YDGSNKYNPSLKNRITISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGLRGRDYSMDYWGQGTLVTVSSASTKG
 PSVEPLAPSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
 TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHKCTCPPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 1

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del Ac anti-TENB2 TMEFF2 N° 19 humano (Pr1)
(el péptido señal está subrayado)

MDFQVQIFSFLLISASVIMSRGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVVTAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASNRHT
 GVPSRFSGGSGTDFLTITSSLPQEDFATYYCQQYSSYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
 LLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG

SEC ID N° 2

EC

Figura 1

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de TMEFF2 N° 19 tio hu A121C (Pr1)
(el péptido señal está subrayado)

MAVLGLLLCLVTFPSCVLSDVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSGYYWSWIRQPPGKGLEWMGFI
 SYDGSNKYNPSLKNRITISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYCARGLRRGDYMDYWGQGLLVTVSSCST
 KGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFFAVLQSSGLYSLSVVTVPSS
 SLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTIŞKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 3

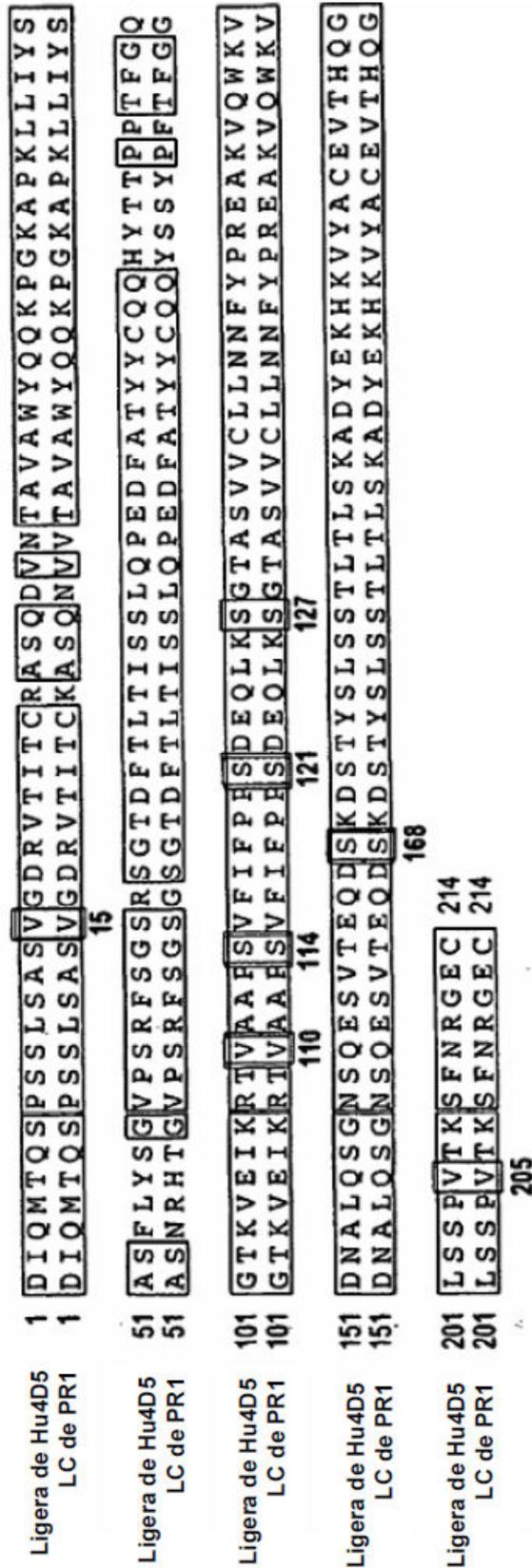
Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de TMEFF2 N° 19 tio hu A121C (Pr1)
(el péptido señal está subrayado)

MDFQVQIFSFLLISASVIMSRGDIQMTQSPSSLSASVGRVITCKASQNVVTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRH
 TGVPSRFSGSGSGTDFLTITISSLQPEDFATYYCQYSSYPFTFGGKVEIKRTVAAPSFIAPPDEQLKSGTASV
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
 NRGEC

SEC ID N° 2

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tio-anti-TENB2 (el péptido señal está subrayado). La sustitución de la cisteína es en el resto Ala-121 de la cadena pesada

Figura 2



La numeración se refiere a la cadena ligera de PR1 (anti-TENB2) de acuerdo con la numeración secuencial

Figura 3

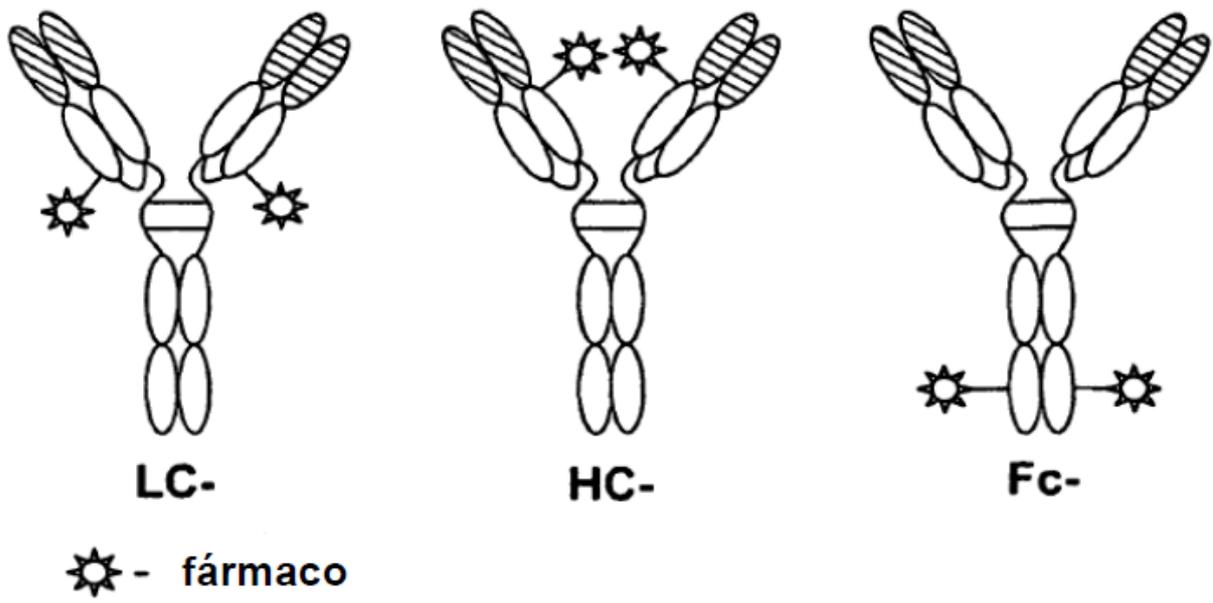


Figura 5

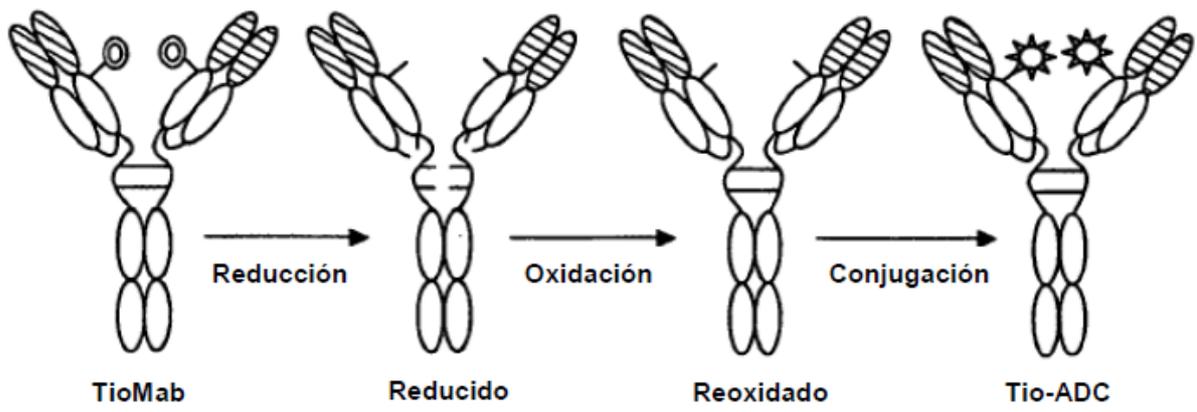


Figura 6

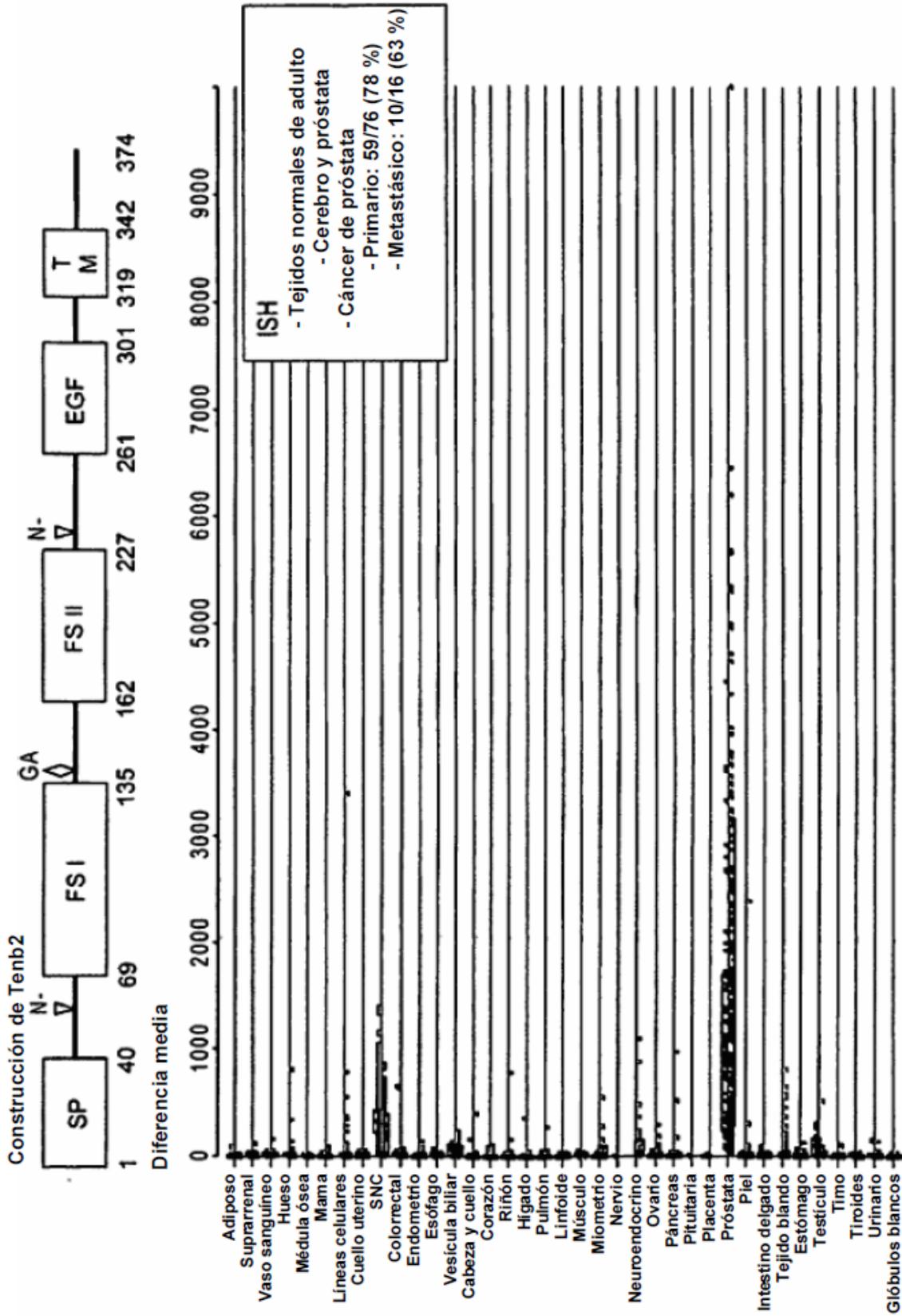
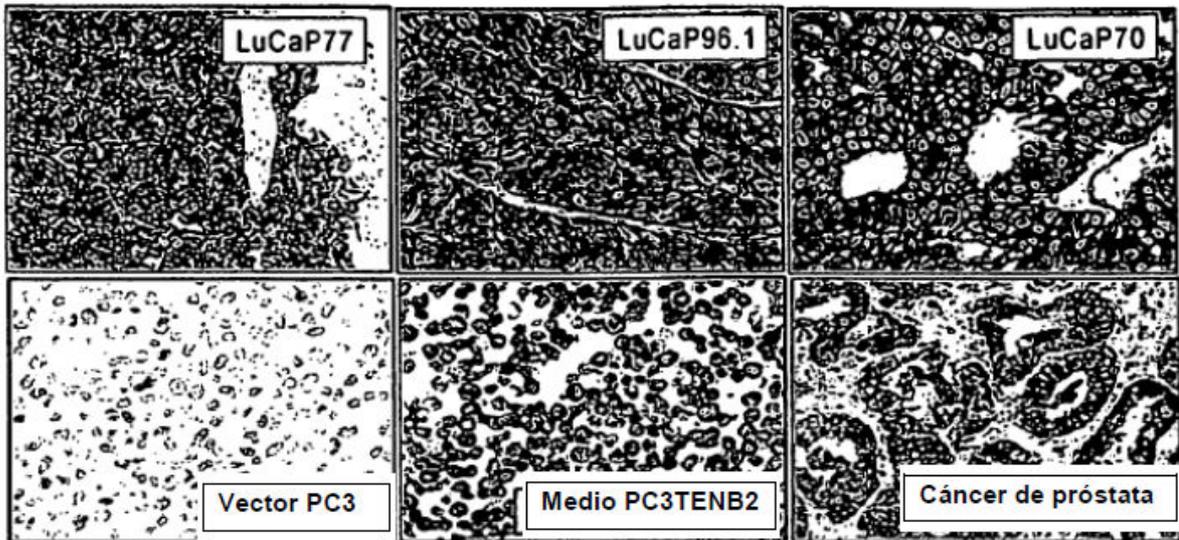


Figura 7

IHC para TENB2 con anti-TENB2



Immunohistoquímica: expresión de TENB2 en tumores de próstata humana

Los paneles superiores e inferiores proceden de modelos de explantes de próstata humanos, línea celular estable en medio PC3TENB2 con vector de control y tumor de próstata, respectivamente.

Figura 8

Interiorización de anticuerpo monoclonal (Mab) TENB2 en línea celular de medio PC3TENB2 y tumor Lucap 70

AntiTENB2 en medio PC3TENB2 con 2 horas de tratamiento a 37 °C



Anti-LAMP1 (marcador lisosomal) anti-TENB2 Combinación
Anti-TENB2 en LuCaP70 con 2 y 18 horas de incubación a 37 °C



Anticuerpo anti-TENB2 interiorizado en células en medio PC3TENB2 más rápido que el tumor LuCaP70
El anticuerpo anti-TENB2 se interiorizó más del 60 % en células LuCap70 a las 18 horas

Figura 9

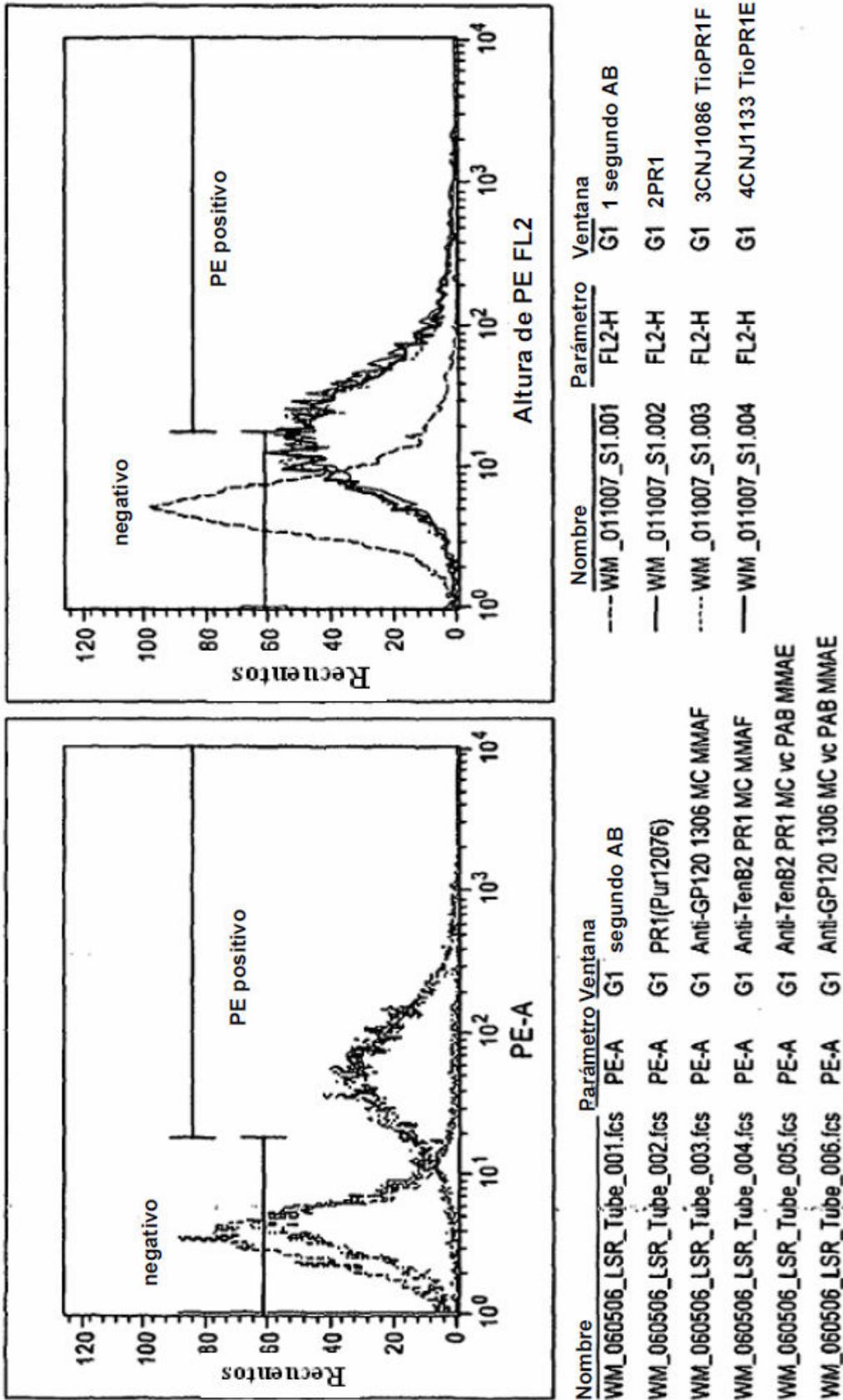
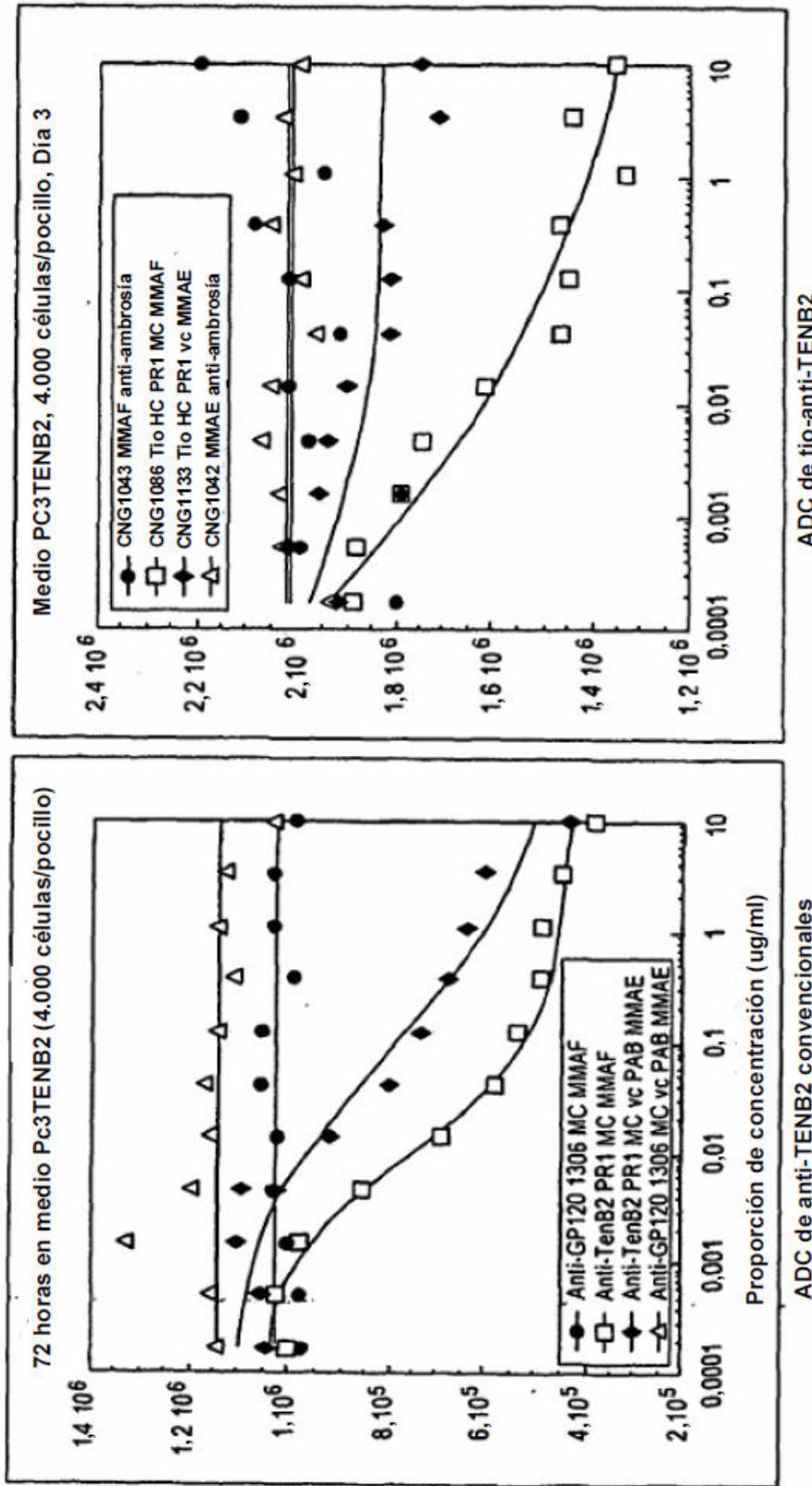


Figura 10

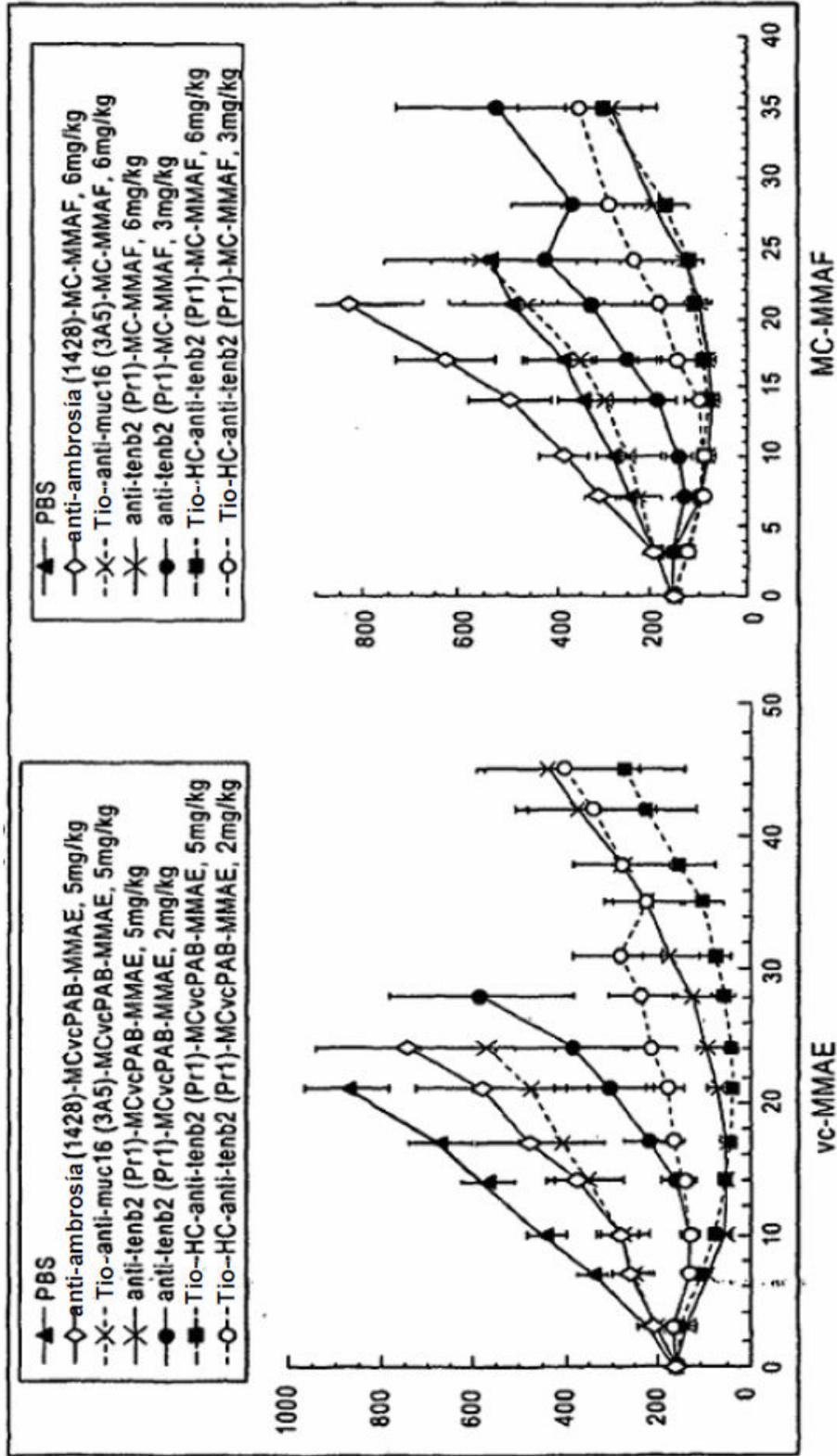
Ensayo de destrucción celular en células de medio PC3TENB2 con ADC de anti-TENB2 convencional y de tio-anti-TENB2



Las células PC3 que expresaban TENB2 se destruyeron mediante ADC convencionales o de tio-anti-TENB2. Las líneas celulares PC3 que sobre-expresaban de manera estable TENB2 (medio PC3TENB2) se trataron con concentraciones crecientes de ADC convencionales, Tio-anti-TENB2 y de control. La viabilidad celular se midió tras 3 días.

Figura 11

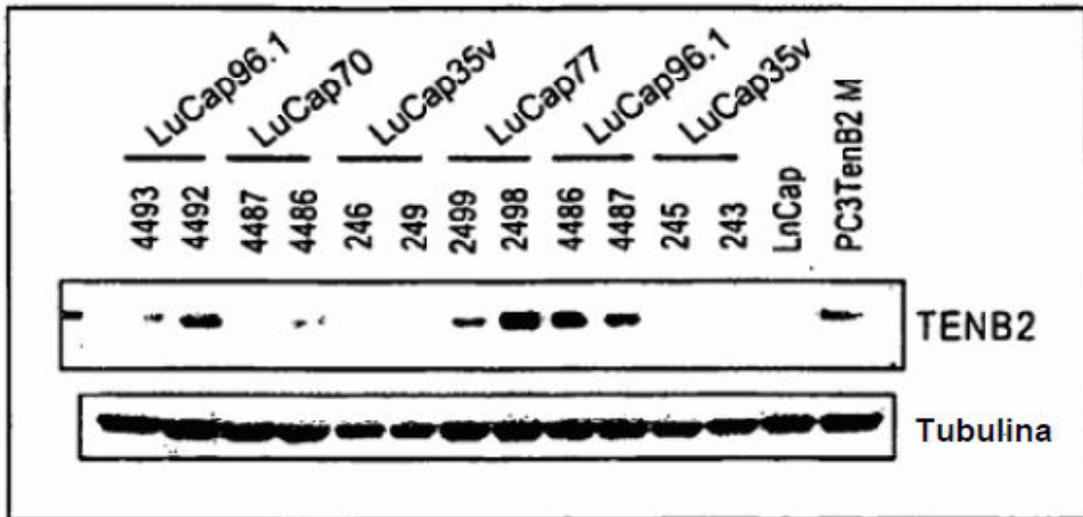
Estudio de eficacia en células en medio PC3TENB2 usando anti-TENB2 y tio-anti-TENB2 conjugados con vc-MMAE o MC-MMAF



La eficacia de los ADC de tio-anti-TENB2 es igual o mejor que los ADC producidos mediante el método convencional

Figura 12

Transferencia Western para TENB2 con diferentes tumores LuCaP



Se observaron diferentes niveles de expresión de proteína TENB2 en tumores transplantados LuCaP, en los que LuCaP77 es el más elevado y LuCaP35V es el más bajo. Estos datos coinciden con los datos obtenidos por Taqman de la presente invención sobre esas líneas celulares (datos no mostrados en la presente figura).

Figura 13

Xenoinjerto LuCaP70, 77 y 96.1 de cáncer de próstata humano. Se encontró una buena correlación entre la eficacia y el nivel de expresión de TENB2 con estos modelos

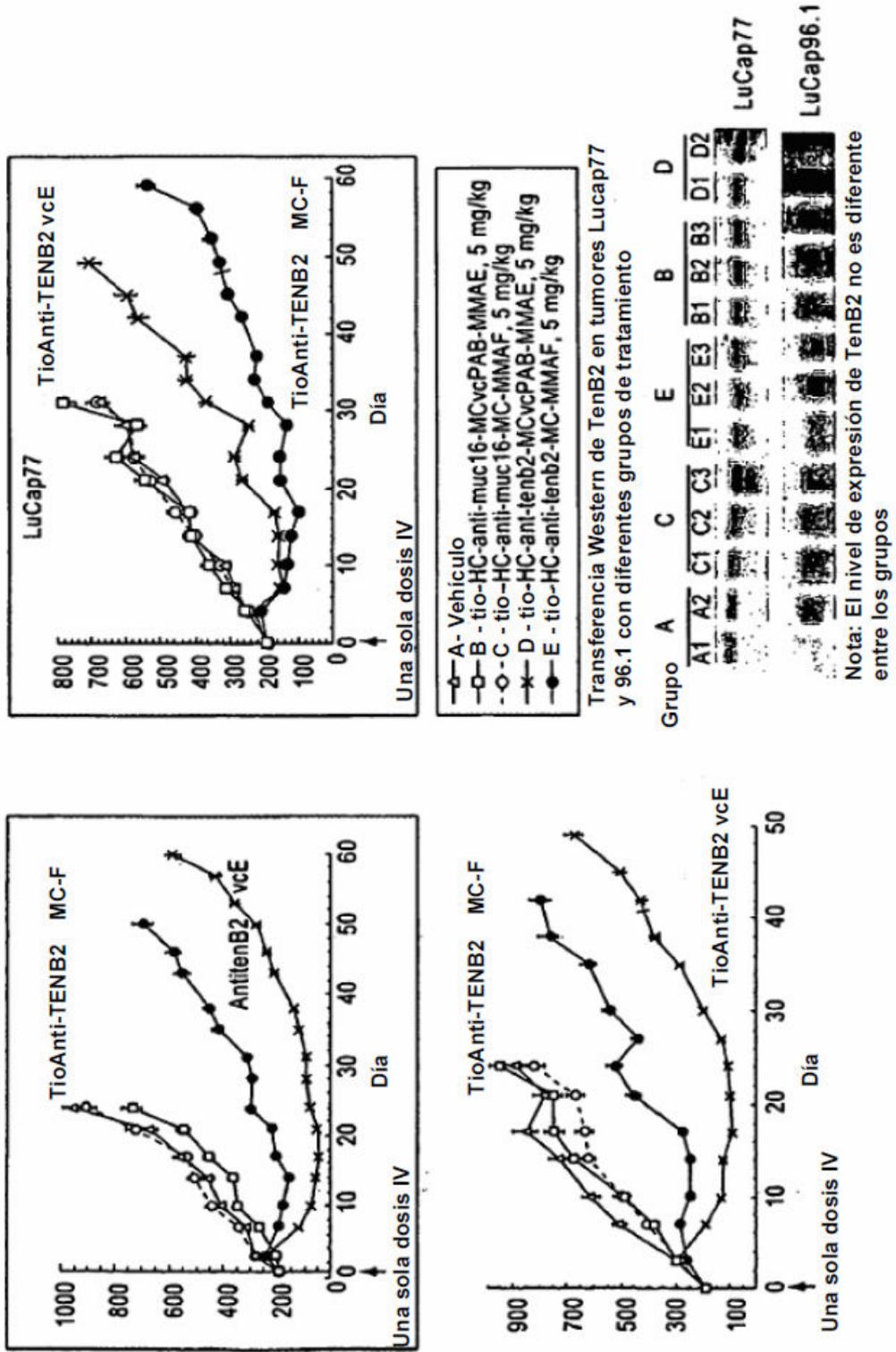
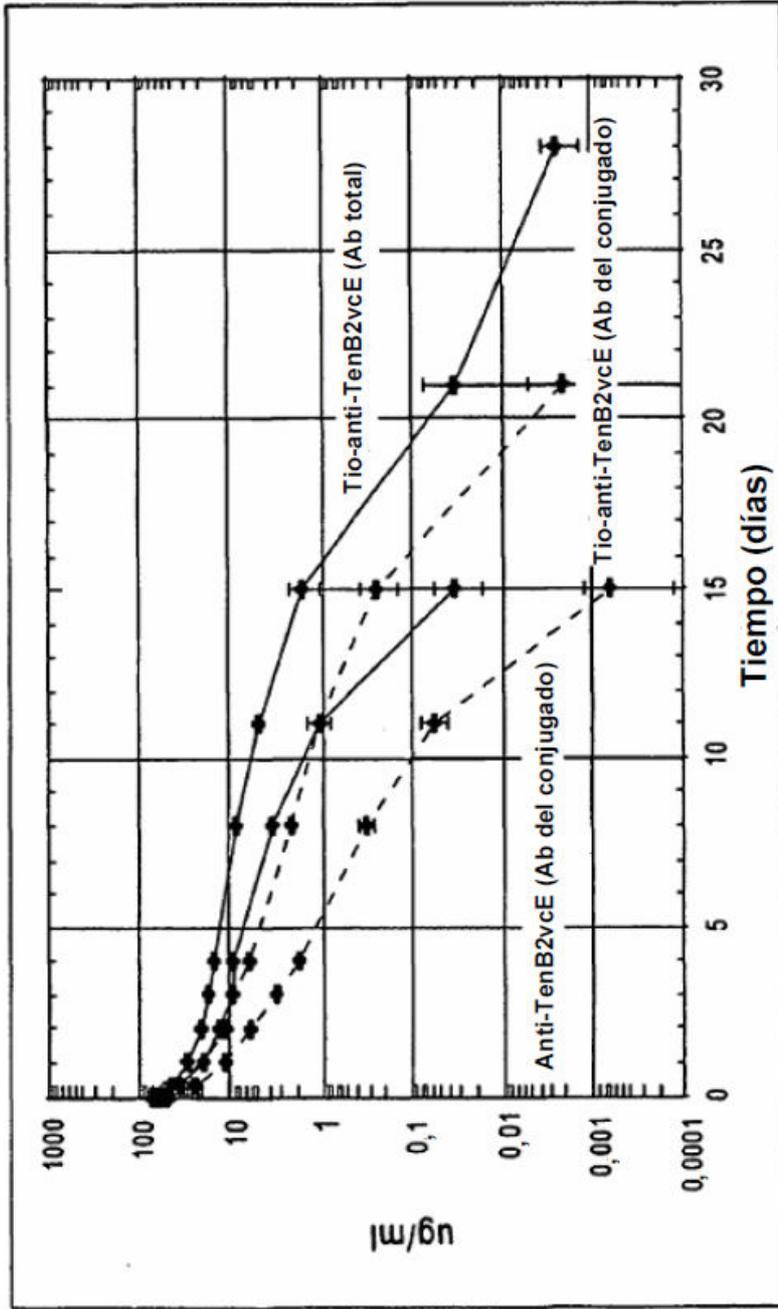


Figura 14

Evaluación farmacocinética en ratas

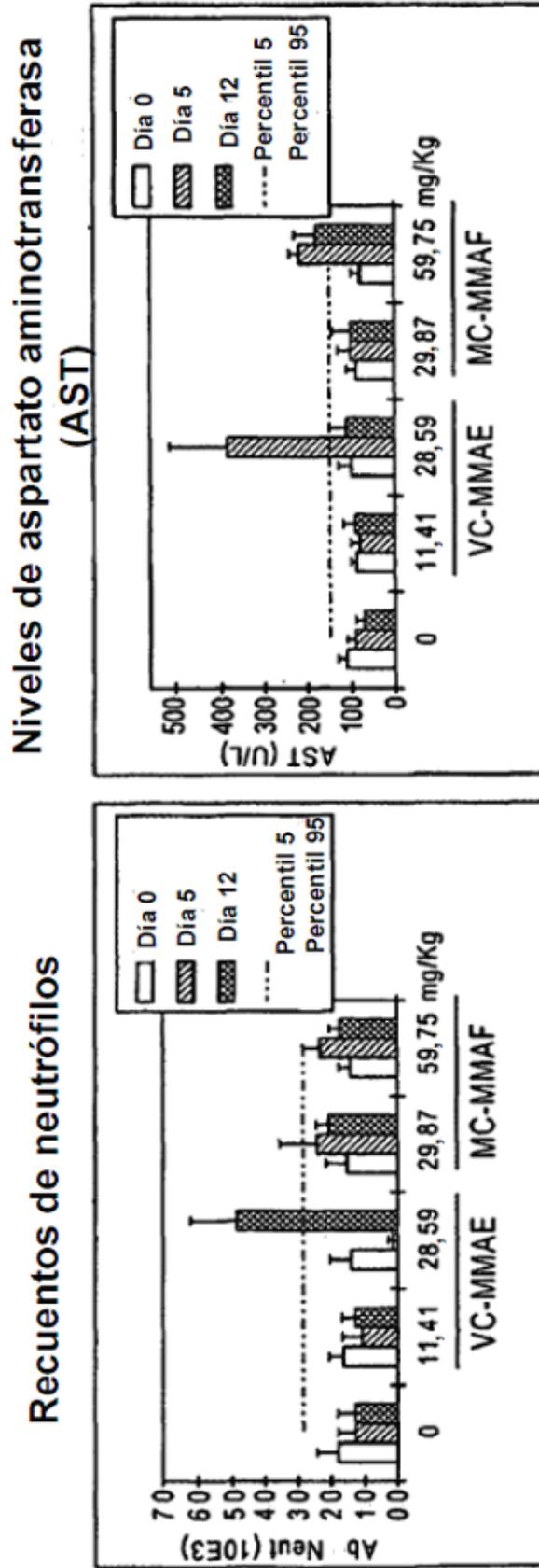


Concentraciones de ADC de TENB2 en suero tras una dosis en bolo IV de 5 mg/kg de ADC de Tio o convencional a ratas

Los ADC de Tio-anti-TENB2 son más estables en suero que en los ADC de anti-TENB2 convencionales
 Anti-TENB2vcE = anti-TENB2-vc-MMAE
 Tio-anti-TENB2vcE = Tio-anti-TENB2-vc-MMAE

Figura 15

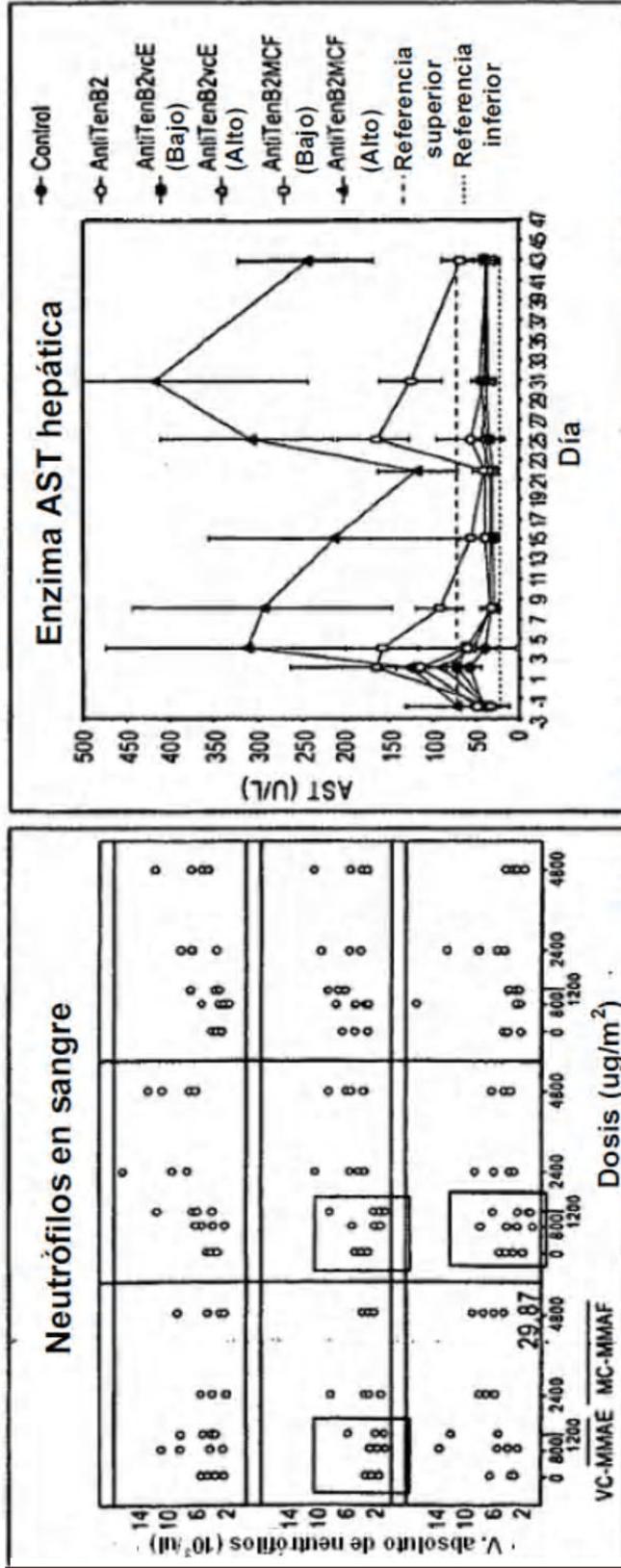
**Evaluación de la seguridad
Anti-TENB2-vc-MMAE y -MC-MMAF en ratas:**



Se realizaron estudios de toxicología con ADC de anti-TENB2 en ratas y monos cangrejeros (ambas especies de unión) y no revelaron toxicidades relacionadas con la diana en tejidos normales ni toxicidades no dependientes de la diana a dosis sustancialmente superiores a la dosis eficaz anticipada

Figura 16

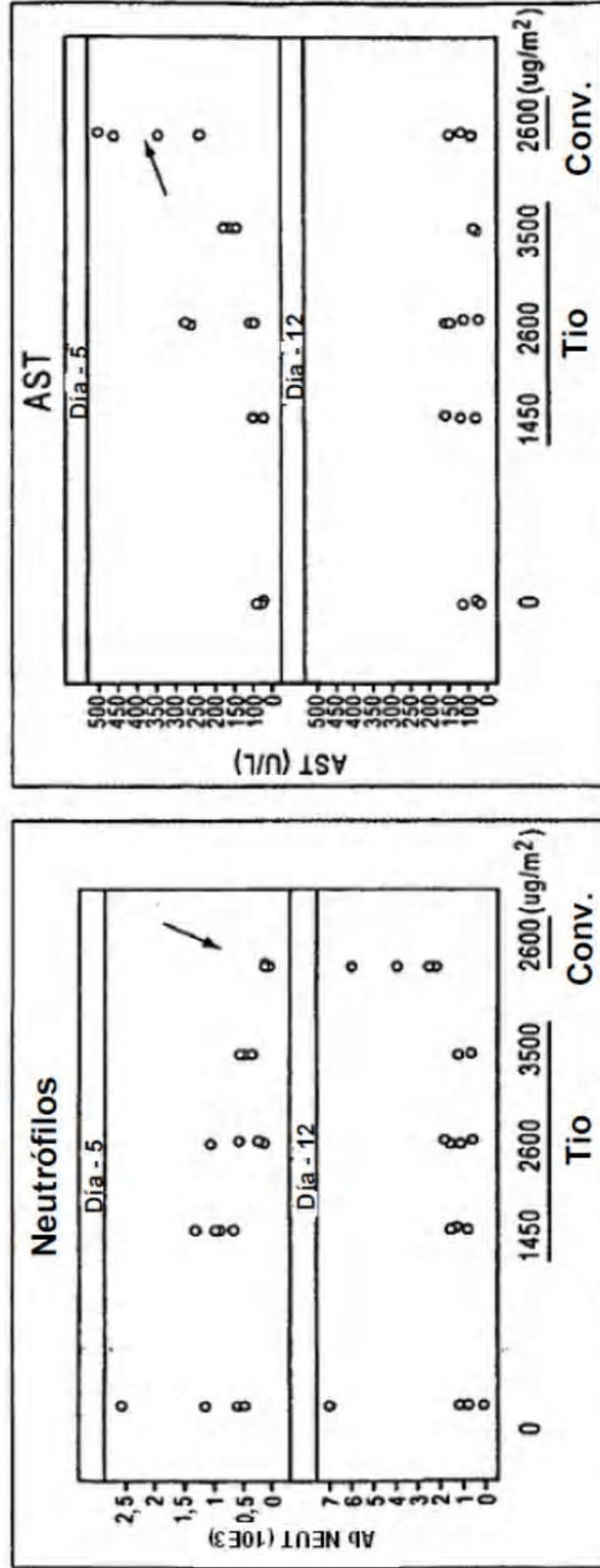
Anti-TENB2-vc-MMAE y -MC-MMAF en monos cangrejeros:



Se realizaron estudios de toxicología con ADC de anti-TENB2 en ratas y monos cangrejeros (ambas especies de unión) y no revelaron toxicidades relacionadas con la diana en tejidos normales ni toxicidades no dependientes de la diana a dosis sustancialmente superiores a la dosis eficaz anticipada

Figura 17

Tio-anti-TENB2-vc-MMAE en comparación con anti-TENB2-vc-MMAE en ratas



Tio-anti-TENB2-vc-MMAE: mejora en el recuento de neutrófilos y los niveles de AST

Figura 18