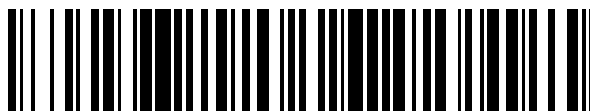


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 325**

51 Int. Cl.:

C07K 7/02 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/06 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2004 E 04821486 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 1725249**

54 Título: **Compuestos de monometilvalina capaces de conjugación con ligandos**

30 Prioridad:

06.11.2003 US 518534 P

26.03.2004 US 557116 P

04.08.2004 US 598899 P

27.10.2004 US 622455 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2014

73 Titular/es:

SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)

21823 30TH DRIVE, S.E.

BOTHELL, WA 98021, US

72 Inventor/es:

DORONINA, SVETLANA O.;

SETER, PETER D.;

TOKI, BRIAN E.;

EBENS, ALLEN J.;

KLINE, TONI BETH;

POLAKIS, PAUL;

SLIWKOWSKI, MARK X. y

SPENCER, SUSAN D.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 456 325 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

Compuestos de monometilvalina capaces de conjugación con ligandos

5 1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a un Compuesto de Fármaco y más particularmente a Conjugados de Fármaco-Conector-Ligando, Compuestos de Fármaco-Conector, y Conjugados de Fármaco-Ligando, y a composiciones que los incluyen. Además, en el presente documento se describen métodos para uso de los mismos para tratar cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa. La presente invención también se refiere a conjugados de anticuerpo-fármaco, y la composición es que los incluyen. Además como en el presente documento se describen métodos para su uso de los mismos para tratar cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa. Además, en el presente documento se describen métodos para usar compuestos de conjugados de anticuerpo-fármaco para diagnóstico o tratamiento *in vitro*, *in situ*, e *in vivo* de células de mamífero, o afecciones patológicas asociadas.

2. Antecedentes de la invención

La mejora de la administración de fármacos y de otros agentes a células, tejidos y tumores diana para conseguir una eficacia máxima y una toxicidad mínima ha sido el foco de una investigación considerable durante muchos años. Aunque se han hecho muchos intentos para desarrollar métodos eficaces para importar moléculas biológicamente activas en células, tanto *in vivo* como *in vitro*, ninguno ha demostrado ser totalmente satisfactorio. La optimización de la asociación del fármaco con su diana intracelular, a la vez que se minimiza la redistribución intercelular del fármaco, *por ejemplo*, a células vecinas, a menudo es difícil o ineficaz.

La mayoría de los agentes administrados actualmente a un paciente por vía parenteral no son dirigidos, lo que da como resultado la administración sistémica del agente a células y tejidos del organismo en los que no es necesario, y a menudo indeseable. Ésto puede dar como resultado efectos secundarios adversos del fármaco, y a menudo limita la dosis que se puede administrar de un fármaco (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos (anticáncer), citotóxicos, inhibidores de enzimas y fármacos antivirales o antimicrobianos). Por comparación, aunque se considera que la administración oral de fármacos es un modo de administración conveniente y económica, ésta comparte las mismas preocupaciones de toxicidad no específica a células sin afectar una vez que el fármaco se ha absorbido en la circulación sistémica. Complicaciones adicionales implican problemas con la biodisponibilidad oral y la permanencia de fármaco en el intestino lo que conduce a una exposición adicional del intestino al fármaco y por lo tanto riesgo de toxicidades intestinales. Por consiguiente, un objetivo fundamental ha sido desarrollar métodos para dirigir específicamente agentes a células y tejidos. Los beneficios de dicho tratamiento incluyen evitar los efectos psicológicos generales de una administración inapropiada de dichos agentes a otras células y tejidos, tales como células sin infectar. La dirección intracelular se puede conseguir con métodos, compuestos y formulaciones que permitan acumulación o retención de agentes biológicamente activos, *es decir* metabolitos activos, dentro de células.

Se ha establecido terapia de anticuerpos monoclonales para el tratamiento dirigido de pacientes con trastornos como cáncer, inmunológicos y angiogénicos.

El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, por ejemplo, fármacos para eliminar o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19: 605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26: 151-172; Patente de Estados Unidos Nº 4975278) permite teóricamente una administración dirigida del resto de fármaco a tumores, y acumulación intracelular en el mismo, a la vez que una administración sistémica de estos agentes de fármaco sin conjugar puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad en las células tumorales que se buscan para su eliminación (Baldwin et al., 1986 *Lancet* pp. (15 Mar., 1986): 603-05; Thorpe, 1985, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (ed.s), páginas 475-506). De este modo se busca eficacia máxima con toxicidad mínima. Se informado tanto de anticuerpos policlonales como de anticuerpos monoclonales útiles en estas estrategias (Rowland et al., 1986, *Cancer Immunol. Immunother.* 21: 183-87). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato, y vindesina (Rowland et al., 1986, *mencionado anteriormente*). Toxinas usadas en conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina de difteria, toxina de plantas tales como ricino, toxinas de molécula pequeña tales como geldanamicina (Kerr et al., 1997, *Bioconjugate Chem.* 8 (6): 781-784; Mandler et al. (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92 (19): 1573-1581; Mandler et al. (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028; Mandler et al. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13: 786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623), y caliqueamicina (Lode et al. (1998) *Cancer Res.* 58: 2928; Hinman et al. (1993) *Cancer Res.* 53: 3336-3342). Las toxinas pueden afectar a sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen unión a tubulinas, unión al ADN, o inhibición de la topoisomerasa (Meyer, D.L. y Senter, P.D. "Recent Advances in Conjugado de Anticuerpo Fármacos for Cancer Therapy" en *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Vol 38 (2003) Capítulo 23, 229-237). Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o con ligandos receptores de proteínas.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal de IgG1 kappa de murino dirigido frente al antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de linfocitos B normales y malignos y en radioisótopo ^{111}In o ^{90}Y unido mediante un quelante-conector de tiourea (Wiseman et al. (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27 (7): 766-77; Wiseman et al. (2002) Blood 99 (12): 4336-42; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20 (10): 2453-63; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20 (15): 3262-69). A pesar de que ZEVALIN tiene actividad frente al Linfoma no Hodgkin de linfocitos B (NHL), su administración da como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de fármaco y anticuerpo compuesto por un anticuerpo hu CD33 unido a caliqueamicina, se aprobó en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25 (7): 686; Patentes de Estados Unidos N° 4970198; N° 5079233; N° 5585089; N° 5606040; N° 5693762; N° 5739116; N° 5767285; N° 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de fármaco y anticuerpo compuesto por el anticuerpo huC242 unido a través del conector disulfuro SPP al resto de fármaco maitansinoide, DM1, está avanzando en ensayos en Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), conjugado de fármaco y anticuerpo ah compuesto por el anticuerpo monoclonal de antígeno de membrana específico antipróstata (PSMA) unido al resto de fármaco maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el tratamiento potencial de tumores de próstata. El mismo resto de fármaco maitansinoide, DM1, se unió a través de un conector no disulfuro, SMCC, la un anticuerpo monoclonal murino de ratón, TA.1 (Chari et al. (1992) Cancer Research 52: 127-131). Se informó que este conjugado era 200 veces menos potente que el correspondiente conjugado de conector disulfuro. Se consideró que el conector SMCC en el mismo era "no escindible".

Se han aislado varios compuestos peptídicos cortos a partir del molusco marino *Dolabella auricularia* y se ha encontrado que tienen actividad biológica (Pettit et al. (1993) Tetrahedron 49: 9151; Nakamura et al. (1995) Tetrahedron Letters 36: 5059-5062; Sone et al. (1995) Jour. Org Chem. 60: 4474). También se han preparado análogos de estos compuestos, y se encontró que algunos tienen actividad biológica (para una revisión, véase Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13: 243-277). Por ejemplo, auristatina E (Patente de Estados Unidos N° 5635483) es un análogo sintético del producto natural marino Dolastatina 10, un agente que inhibe la polimerización de la tubulina mediante unión al mismo dominio en la tubulina que el fármaco anticáncer vincristina (G. R. Pettit, (1997) Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 70: 1-79). Dolastatina 10, auristatina PE, y auristatina E son péptidos lineales que tienen cuatro aminoácidos, tres de los cuales son únicos esta clase de compuestos de dolastatina, y una amida C-terminal.

Los péptidos auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron con: (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; "Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"; Francisco et al. (2003) Blood 102 (4): 1458-1465; Publicación de Estados Unidos N° 2004/0018194; (iii) anticuerpos anti-CD20 tales como RITUXAN® (documento WO 04/032828) para el tratamiento de cánceres que expresan CD20 y trastornos inmunes; (iv) anticuerpos anti-EphB2 2H9 y anti-IL-8 para el tratamiento de 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); y (vi) otros anticuerpos anti-CD30 (documento WO 03/043583).

La auristatina E conjugada con anticuerpos monoclonales se desvela en Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volumen 45, Resumen Número 623, presentado el 28 de marzo de 2004.

A pesar de los datos *in vitro* para compuestos de la clase dolastatina y sus análogos, toxicidades generales significativas a dosis necesarias para conseguir un efecto terapéutico comprometen su eficacia en estudios clínicos. Por consiguiente, existe una clara necesidad en la técnica de derivados de dolastatina/auristatina que tengan una toxicidad significativamente menor, y que sin embargo tengan eficacia terapéutica útil. Éstas y otras limitaciones y problemas del pasado se abordan con la presente invención.

La familia ErbB de tirosina quinasas son mediadores importantes del crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. La familia de receptores incluye cuatro miembros distintos que incluyen receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1, HER1), HER2 (ErbB2 o p 185^{neu}), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tiro2). Se ha caracterizado un panel de anticuerpos anti-ErbB2 usando la línea celular de tumor de mama humano SKBR3 (Hudziak et al., (1989) Mol. Cell. Biol. 9 (3): 1165-1172. La inhibición máxima se obtuvo con el anticuerpo denominado 4D5 que inhibió la proliferación celular en un 56 %. Otros anticuerpos en el panel redujeron la proliferación celular en menor grado en este ensayo. Se encontró adicionalmente que el anticuerpo 4D5 sensibilizada líneas celulares de tumores de mama que sobreexpresan ErbB2 a los efectos citotóxicos de TNF- α (Patente de Estados Unidos N° 5677171). Los anticuerpos anti-ErbB2 analizados en Hudziak *et al.* se caracterizan adicionalmente en Fendly et al. (1990) Cancer Research 50: 1550-1558; Kotts et al. (1990) In vitro 26 (3): 59A; Sarup et al. (1991) Growth Regulation 1: 72-82; Shepard et al. J. (1991) Clin. Immunol. 11 (3): 117-127; Kumar et al. (1991) Mol. Cell. Biol. 11 (2) 979-986; Lewis et al. (1993) Cancer Immunol. Immunother. 37: 255-263; Pietras et al. (1994) Oncogene 9: 1829-1838; Vitetta et al. (1994) Cancer Research 54: 5301-5309; Sliwkowski et al. (1994) J. Biol. Chem. 269 (20): 14661-14665; Scott et al. (1991) J. Biol. Chem. 266: 14300-5; D'souza et al. Proc. Natl. Acad. Sci.

(1994) 91: 7202-7206; Lewis et al. (1996) Cancer Research 56: 1457-1465; y Schaefer et al. (1997) Oncogene 15: 1385-1394.

Se han descrito otros anticuerpos anti-ErbB2 con diversas propiedades en Tagliabue et al. Int. J. Cancer 47: 933-937 (1991); McKenzie et al. Oncogene 4: 543-548 (1989); Maier et al. Cancer Res. 51: 5361-5369 (1991); Bacus et al. Molecular Carcinogenesis 3: 350-362 (1990); Stancovski et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8691-8695 (1991); Bacus et al. Cancer Research 52: 2580-2589 (1992); Xu et al. Int. J. Cancer 53: 401-408 (1993); documento WO94/00136; Kasprzyk et al. Cancer Research 52: 2771-2776 (1992); Hancock et al. (1991) Cancer Res. 51: 4575-4580; Shawver et al. (1994) Cancer Res. 54: 1367-1373; Arteaga et al. (1994) Cancer Res. 54: 3758-3765; Harwerth et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 15160-15167; Patente de Estados Unidos Nº 5783186; y Klapper et al. (1997) Oncogene 14: 2099-2109.

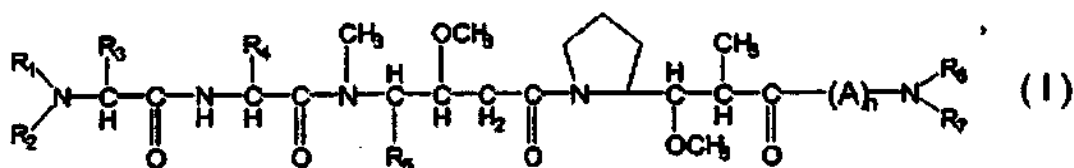
El cribado de homología ha dado como resultado la identificación de otros dos miembros de la familia de receptores ErbB; ErbB3 (Patente de Estados Unidos Nº 5.183.884; Patente de Estados Unidos Nº 5.480.968; Kraus et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9193-9197) y ErbB4 (documento EP 599274; Plowman et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1746-1750; y Plowman et al. (1993) Nature 366: 473-475). Ambos de estos receptores presentan mayor expresión en al menos algunas líneas celulares de cáncer de mama.

HERCEPTIN® (Trastuzumab) es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente con alta afinidad en un ensayo basado en células ($K_d = 5$ nM) al dominio extracelular de la proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, HER2 (ErbB2) (Patente de Estados Unidos Nº 5821337; Patente de Estados Unidos Nº 6054297; Patente de Estados Unidos Nº 6407213; Patente de Estados Unidos Nº 6639055; Coussens L, et al. (1985) Science 230: 1132-9; Slamon DJ, et al. (1989) Science 244: 707-12). Trastuzumab es un anticuerpo IgG1 kappa que contiene regiones marco humanas con las regiones que determinan la complementariedad de un anticuerpo de murino (4D5) que se une a HER2. Trastuzumab se une al antígeno de HER2 y de este modo inhibe el crecimiento de células cancerosas. Debido a que Trastuzumab es un anticuerpo humanizado, éste minimiza cualquier respuesta de HAMA en pacientes. El anticuerpo humanizado frente a HER2 se produce mediante un cultivo de suspensión de células de mamífero (Ovario de Hámster Chino, CHO). El proto-oncogen de HER2 (o c-erbB2) codifica una proteína receptora transmembrana de 185 kDa, que está relacionado estructuralmente con el receptor del factor de crecimiento epidérmico. La sobreexpresión de la proteína HER2 se observa en un 25 %-30 % de cánceres primarios de mama y se puede determinar usando una evaluación basada en inmunohistoquímica de bloques tumorales fijados (Press MF, et al. (1993) Cancer Res 53: 4960-70. Se ha mostrado que, tanto en ensayos *in vitro* como en animales, inhibe la proliferación de células tumorales humanas que sobreexpresan HER2 (Hudziak RM, et al. (1989) Mol Cell Biol 9: 1165-72; Lewis GD, et al. (1993) Cancer Immunol Immunother; 37: 255-63; Baselga J, et al. (1998) Cancer Res. 58: 2825-2831). Trastuzumab es un mediador de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, ADCC (Hotelling TE, et al. (1996) [resumen]. Proc. Annual Meeting Am Assoc Cancer Res; 37:471; Pegram MD, et al. (1997) [resumen]. Proc Am Assoc Cancer Res; 38:602). *In vitro*, se ha mostrado que ADCC mediado por Trastuzumab se ejerce preferentemente sobre células cancerosas que sobreexpresan HER2 en comparación con células cancerosas que no sobreexpresan HER2. HERCEPTIN® como un agente individual está indicado para el tratamiento de pacientes con cáncer metastásico de mama cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2 y que han recibido uno o más regímenes de quimioterapia para su enfermedad metastásica. HERCEPTIN® en combinación con paclitaxel está indicado para el tratamiento de pacientes con cáncer metastásico de mama cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2 y que no han recibido quimioterapia para su enfermedad metastásica. HERCEPTIN® es clínicamente activo en pacientes con cánceres metastásicos de mama que sobreexpresan ErbB2 que han recibido anteriormente una terapia anticáncer extensa (Baselga et al, (1996) J. Clin. Oncol. 14: 737-744).

El anticuerpo anti-HER2 monoclonal de murino inhibe el crecimiento de líneas celulares de cáncer de mama que sobreexpresan HER2 en el nivel 2+ y 3+ ($1-2 \times 10^6$ receptores de HER2 por célula), pero no tiene actividad sobre células que expresan niveles más bajos de HER2 (Lewis et al., (1993) Cancer Immunol. Immunother. 37: 255-263). Basándose en esta observación, se humanizó anticuerpo 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Patente de Estados Unidos Nº 5821337; Carter et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-4289) y se sometió a ensayo en pacientes con cáncer de mama cuyos tumores sobreexpresaban HER2 pero que habían progresado después de quimioterapia convencional (Cobleigh et al., (1999) J. Clin. Oncol. 17: 2639-2648).

A pesar de que HERCEPTIN es un gran avance en el tratamiento de pacientes con cánceres de mama que sobreexpresan ErbB2 que han recibido anteriormente terapia anticáncer extensa, algunos pacientes de esta población no responden a o solamente responden muy poco al tratamiento con HERCEPTIN.

El documento WO01/18032 A2 describe péptidos de dolastatina de fórmula (I)



El documento WO2004/073656 A2 describe anticuerpos anti-CD70 y derivados de los mismos conjugados con agentes citotóxicos, inmunosupresores u otros agentes terapéuticos, para el tratamiento de cánceres y trastornos inmunológicos que expresan CD70.

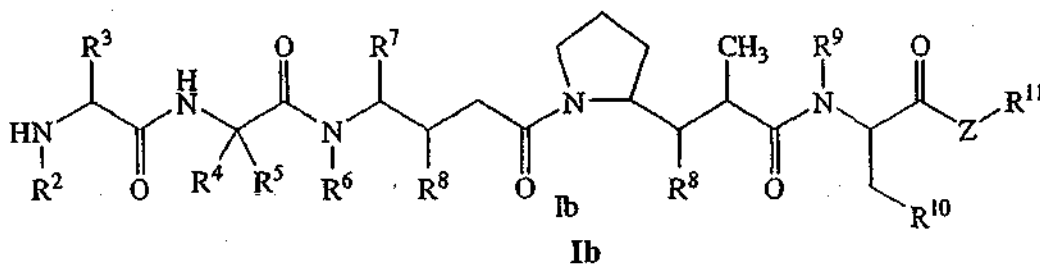
El documento WO2004/010957 A2 describe conjugados de fármaco-conector-ligando en los que un fármaco se une a un ligando a través de una unidad de Conector basada en péptidos. El ligando puede ser un anticuerpo. Se describen métodos para tratar cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa.

Por lo tanto, existe una necesidad clínica significativa para desarrollar terapias adicionales frente al cáncer dirigidas por HER2 para los pacientes con tumores que sobreexpresan HER2 u otras enfermedades asociadas con la expresión de HER2 que no responden, o responden muy poco, al tratamiento con HERCEPTIN.

La relación de cualquier referencia en la presente solicitud no es una admisión de que la referencia sea técnica anterior a la presente solicitud.

3. Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona Compuestos Fármaco que tienen la Fórmula Ib:



o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos,

independientemente de cada posición:

R² se selecciona entre H y alquilo C₁-C₈;

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

R⁴ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquil-arilo C₁-C₈, alquil C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈, y alquil C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈); en la que R⁵ se selecciona entre -H y -metilo; o R⁴ y R⁵ forman de manera conjunta un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(C^aR^b)_n- en la que R^a y R^b se seleccionan independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈ y -carbociclo C₃-C₈ y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6;

R⁶ se selecciona entre H y -alquilo C₁-C₈;

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

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

R⁹ se selecciona entre H y -alquilo C₁-C₈;

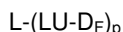
R¹⁰ se selecciona entre grupo arilo o -heterociclo C₃-C₈;

Z es -O-; y

R¹¹ es H.

Los compuestos de Fórmula (Ib) son útiles para tratar cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa en un paciente o útiles como un compuesto intermedio para la síntesis de un Fármaco-Conector, Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando, y Conjugado de Fármaco-Ligando que tiene una unidad de Fármaco.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un conjugado tal como se define en la reivindicación 2, que tiene la siguiente fórmula:



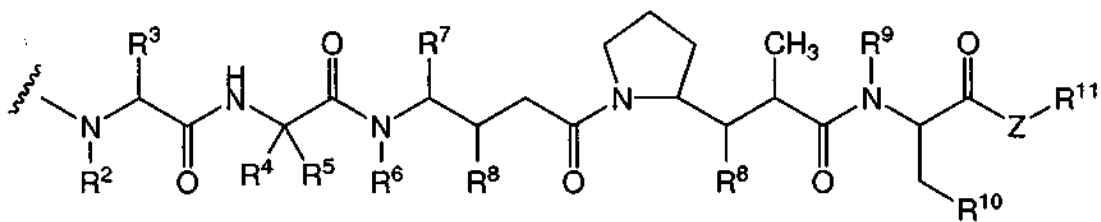
o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo en la que:

L- es una unidad de Ligando,

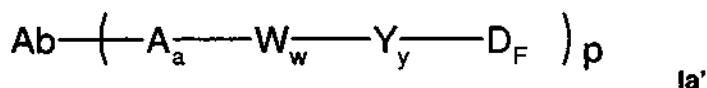
LU es una unidad de Conector que puede estar presente o ausente,

p varía de 1 a 20, y

D_F es un grupo de la siguiente fórmula:



El conjugado que se define en la reivindicación 2 puede ser un conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene la Fórmula la'



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo en la que:

Ab es un anticuerpo,

-A_a-W_w-Y_y- es una unidad de Conector,

A es una unidad Bastidor,

a es 0 o 1,

cada W es independientemente una unidad de Aminoácido,

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

Y es a unidad Espaciadora,

y es 0, 1 o 2, y

p varía de 1 a 20.

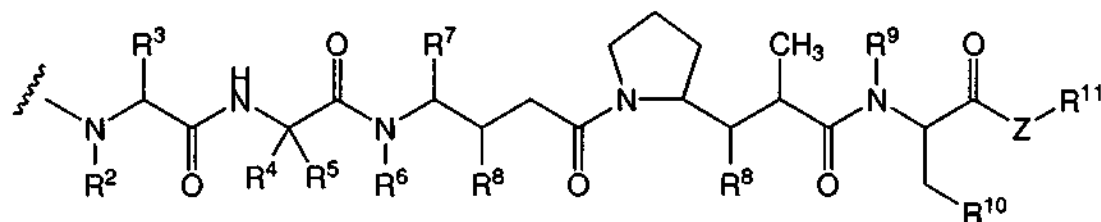
En otro aspecto, la presente invención proporciona un conjugado tal como se define en la reivindicación 3, que tiene la siguiente fórmula:



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo en la que:

LU- es una Unidad de Conector que comprende un grupo funcional capaz de unirse a una unidad de ligando, y

D_F es un grupo de la siguiente fórmula:



Además, en otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de un conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Además, en el presente documento se describen composiciones que comprenden una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Ligando que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Ligando y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5

Además, en el presente documento se describen métodos para eliminar o inhibir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Compuesto de Fármaco-Conector.

10 Además, en el presente documento se describen métodos para eliminar o inhibir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando.

15 Además, en el presente documento se describen métodos para eliminar o inhibir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Ligando que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Ligando.

20 Además, en el presente documento se describen métodos para tratar el cáncer que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Compuesto de Fármaco-Conector.

Además, en el presente documento se describen métodos para tratar el cáncer que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando.

25 Además, en el presente documento se describen métodos para tratar el cáncer que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Ligando que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Ligando.

30 Además, en el presente documento se describen métodos para eliminar o inhibir la replicación de una célula que expresa un anticuerpo autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Compuesto de Fármaco-Conector.

35 Además, en el presente documento se describen métodos para eliminar o inhibir la replicación de una célula que expresa un anticuerpo autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando.

40 Además, en el presente documento se describen métodos para eliminar o inhibir la replicación de una célula que expresa un anticuerpo autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Ligando que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Ligando.

Además, en el presente documento se describen métodos para tratar una enfermedad autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Compuesto de Fármaco-Conector.

45 Además, en el presente documento se describen métodos para tratar una enfermedad autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando.

50 Además, en el presente documento se describen métodos para tratar una enfermedad autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Ligando que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Ligando.

Además, en el presente documento se describen métodos para tratar una enfermedad infecciosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Compuesto de Fármaco-Conector.

55 Además, en el presente documento se describen métodos para tratar una enfermedad infecciosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando.

60 Además, en el presente documento se describen métodos para tratar una enfermedad infecciosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Ligando que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Ligando.

Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Compuesto de Fármaco-Conector.

65

Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir la multiplicación de una célula tumoral o

célula cancerosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando.

5 Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Ligando que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Ligando.

10 Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir el cáncer que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Compuesto de Fármaco-Conector.

Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir el cáncer que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando.

15 Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir el cáncer que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Ligando que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Ligando.

20 Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir la multiplicación de una célula que expresa un anticuerpo autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Compuesto de Fármaco-Conector.

25 Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir la multiplicación de una célula que expresa un anticuerpo autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando.

30 Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir la multiplicación de una célula que expresa un anticuerpo autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Ligando que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Ligando.

Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir una enfermedad autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Compuesto de Fármaco-Conector.

35 Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir una enfermedad autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando.

40 Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir una enfermedad autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Ligando que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Ligando.

Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir una enfermedad infecciosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Compuesto de Fármaco-Conector.

45 Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir una enfermedad infecciosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando.

50 Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir una enfermedad infecciosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Ligando que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Ligando.

Además, en el presente documento se describe un Compuesto de Fármaco que se puede usar como un compuesto intermedio para la síntesis de un Compuesto de Fármaco-Conector que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Ligando,

55 Además, en el presente documento se describe un Compuesto de Fármaco-Conector que se puede usar como un compuesto intermedio para la síntesis de un Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando.

60 En una realización de los compuestos de Fórmula Ia', Ab no es un anticuerpo que se une a un receptor ErbB receptor o que se une a uno o más receptores (1)-(35):

(1) BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB, N° de acceso en Genbank NM_001203);

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, N° de acceso en Genbank NM_003486);

65 (3) STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata, N° de acceso en Genbank NM_012449);

- (4) 0772P (CA125, MUC16, N° de acceso en Genbank AF361486);
- 5 (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor de potenciación de megacariocitos, mesotelina, N° de acceso en Genbank NM_005823);
- 10 (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTI1b, SLC34A2, familia de transportadores de soluto 34 (fosfato sódico), miembro 2, transportador de fosfato dependiente de sodio de tipo II 3b, N° de acceso en Genbank NM_006424);
- (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (de tipo 1 y similar al tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B, N° de acceso en Genbank AB040878);
- 15 (8) genes PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 gene, N° de acceso en Genbank AY358628);
- (9) ETBR (Receptor de endotelina de tipo B, N° de acceso en Genbank AY275463);
- 20 (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, N° de acceso en Genbank NM_017763);
- 25 (11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata 2, proteína de próstata de seis dominios transmembrana, N° de acceso en Genbank AF455138);
- (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial de receptores transitorios, subfamilia M, miembro 4, N° de acceso en Genbank NM_017636);
- 30 (13) CRIPTO, (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, N° de acceso en Genbank NP_003203 o NM_003212);
- 35 (14) CD21 (CR2 (Receptor de complemento2) o C3DR (receptor de C3d/virus de Epstein Barr) o Hs.73792, N° de acceso en Genbank M26004);
- (15) CD79b (IGb (asociado a inmunoglobulina beta), B29, N° de acceso en Genbank NM_000626);
- 40 (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína de anclaje 1a de fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C, N° de acceso en Genbank NM_030764);
- (17) HER2 (N° de acceso en Genbank M11730);
- (18) NCA (N° de acceso en Genbank M18728);
- 45 (19) MDP (N° de acceso en Genbank BC017023);
- (20) IL20Rα (N° de acceso en Genbank AF184971);
- 50 (21) Brevican (N° de acceso en Genbank AF229053);
- (22) Ephb2R (N° de acceso en Genbank NM_004442);
- (23) ASLG659 (N° de acceso en Genbank AX092328);
- 55 (24) PSCA (N° de acceso en Genbank AJ297436);
- (25) GEDA (N° de acceso en Genbank AY260763);
- 60 (26) BAFF-R (N° de acceso en Genbank NP_443177.1);
- (27) CD22 (N° de acceso en Genbank NP-001762.1);
- 65 (28) CD79a (CD79A, CD79α, asociado a inmunoglobulina alfa, una proteína específica de linfocitos B que interactúa covalentemente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie de moléculas de IgM, transduce una señal implicada en la diferenciación de linfocitos B, N° de acceso en Genbank NP_001774.1);

(29) CXCR5 (receptor del linfoma de Burkitt 1, un receptor acoplado a la proteína G que se activa con la quimioquina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y en la defensa humoral, desempeña un papel en la infección por VIH-2 y quizá en el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma, y leucemia, N° de acceso en Genbank NP_001707.1);

(30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula MHC de clase II (antígeno Ia) que se une a péptidos y los presenta a linfocitos T CD4+, N° de acceso en Genbank NP_002111.1);

(31) P2X5 (Canal iónico 5 abierto por el ligando receptor purinérgico P2X, un canal aniónico abierto por ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión y en la neurogénesis sináptica, la deficiencia puede contribuir a la patofisiología de inestabilidad, N° de acceso en Genbank NP_002552.2);

(32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de linfocitos B, Lyb-2, N° de acceso en Genbank NP_001773.1);

(33) LY64 (Antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repetición rica en leucina (LRR), regula la activación y apoptosis de linfocitos B, la pérdida de función está asociada con mayor actividad de la enfermedad en pacientes con lupus sistémico eritematoso, N° de acceso en Genbank NP_005573.1);

(34) FCRH1 (proteína 1 de tipo receptor de Fc, 1 supuesto receptor para el dominio Fc de la inmunoglobulina que contiene los dominios similar a Ig de tipo C2 e ITAM, puede tener un papel en la diferenciación de linfocitos B, N° de acceso en Genbank NP_443170.1); o

(35) IRTA22 (Translocación asociada al receptor 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas, un supuesto inmunoreceptor con posibles papeles en el desarrollo y la linfomagénesis de linfocitos B; la desregulación de los genes por translocación se produce en algunas neoplasias de linfocitos B, N° de acceso en Genbank NP_112571.1).

Además, en el presente documento se describen composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Anticuerpo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Además, en el presente documento se describen composiciones que comprenden una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Anticuerpo que tiene una unidad de Fármaco (resto) que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Anticuerpo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Además, en el presente documento se describen métodos para eliminar o inhibir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Anticuerpo.

Además, en el presente documento se describen métodos para eliminar o inhibir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Anticuerpo que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Anticuerpo.

Además, en el presente documento se describen métodos para tratar el cáncer que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Anticuerpo.

Además, en el presente documento se describen métodos para tratar el cáncer que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Anticuerpo que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Anticuerpo.

Además, en el presente documento se describen métodos para eliminar o inhibir la replicación de una célula que expresa un anticuerpo autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Anticuerpo.

Además, en el presente documento se describen métodos para eliminar o inhibir la replicación de una célula que expresa un anticuerpo autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Anticuerpo que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Anticuerpo.

Además, en el presente documento se describen métodos para tratar una enfermedad autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Anticuerpo.

Además, en el presente documento se describen métodos para tratar una enfermedad autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Anticuerpo que tiene

una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Anticuerpo.

Además, en el presente documento se describen métodos para tratar una enfermedad infecciosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Anticuerpo.

5 Además, en el presente documento se describen métodos para tratar una enfermedad infecciosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Anticuerpo que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Anticuerpo.

10 Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Anticuerpo.

15 Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Anticuerpo que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Anticuerpo.

20 Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir el cáncer que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Anticuerpo.

Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir el cáncer que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Anticuerpo que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Anticuerpo.

25 Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir la multiplicación de una célula que expresa un anticuerpo autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Anticuerpo.

30 Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir la multiplicación de una célula que expresa un anticuerpo autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Anticuerpo que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Anticuerpo.

35 Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir una enfermedad autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Anticuerpo.

40 Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir una enfermedad autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Anticuerpo que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Anticuerpo.

Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir una enfermedad infecciosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Conector-Anticuerpo.

45 Además, en el presente documento se describen métodos para prevenir una enfermedad infecciosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Fármaco-Anticuerpo que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Anticuerpo.

50 En el presente documento, se proporciona un Compuesto de Fármaco que se puede usar como un compuesto intermedio para la síntesis de un Compuesto de Fármaco-Conector que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Anticuerpo.

En el presente documento, se proporciona un Compuesto de Fármaco-Conector que se puede usar como un compuesto intermedio para la síntesis de un Conjugado de Fármaco-Conector-Anticuerpo.

55 En los Conjugados de Fármaco-Conector-Anticuerpo (también denominados conjugados de anticuerpo-fármaco) que se describen en el presente documento

Ab puede ser un anticuerpo que se une a uno o más de los antígenos (1)-(35):

- 60 (1) BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB, N° de acceso en Genbank NM_001203);
 (2) E16 (LAT1, SLC7A5, N° de acceso en Genbank NM_003486);
 (3) STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata, N° de acceso en Genbank NM_012449);
 65 (4) 0772P (CA125, MUC16, N° de acceso en Genbank AF361486);
 (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor de potenciación de megacariocitos, mesotelina, N° de acceso en Genbank

NM_005823);

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPT11b, SLC34A2, familia de transportadores de soluto 34 (fosfato sódico), miembro 2, transportador de fosfato dependiente de sodio de tipo II 3b, N° de acceso en Genbank NM_006424);

(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (de tipo 1 y similar al tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B, N° de acceso en Genbank AB040878);

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 gene, N° de acceso en Genbank AY358628);

(9) ETBR (Receptor de endotelina de tipo B, N° de acceso en Genbank AY275463);

(10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, N° de acceso en Genbank NM_017763);

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata 2, proteína de próstata de seis dominios transmembrana, N° de acceso en Genbank AF455138);

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial de receptores transitorios, subfamilia M, miembro 4, N° de acceso en Genbank NM_017636);

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, N° de acceso en Genbank NP_003203 o NM_003212);

(14) CD21 (CR2 (Receptor de complemento2) o C3DR (receptor de C3d/virus de Epstein Barr) o Hs.73792, N° de acceso en Genbank M26004);

(15) CD79b (IGb (asociado a inmunoglobulina beta), B29, N° de acceso en Genbank NM_000626);

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína de anclaje 1a de fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C, N° de acceso en Genbank NM_030764);

(17) HER2 (N° de acceso en Genbank M11730);

(18) NCA (N° de acceso en Genbank M18728);

(19) MDP (N° de acceso en Genbank BC017023);

(20) IL20Rα (N° de acceso en Genbank AF184971);

(21) Brevican (N° de acceso en Genbank AF229053);

(22) Ephb2R (N° de acceso en Genbank NM_004442);

(23) ASLG659 (N° de acceso en Genbank AX092328);

(24) PSCA (N° de acceso en Genbank AJ297436);

(25) GEDA (N° de acceso en Genbank AY260763);

(26) BAFF-R (N° de acceso en Genbank NP_443177.1);

(27) CD22 (N° de acceso en Genbank NP_001762.1);

(28) CD79a (CD79A, CD79α, asociado a inmunoglobulina alfa, una proteína específica de linfocitos B que interactúa covalentemente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie de moléculas de IgM, transduce una señal implicada en la diferenciación de linfocitos B, N° de acceso en Genbank NP_001774.1);

(29) CXCR5 (receptor del linfoma de Burkitt 1, un receptor acoplado a la proteína G que se activa con la quimioquina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y en la defensa humoral, desempeña un papel en la infección por VIH-2 y quizá en el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma, y leucemia, N° de acceso en Genbank NP_001707.1);

(30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula MHC de clase II (antígeno Ia) que se une a péptidos y los presenta a linfocitos T CD4+, N° de acceso en Genbank NP_002111.1);

(31) P2X5 (Canal iónico 5 abierto por el ligando receptor purinérgico P2X, un canal aniónico abierto por ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión y en la neurogénesis sináptica, la deficiencia puede contribuir a la patofisiología de inestabilidad, N° de acceso en Genbank NP_002552.2);

(32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de linfocitos B, Lyb-2, N° de acceso en Genbank NP_001773.1);

(33) LY64 (Antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repetición rica en leucina (LRR), regula la activación y apoptosis de linfocitos B, la pérdida de función está asociada con mayor actividad de la enfermedad en pacientes con lupus sistémico eritematoso, N° de acceso en Genbank NP_005573.1);

(34) FCRH1 (proteína 1 de tipo receptor de Fc,1 supuesto receptor para el dominio Fc de la inmunoglobulina que contiene los dominios similar a Ig de tipo C2 e ITAM, puede tener un papel en la diferenciación de linfocitos B, N° de acceso en Genbank NP_443170.1); o

(35) IRTA2 (Translocación asociada al receptor 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas, un supuesto inmunoreceptor con posibles papeles en el desarrollo y la linfomagénesis de linfocitos B; la desregulación de los genes por translocación se produce en algunas neoplasias de linfocitos B, N° de acceso en Genbank NP_112571.1).

En otro aspecto, el anticuerpo del conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención se une específicamente a un receptor codificado por un gen ErbB2.

En otro aspecto, el anticuerpo del conjugado de anticuerpo-fármaco es un anticuerpo humanizado seleccionado entre huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 (Trastuzumab).

Además, en el presente documento se describe un artículo de fabricación que comprende un compuesto de

conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención; un envase; y un prospecto o etiqueta que indica que el compuesto se puede usar para tratar cáncer caracterizado por la sobreexpresión de un receptor de ErbB2.

Además, en el presente documento se describe un método para el tratamiento de cáncer en un mamífero, el cáncer se caracteriza por la sobreexpresión de un receptor de ErbB2 y no responde, o responde muy poco, al tratamiento con un anticuerpo anti-ErbB2, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención.

En algunos casos, una cantidad básica del resto de fármaco no se escinde del anticuerpo hasta que el compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco entra en una célula con un receptor de superficie celular específico para el anticuerpo del conjugado de anticuerpo-fármaco, y el resto de fármaco se escinde del anticuerpo cuando el conjugado de anticuerpo-fármaco entra en la célula.

En algunos casos, la biodisponibilidad del compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco o un metabolito intracelular del compuesto en un mamífero mejora cuando se compara con un compuesto de fármaco que comprende el resto de fármaco del compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco, o cuando se compara con un análogo del compuesto que no tiene el resto de fármaco.

El resto de fármaco se puede escindir intracelularmente en un mamífero a partir del anticuerpo del compuesto, o un metabolito intracelular del compuesto.

En otro aspecto, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender adicionalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de agente quimioterapéutico tal como un inhibidor de la formación de tubulina, un inhibidor de la topoisomerasa, y un aglutinante de ADN.

Además, en el presente documento se describe un método para eliminar o inhibir la proliferación de células tumorales o de células cancerosas que comprende tratar células tumorales o células cancerosas con una cantidad del compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, que es eficaz para eliminar o inhibir la proliferación de células tumorales o de células cancerosas.

Además, en el presente documento se describe un método para inhibir la proliferación celular que comprende exponer células de mamífero en un medio de cultivo celular a un compuesto de conjugados de fármaco de anticuerpo de la invención, en el que el compuesto de conjugado del fármaco de anticuerpo entra en las células y el fármaco se escinde del resto del compuesto de conjugado del fármaco de anticuerpo; mediante el cual se inhibe la proliferación de las células.

Además, en el presente documento se describe un método para tratar cáncer que comprende administrar a un paciente una formulación de un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Además, en el presente documento se describe un ensayo para detectar células cancerosas que comprende:

- (a) exponer células a un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención; y
- (b) determinar el alcance de unión del compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco con las células.

La invención se entenderá mejor por referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones a modo de ejemplo, tomada de manera conjunta con los dibujos, figuras, y esquemas adjuntos. El análisis que sigue a continuación es descriptivo, ilustrativo y a modo de ejemplo y no se debe considerar como limitante del alcance que se define con cualquiera de las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un ensayo de eficacia, de una sola dosis, *in vivo* de cAC10-mcMMAF en xenoinjertos subcutáneos de Karpas-299 ALCL.

La Figura 2 muestra un ensayo de eficacia, de una sola dosis, *in vivo* de cAC10-mcMMAF en L540cy subcutáneas. Para este estudio había 4 ratones en el grupo sin tratar y 10 en cada uno de los grupos de tratamiento.

Las Figuras 3a y 3b muestran la eficacia *in vivo* de cBR96-mcMMAF en L2987 subcutáneas. Los triángulos que están fuera de la Figura 3a y las flechas en la Figura 3b indican los días de terapia.

Las Figuras 4a y 4b muestran la actividad *in vitro* de conjugados de cAC10-anticuerpo-fármaco frente a líneas celulares CD30⁺.

Las Figuras 5a y 5b muestran la actividad *in vitro* de conjugados de cBR96-anticuerpo-fármaco frente a líneas

celulares Le^{y+}.

Las Figuras 6a y 6b muestran la actividad *in vitro* de conjugados de c1F6-anticuerpo-fármaco frente a líneas celulares de carcinoma de células renales CD70⁺.

La Figura 7 muestra un ensayo de proliferación celular, *in vitro* con células SK-BR-3 tratadas con conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC): -●- Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab, -○- Trastuzumab-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab, y -Δ- Trastuzumab-MC-MMAF, 4,8 MMAF/Ab, medido en Unidades de Fluorescencia Relativa (RLU) frente a concentración en µg/ml de ADC. H = Trastuzumab cuando H se une a través de una cisteína [cys]. La Figura 8 muestra un ensayo de proliferación celular, *in vitro* con células BT-474 tratadas con ADC: -●- Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab, -○- Trastuzumab-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab, y -Δ- Trastuzumab-MC-MMAF, 4,8 MMAF/Ab.

La Figura 9 muestra un ensayo de proliferación celular, *in vitro* con células MCF-7 tratadas con ADC: -●- Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab, -○- Trastuzumab-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3,9 MMAF/Ab, y -Δ- Trastuzumab-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab.

La Figura 10 muestra un ensayo de proliferación celular, *in vitro* con células MDA-MB-468 tratadas con ADC: -●- Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 4,1 MMAE/Ab, -○- Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 3,3 MMAE/Ab, y -Δ- Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3,7 MMAF/Ab.

La Figura 11 muestra un estudio de aclaramiento de la concentración de plasma después de la administración de H-MC-vc-PAB-MMAF-TEG y H-MC-vc-PAB-MMAF a ratas Sprague-Dawley: La dosis administrada fue de 2 mg de ADC por kg de ratas. Las concentraciones de anticuerpo total y de ADC se midieron con el tiempo. (H = Trastuzumab).

La Figura 12 muestra un estudio de aclaramiento de la concentración de plasma después de la administración de H-MC-vc-MMAE a monos Cynomolgus a diferentes dosis: 0,5, 1,5, 2,5, y 3,0 mg/kg administradas el día 1 y el día 21. Las concentraciones de anticuerpo total y de ADC se midieron con el tiempo. (H = Trastuzumab).

La Figura 13 muestra el cambio del volumen tumoral medio con el tiempo en ratones atímicos desnudos con aloinjertos de tumor de Mama MMTV-HER2 Fo5 dosificados el Día 0 con Vehículo, Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE (1250 µg/m²) y Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF (555 µg/m²). (H = Trastuzumab).

La Figura 14 muestra el cambio del volumen tumoral medio con el tiempo en ratones atímicos desnudos con aloinjertos de tumor de Mama MMTV-HER2 Fo5 dosificados el Día 0 con 10 mg/kg (660 µg/m²) de Trastuzumab-MC-MMAE y 1250 µg/m² de Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE.

La Figura 15 muestra el cambio del volumen tumoral medio con el tiempo en ratones atímicos desnudos con aloinjertos de tumor de Mama MMTV-HER2 Fo5 dosificados el Día 0 con Vehículo y 650 µg/m² de trastuzumab-MC-MMAF.

La Figura 16 muestra el cambio del volumen tumoral medio con el tiempo en ratones atímicos desnudos con aloinjertos de tumor de Mama MMTV-HER2 Fo5 dosificados el Día 0 con Vehículo y 350 µg/m² de cuatro conjugados de trastuzumab-MC-MMAF cuando la relación de MMAF/trastuzumab (H) es 2, 4, 5,9 y 6.

La Figura 17 muestra el Cambio medio en el grupo, con barras de error, en pesos corporales de animales (rata) (Media ± DT) después de la administración de Vehículo, trastuzumab-MC-val-cit-MMAF, trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF, trastuzumab-MC-MMAF y trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF.

La Figura 18 muestra el Cambio medio en el grupo en pesos corporales de animales (rata) (Media ± DT) después de la administración de 9,94 mg/kg de H-MC-vc-MMAF, 24,90 mg/kg de H-MC-vc-MMAF, 10,69 mg/kg de H-MC(Me)-vc-PAB-MMAF, 26,78 mg/kg de H-MC (Me)-vc-PAB-MMAF, 10,17 mg/kg de H-MC-MMAF, 25,50 mg/kg de H-MC-MMAF, y 21,85 mg/kg de H-MC-vc-PAB-MMAF. H = trastuzumab. Conector MC se une a través de una cisteína de trastuzumab para cada conjugado.

La Figura 19 muestra el Cambio medio en el grupo, con barras de error, en pesos corporales de rata Sprague Dawley (Media ± DT) después de la administración de trastuzumab (H)-MC-MMAF a dosis de 2105, 3158, y 4210 µg/m². El conector MC se une a través de una cisteína de trastuzumab para cada conjugado.

4. Descripción detallada de las realizaciones a modo de ejemplo

4.1 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

A menos que se indique de otro modo, los siguientes términos y expresiones tal como se usan en el presente documento pretenden tener los siguientes significados:

Quando se usan nombres comerciales en el presente documento, los solicitantes pretenden incluir de forma independiente la formulación del producto del nombre comercial, el fármaco genérico, y el ingrediente o ingredientes farmacéuticos del producto del nombre comercial.

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmune que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico. Descrito en términos de su estructura, un anticuerpo tiene por lo general una proteína con forma de Y que consiste en cuatro cadenas de aminoácidos, dos pesadas y dos ligeras. Cada anticuerpo tiene principalmente dos regiones: una región variable y una región constante. La región variable,

situada en los extremos de los brazos de la Y, se une a e interactúa con el antígeno diana. Esta región variable incluye una región de determinación de la complementariedad (CDR) que reconoce y se une a un sitio de unión específico en un antígeno en particular. La región constante, situada en la cola de la Y, es reconocida por e interactúa con el sistema inmune (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5ª Ed., Garland Publishing, Nueva York). Un antígeno diana generalmente 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.

El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, también se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud total o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud total, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión antígenos que se une de forma inespecífica a un antígeno de una diana de interés o parte de la misma, incluyendo dichas dianas pero no limitadas a, célula o células cancerosas que producen anticuerpos autoinmunes asociados con una enfermedad autoinmune. La inmunoglobulina que se desvela 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 se pueden derivar de cualquier especie. En un aspecto, sin embargo, la inmunoglobulina es de origen humano, murino, o de conejo. En otro aspecto, los anticuerpos son anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de una sola cadena, Fv, fragmentos de Fab, fragmentos de F(ab'), fragmentos de F(ab')₂, fragmentos producidos con una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), CDR, y fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anteriores que se unen de forma inespecífica a antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos.

La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos básicamente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos frente a un solo sitio antigénico. Además, al contrario que las preparaciones de anticuerpo policlonal que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a determinantes diferentes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se pueden sintetizar sin ser contaminados por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo tal como si se obtuviera a partir de una población de anticuerpos básicamente homogéneos, y no se debe interpretar como que se necesite la producción del anticuerpo mediante cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar con el método del hibridoma descrito primero por Kohler et al. (1975) *Nature* 256: 495, o se pueden preparar con métodos de ADN recombinante (véase, Patente de Estados Unidos N° 4816567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de fagotecas de anticuerpos usando las técnicas que se describen, por ejemplo, en Clackson et al. (1991) *Nature*, 352: 624-628 y Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597.

En el presente documento, los anticuerpos monoclonales incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos N° 4816567; y Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855).

Se han usado diversos métodos para producir anticuerpos monoclonales (MAb). La tecnología del hibridoma, que se refiere a una línea celular clonada que produce un solo tipo de anticuerpo, usa las células de diversas especies, incluyendo ratones (murino), hámsters, ratas, y seres humanos. Otro método para preparar los MAb usa ingeniería genética que incluye técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales preparados a partir de estas técnicas incluyen, entre otros, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Un anticuerpo quimérico combina regiones de codificación del ADN a partir de más de un tipo de especie. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede proceder de la región variable de un ratón y la región constante de un ser humano. Un anticuerpo humanizado procede predominantemente de un ser humano, incluso aunque contenga porciones no humanas. Al igual que un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado puede contener una región constante totalmente humana. Pero a diferencia de un anticuerpo quimérico, la región variable puede proceder parcialmente de un ser humano. Las porciones sintéticas, no humanas de un anticuerpo humanizado a menudo provienen de las CDR en anticuerpos de murino. En cualquier caso, estas regiones son cruciales para permitir que el anticuerpo reconozca y se una a un antígeno específico.

Tal como se ha indicado, se pueden usar anticuerpos de murino. Aunque son útiles para diagnóstico y terapias a corto plazo, los anticuerpos de murino no se pueden administrar a personas a largo plazo sin aumentar el riesgo de una respuesta inmunogénica perjudicial. Esta respuesta, denominada Anticuerpo Anti-Ratón Humano (HAMA), se produce cuando un sistema inmune humano reconoce el anticuerpo de murino como extraño y lo ataca. Una respuesta HAMA shock tóxico o incluso la muerte.

Los anticuerpos quiméricos y humanizados reducen la probabilidad de una respuesta HAMA al minimizar las porciones no humanas de anticuerpos administrados. Además, los anticuerpos quiméricos y humanizados tienen el beneficio adicional de activar respuestas inmunes humanas secundarias, tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

"Fragmentos de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión al antígeno o variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos de Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas anticuerpo de una sola cadena; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de un fragmento o fragmentos de anticuerpo.

Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden dominios constantes de secuencia nativa (*por ejemplo*, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variante de secuencia de aminoácidos de los mismos.

El anticuerpo intacto puede tener una o más "funciones efectuadas" que se refieren a las actividades biológicas que se pueden atribuir a la región Fc (una región Fc de secuencia narrativa o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen unión a C1q; citotoxicidad y pendiente de complementos; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de la superficie celular (*por ejemplo*, receptor de linfocitos B; BCR), etc.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, se pueden asignar anticuerpos intactos a diferentes "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de éstas se pueden dividir adicionalmente en "subclases" (isotipos), *por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Se conocen bien estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas.

Las expresiones "ErbB2" y "HER2" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a proteína HER2 humana que se describe, por ejemplo, en Semba et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 6497-6501 (1985) e Yamamoto et al., (1986) Nature, 319: 230-234 (número de acceso en Genbank X03363). El término "erbB2" se refiere al gen que codifica ErbB2 humano y "neu" se refiere al gen que codifica p185neu de rata. ErbB2 preferente es ErbB2 humano de secuencia nativa.

En el mercado están disponibles anticuerpos para receptores ErbB a partir de un número de fuentes, que incluyen, por ejemplo, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA.

Por "ligando ErbB" se hace referencia a un polipéptido que se une a y/o activa un receptor ErbB. El ligando ErbB puede ser un ligando ErbB humano de secuencia narrativa tal como factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Savage et al. (1972) J. Biol. Chem., 247:7612-7621); factor de crecimiento de transformación alfa (TGF- α) (Marquardt et al. (1984) Science 223: 1079-1082); anfiregulina también conocida como factor de crecimiento autocrino de schwannoma o de queratinocitos (Shoyab et al. (1989) Science 243: 1074-1076; Kimura et al., Nature, 348: 257-260 (1990); y Cook et al., Mol. Cell. Biol., 11:2547-2557 (1991)); betacelulina (Shing et al., Science, 259: 1604-1607 (1993); y Sasada et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 190: 1173 (1993)); factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) (Higashiyama et al., Science, 251: 936-939 (1991)); epiregulina (Toyoda et al., J. Biol. Chem., 270: 7495-7500 (1995); y Komurasaki et al., Oncogene, 15: 2841-2848 (1997)); una heregulina (véase a continuación); neuregulina-2 (NRG-2) (Carraway et al., Nature, 387: 512-516 (1997)); neuregulina-3 (NRG-3) (Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 94: 9562-9567 (1997)); neuregulina-4 (NRG-4) (Harari et al., Oncogene, 18: 2681-89 (1999)) o cripto (CR-1) (Kannan et al., J. Biol. Chem., 272 (6): 3330-3335 (1997)). Ligandos ErbB que se unen a EGFR incluyen EGF, TGF- α , anfiregulina, betacelulina, HB-EGF y epiregulina. Ligandos ErbB que se unen a ErbB3 incluyen heregulinas. Ligandos ErbB capaces de unirse a ErbB4 incluyen betacelulina, epiregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 y heregulinas. El ligando ErbB también puede ser un ligando ErbB sintético. El ligando sintético puede ser específico para un receptor ErbB en particular, o puede reconocer complejos de receptor ErbB en particular. Un ejemplo de un ligando sintético es la biregulina quimera de heregulina/EGF sintética (véase, por ejemplo, Jones et al., (1999) FEBS Letters, 447: 227-231, que se incorpora por referencia).

"Heregulina" (HRG) se refiere a un polipéptido codificado por el producto genético de heregulina tal como se desvela en la Patente de Estados Unidos N° 5641869 o en Marchionni et al., Nature, 362: 312-318 (1993). Ejemplos de heregulinas incluyen heregulina- α , heregulina- β 1, heregulina- β 2 y heregulina- β 3 (Holmes et al., Science, 256: 1205-1210 (1992); y Patente de Estados Unidos N° 5641869); factor de diferenciación neu (NDF) (Peles et al., Cell 69: 205-216 (1992)); actividad de inducción de receptores de acetilcolina (ARIA) (Falls et al. (1993) Cell 72: 801-815); factores de crecimiento glial (GGF) (Marchionni et al., Nature, 362: 312-318 (1993)); factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF) (Ho et al., J. Biol. Chem., 270: 14523-14532 (1995)); γ -heregulina (Schaefer et al.,

Oncogene, 15: 1385-1394 (1997)). El término incluye fragmentos biológicamente activos y/o variantes de secuencias de aminoácidos de un polipéptido HRG de secuencia nativa, tal como un fragmento de dominio de tipo EGF de los mismos (*por ejemplo*, HRGβ1177-244).

El "hetero-oligómero de ErbB" es un oligómero asociado de forma no covalente que comprende al menos dos receptores ErbB diferentes. Un "dímero de ErbB" es un oligómero asociado de forma no covalente que comprende dos receptores ErbB diferentes. Dichos complejos se pueden formar cuando una célula que expresa dos o más receptores ErbB se expone a un ligando ErbB. Oligómeros de ErbB, tales como dímeros de ErbB, se pueden aislar por inmunoprecipitación y analizar por SDS-PAGE tal como se describe, *por ejemplo*, en Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269 (20): 14661-14665 (1994). Ejemplos de dichos hetero-oligómeros de ErbB incluyen complejos EGFR-ErbB2 (también denominado HER1/HER2), ErbB2-ErbB3 (HER2/HER3) y ErbB3-ErbB4 (HER3/HER4). Además, el ErbB hetero-oligómero puede comprender dos o más receptores ErbB2 combinados con un receptor ErbB diferente, tal como ErbB3, ErbB4 o EGFR (ErbB1). Otras proteínas, tales como una subunidad receptora de citoquinas (*por ejemplo*, gp130) se pueden incluir en el hetero-oligómero.

Un polipéptido de "secuencia nativa" es uno que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido, *por ejemplo*, receptor de antígeno asociado a tumores, procedente de la naturaleza. Dichos polipéptidos de secuencia narrativa se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir por medios recombinantes o sintéticos. Por lo tanto, un polipéptido de secuencia narrativa puede tener la secuencia de aminoácidos de polipéptido humanos de origen natural, polipéptido de murino, o polipéptido a partir de cualquier otra especie de mamífero.

La expresión "variante de secuencia de aminoácidos" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren hasta cierto punto de un polipéptido de secuencia nativa. Habitualmente, las variantes de secuencias de aminoácidos poseerán al menos una homología de aproximadamente un 70 % con al menos un dominio de unión a receptores de un ligando nativo, o con al menos un dominio de unión ligandos de un receptor nativo, tal como un antígeno asociado a tumores, y preferentemente, serán homólogos en al menos aproximadamente un 80 %, más preferentemente, al menos aproximadamente un 90 % con dichos dominios de unión a receptores o a ligandos. Las variaciones secuencias de aminoácidos poseen sustituciones, supresiones, y/o inserciones en determinadas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa.

La "identidad de secuencia" se define como el porcentaje de restos en la variante de la secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia. En la técnica se conocen bien métodos y programas de ordenador para el alineamiento. Uno de dichos programas de ordenador es "Align 2", creado por Genentech, Inc., que se presentó con documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991.

"Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (*por ejemplo*, linfocitos Citolíticos Naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la celular diana. Las células primarias para mediar ADCC, linfocitos NK, expresan solamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, (1991) Annu. Rev. Immunol, 9: 457-92. Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el que se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5500362 o Nº 5821337. Células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos Citolíticos Naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, *por ejemplo*, en un modelo animal tal como el que se desvela en Clynes et al., Prco. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 652-656 (1998).

Los términos "receptor Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferente es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gama) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y formas empalmadas alternativamente de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares y difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de las mismas. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptora (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunoreceptora (ITIM) en su dominio citoplasmático. (Véase revisión M. in Daéron, Annu. Rev. Immunol., 15: 203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9: 457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods, 4: 25-34 (1994); y de Haas et al., J. Lab. Clin. Med., 126: 330-41 (1995). Otros FcR, que incluyen los que se van a identificar en el futuro, están incluidos con el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto. (Guyer et al., J. Immunol., 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol., 24:249 (1994)).

"Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula para lisar una diana más en presencia de complemento. La ruta de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema complemento (C1q) a una molécula (*por ejemplo*, un anticuerpo) formando complejo con un antígeno semejante. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, *por ejemplo*, tal como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996).

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren extensamente en la secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo en particular para su antígeno en particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de dominios variables se denominan regiones marco (FR). Cada uno de los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprende cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración en lámina β , conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura en lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen en conjunto en proximidad cercana mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos (véase Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª 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 participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

La expresión "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende generalmente restos de aminoácidos de una "región de determinación de la complementariedad" o "CDR" (*por ejemplo*, los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al. mencionado anteriormente*) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (*por ejemplo*, los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chotia y Lesk (1987) J. Mol. Biol., 196: 901-917). Los restos de la "Región Marco" o "FR" son los restos de dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable tal como se define en el presente documento.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento de "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de unión a antígeno y que además es capaz de reticular antígenos.

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

El fragmento de Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos de Fab' de diferencia de los fragmentos de Fab mediante la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi del dominio CH1 de cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. El presente documento, Fab'-SH es la denominación para Fab' en la que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes soportan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se producían originalmente como pares de fragmentos de Fab' que tienen cisternas bisagra entre ellos. Además, se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

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

Fragmentos de anticuerpo "Fv de una sola cadena" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido de Fv comprende adicionalmente un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígenos. Para una revisión de scFv, véase Plückthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere un fragmento pequeño de anticuerpos con dos sitios de unión a antígenos, fragmentos que comprenden un dominio pesado variable (VH) conectado a un dominio ligero variable (VL) en la

misma cadena de polipéptidos (VH - VL). Mediante el uso de un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígenos. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en el documento EP 404.097; en el documento WO 93/11161; y Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (*por ejemplo*, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan con restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate lo humano que tienen la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos casos, restos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan con restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá básicamente todos de al menos uno, y por lo general todos, dominios variables, en los que todos o básicamente todos los bucles hipervariables corresponden con los de una inmunoglobulina no humana y todas o básicamente todas los de las FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), por lo general la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones et al. (1986) Nature, 321: 522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332: 323-329; y Presta, (1992) Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596.

Anticuerpos anti-ErbB2 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) tal como se describe en la Tabla 3 de la Patente de Estados Unidos N° 5821337 que se incorpora expresamente en el presente documento por referencia; 520C9 humanizado (documento WO 93/21319) y anticuerpos 2C4 humanizados tal como los que se describen a continuación en el presente documento.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros absolutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferentes, el anticuerpo estará purificado (1) hasta más de un 95 % en peso del anticuerpo tal como se determina con el método de Lowry, y lo más preferentemente más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencias de aminoácidos N-terminales o internos mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta homogeneidad por 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 dado 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.

Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de intereses uno capaz de unirse a ese antígeno con una afinidad suficiente de modo que el anticuerpo es útil para dirigirse a una célula que expresa el antígeno.

Un anticuerpo que "induce apoptosis" es una que induce muerte celular programada tal como se determina mediante unión de anexina V, fragmentación del ADN, encogimiento celular, dilatación del retículo endoplasmático, fragmentación celular, y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). Las células una célula tumoral, *por ejemplo*, una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, pancreática o de vejiga. Diversos métodos están disponibles para evaluar los sucesos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de la fosfatidil serina (PS) se puede medir mediante unión de anexina; la fragmentación del ADN se puede evaluar a través de marcado del ADN; y la condensación nuclear/cromatina junto con la fragmentación del ADN se puede evaluar mediante cualquier aumento de células hipodiploides.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento de la presente invención. Éste incluye trastornos o enfermedades, crónicos y agudos, que incluyen las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en el presente documento incluyen tumores benignos y malignos; leucemia y neoplasias linfoides, en particular cáncer mama, ovarios, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, pancreático, cáncer de próstata o vejiga; trastornos neuronales, gliales, astrocíticos, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocóelicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz el fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (*es decir*, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (*es decir*, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) metástasis tumorales; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento

tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en la que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o eliminación de las células cancerosas existentes, éste puede ser citostático y/o citotóxico. Para el tratamiento del cáncer, la eficacia, por ejemplo, se puede medir por evaluación del tiempo de progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinar la velocidad de respuesta (RR).

5 La expresión "cantidad básica" se refiere a una mayoría, es decir > 50 % de una población, de una colección o de una muestra.

10 La expresión "metabolito intracelular" se refiere a un compuesto que resulta de un proceso metabólico o de una reacción dentro de una célula en un conjugado de fármaco de anticuerpo (ADC). El proceso metabólico o la reacción de ser un proceso enzimático tal como escisión proteolítica y un conector etílico del ADC, o hidrólisis de un grupo funcional tal como una hidrazona, éster, o amida. Los metabolitos intracelulares incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y fármacos libres que han experimentado escisión intracelular después de entrada, difusión, absorción o transporte en una célula.

15 Las expresiones "escindido intercelularmente" y "escisión intracelular" se refieren a un proceso metabólico o reacción dentro de la célula en un Conjugado de Fármaco-Ligando, un Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando, un conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC) o similares a través de los cuales la unión covalente, *por ejemplo*, el conector, entre el resto de fármaco (D) y el anticuerpo (Ab) se rompe, dando como resultado el fármaco libre disociado a partir del anticuerpo dentro de la célula. Los restos escindidos del Conjugado de Fármaco-Ligando, un Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando o ADC son por lo tanto metabolitos intracelulares.

20 El término "biodisponibilidad" se refiere a la disponibilidad sistémica (es decir, niveles en sangre/plasma) de una cantidad cada de fármaco administrada a un paciente. La biodisponibilidad es un término absoluto que indica la medida tanto del tiempo (velocidad) como de la cantidad total (alcance) de fármaco que alcanza la circulación general de una forma de fármaco administrada.

25 La expresión "actividad citotóxica" se refiere a un efecto de eliminación de células, citostático o antiproliferación de un compuesto de conjugado de fármaco de anticuerpo o un metabolito intracelular de un compuesto de conjugado de fármaco de anticuerpo. La actividad citotóxica se puede expresar como el valor de CI_{50} que es la concentración (molar o másica) por unidad de volumen a la que sobreviven la mitad de las células.

30 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que por lo general se caracteriza por un crecimiento celular sin regular. Un "tumor" comprender una o mas células cancerosas. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o neoplasias linfoides. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (*por ejemplo*, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas ("NSCLC"), adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye

35 cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello del útero, cáncer de ovarios, 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 salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma del pene, así como cáncer de cabeza y

40

45

Un "cáncer que expresa ErbB" es uno que produce niveles suficientes de ErbB2 en la superficie de células del mismo, de modo que un anticuerpo anti-ErbB2 se puede unir al mismo y puede tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer.

50 Un cáncer "caracterizado por una activación excesiva" de un receptor ErbB2 es uno en el que la extensión de la activación del receptor ErbB2 en células cancerosas supera significativamente el nivel de activación de ese receptor en células no cancerosas del mismo tipo de tejido. Dicha activación excesiva puede dar como resultado una sobreexpresión del receptor ErbB2 y/o niveles superiores a los normales de un ligando ErbB2 disponible para la activación del receptor ErbB2 en las células cancerosas. Dicha activación excesiva puede provocar y/o ser

55 provocada por un estado maligno de una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el cáncer estará sometido a un ensayo de diagnóstico o de pronóstico para determinar si se está produciendo una amplificación y/o sobreexpresión de un receptor ErbB2 lo que da como resultado dicha activación excesiva del receptor ErbB2. Como alternativa, o adicionalmente, el cáncer se puede someter a un ensayo de diagnóstico o de pronóstico para determinar si se está produciendo una amplificación y/o sobreexpresión de un ligando ErbB2 en el cáncer que se atribuye a una activación

60 excesiva del receptor. En un subconjunto de dichos cánceres, una activación excesiva del receptor puede dar como resultado una ruta de estimulación autocrina.

Un cáncer que "sobreexpresa" un receptor ErbB2 es uno que tiene niveles significativamente más elevados de un receptor ErbB2 en la superficie celular del mismo, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tejido.

65 Dicha sobreexpresión se puede y por amplificación genética o por transcripción o traducción aumentada. La sobreexpresión del receptor ErbB2 se puede determinar en un ensayo de diagnóstico o de pronóstico mediante la

evaluación de mayores niveles de la proteína ErbB2 presente en la superficie de una célula (*por ejemplo*, mediante un ensayo inmunohistoquímico; IHC). Como alternativa, o adicionalmente, se pueden medir niveles de ácidos nucleicos que codifican ErbB2 en la célula, *por ejemplo*, mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH; véase el documento WO 98/45479), transferencia de southern, o técnicas reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). La sobreexpresión del ligando ErbB2, se puede determinar de forma diagnóstica evaluando los niveles del ligando (o ácido nucleico que los codifica) en el paciente, *por ejemplo*, en una biopsia de tumor o mediante diversos ensayos de diagnóstico tales como los ensayos de IHC, FISH, transferencia de southern, PCR o *in vivo* que se han descrito anteriormente. Además se puede estudiar la sobreexpresión del receptor ErbB2 midiendo el antígeno desprendido (*por ejemplo*, dominio extracelular de ErbB2) en un fluido biológico tal como suero (véase, *por ejemplo*, Patente de Estados Unidos N° 4933294; documento WO 91/05264; Patente de Estados Unidos N° 5401638; y Sias et al., (1990) J. Immunol. Methods, 132: 73-80). Aparte de los ensayos que se han mencionado anteriormente, otros diversos ensayos *in vivo* assays están disponibles para el experto en la materia. Por ejemplo, se pueden exponer células dentro del organismo del paciente a un anticuerpo que opcionalmente está marcado con una marca detectable, *por ejemplo*, un isótopo radiactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a células en el paciente, *por ejemplo*, mediante exploración externa de radiactividad o por análisis de una biopsia tomada de un paciente expuesto previamente al anticuerpo.

Los tumores que sobreexpresan HER2 se clasifican mediante puntuaciones inmunohistoquímicas que corresponden al número de copias de moléculas de HER2 expresadas por célula, y se pueden determinar de forma bioquímica: 0 = 0-10,000 copias/célula, 1+ = al menos aproximadamente 200.000 copias/célula, 2+ = al menos aproximadamente 500.000 copias/célula, 3+ = aproximadamente $1-2 \times 10^6$ copias/célula. La sobreexpresión de HER2 en el nivel 3+, que conduce a la activación independiente de ligamentos de la tirosina quinasa (Hudziak et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7159-7163), se produce en aproximadamente un 30 % de los cánceres de mama, y en estos pacientes, disminuye la supervivencia sin recaída o toda la supervivencia (Slamon et al., (1989) Science, 244: 707-712; Slamon et al., (1987) Science, 235: 177-182).

Por el contrario, a un cáncer que "no se puede caracterizar mediante sobreexpresión del receptor ErbB2" es uno que, en un ensayo de diagnóstico, no expresa niveles más elevados que los normales de receptor ErbB2 en comparación con células no cancerosas del mismo tipo de tejido.

La expresión "agente citotóxico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de células y/o causa la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (*por ejemplo*, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{60}Co , e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, que incluyen análogos y derivados de las mismas. En un aspecto, la expresión no pretende incluir isótopos radiactivos.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes de alquilación tales como tiotepa y ciclosfosfamida CYTOXAN®; alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocina, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; TLK 286 (TELICYTA™); acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (que incluye el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; callistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (que incluyen los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; bisfosfonatos, tales como clodronato; antibióticos tales como los antibióticos de enedina (*por ejemplo*, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina omega11 (véase, *por ejemplo*, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)) y antraciclina tales como annamicina, AD 32, alcarubicina, daunorubicina, dextrazoxano, DX-52-1, epirubicina, GPX-100, idarubicina, KRN5500, menogarilo, dinemicina, que incluye dinemicina A, una esperamicina, cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos relacionados de antibiótico de enedina cromoproteínas, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (que incluye morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, liposomal doxorubicina, y desoxidoxorubicina), esorubicin, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodotrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, y zorubicina; análogos de ácido fólico tales como denopterina, pteropterina, y trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, y tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, encitabina, y floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, y testolactona; antiadrenales tales como

aminoglutetimida, mitotano, y trilostano; reforzadores de ácido fólico tales como ácido folínico (leucovorina); aceglatona; agentes antineoplásicos de antifolato tales como ALIMTA®, LY231514 pemetrexed, inhibidores de la dihidrofolato reductasa tales como metotrexato, antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo (5-FU) y sus profármacos tales como UFT, S-1 y capecitabina, y inhibidores de la timidilato sintasa e inhibidores de la glicinamida ribonucleótido formiltransferasa tales como raltitrexed (TOMUDEX^{RM}, TDX); inhibidores de la dihidropirimidina deshidrogenasa tales como eniluracilo; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxíurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansine y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides y taxano, *por ejemplo*, TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANETM sin Cremophor, formulación de nanopartículas modificadas por ingeniería con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y TAXOTERE® doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; platino; análogos de platino o análogos a base de platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); alcaloides de la vinca; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; RFS 2000 inhibidor de la topoisomerasa; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los mencionados anteriormente; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) combinado con 5-FU y leucovorina.

Además, en esta definición se incluyen agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas en tumores tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (que incluye tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® toremifeno; inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, FEMARA® letrozol, y anastrozol ARIMIDEX®; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); Oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en proliferación celular anómala, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacunas para terapia genética, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los mencionados anteriormente.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "fármaco dirigido a EGFR" se refiere a un agente terapéutico que se une a EGFR y, opcionalmente, inhibe la activación de EGFR. Ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Ejemplos científicos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (Nº CRL HB 8506 de la ATCC), MAb 455 (Nº CRL HB8507 de la ATCC), MAb 225 (Nº CRL 8508 de la ATCC), MAb 528 (Nº CRL 8509 de la ATCC) (véase, Patente de Estados Unidos Nº 4943533, Mendelsohn et al.) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBITUX®) y 225 humano reconfigurado (H225) (véase, documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo II (Patente de Estados Unidos Nº 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR tal como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5891996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales como ABX-EGF (véase el documento WO 98/50433, Abgenix). El anticuerpo anti-EGFR se puede conjugar con un agente citotóxico, generando de este modo un inmunoconjugado (véase, *por ejemplo*, el documento EP 659.439A2, Merck Patent GmbH). Ejemplos de moléculas pequeñas que se unen a EGFR incluyen ZD1839 o Gefitinib (IRESSATM; Astra Zeneca), Erlotinib HCl (CP-358774, TARCEVATM; Genentech/OSI) y AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen).

Un "inhibidor de la tirosina quinasa" es una molécula que inhibe hasta cierto punto la actividad de tirosina quinasa de una tirosina quinasa como un receptor ErbB. Ejemplos de dichos inhibidores incluyen los fármacos dirigidos a EGFR indicados en el párrafo precedente así como quinazolininas tales como PD 153035, 4-(3-cloroanilino) quinazolinina, piridopirimidinas, pirimidopirimidinas, pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706, y pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidinas, curcumina (diferulolil metano, 4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalimida), tirfostinas que contienen restos de nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas antisentido (*por ejemplo*, las que se unen a ácidos nucleicos que codifican ErbB); quinoxalinas (Patente de Estados Unidos Nº 5.804.396); tirfostinas (Patente de Estados Unidos Nº 5804396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores de pan-ErbB tales como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de Imatinib (Gleevec; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth);

Semaxanib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); o tal como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: Patente de Estados Unidos N° 5804396; documento WO 99/09016 (American Cyanamid); documento WO 98/43960 (American Cyanamid); documento WO 97/38983 (Warner Lambert); documento WO 99/06378 (Warner Lambert); documento WO 99/06396 (Warner Lambert); documento WO 96/30347 (Pfizer, Inc); documento WO 96/33978 (Zeneca); documento WO 96/3397 (Zeneca); y documento WO 96/33980 (Zeneca).

Un "agente antiangiogénico" se refiere a un compuesto que bloquea, o interfiere con, hasta cierto punto, el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor antiangiogénico, por ejemplo, puede ser una molécula pequeña o anticuerpo que se une a un factor de crecimiento o a un receptor del factor de crecimiento implicado en la estimulación de la angiogénesis. En una realización, el factor antiangiogénico es un anticuerpo que se une al Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF).

El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por la población celular que actúan sobre otras células como mediadores intercelulares. Ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas politécnicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas de crecimiento tales como hormona de crecimiento humano, hormona de crecimiento humano N-metionilo, y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteicas tales como hormona de estimulante de folículos (FSH), hormona estimulante de tiroides (TSH), y hormona luteinizante (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 de plaquetas; factores de crecimiento de transformación (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento de tipo insulínico I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón- α , - β , and - γ ; factores de estimulación 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-10, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando kit (KL). Tal como se usa en el presente documento, el término citoquina incluye proteínas a partir de fuentes naturales o a partir de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

El término "profármaco" tal como se usa en la presente solicitud se refiere a un precursor o forma de derivados de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco precursor y destapar de ser activada o convertida de forma enzimática o hidrolítica en la forma precursora más activa. véanse, *por ejemplo*, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, páginas 375-382, 615^o Meeting Belfast (1986) y Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), páginas 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco sin citotóxicos más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivatizar en una forma de profármaco para uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los agentes quimioterapéuticos que se han descrito anteriormente.

Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para administrar un fármaco (tal como se incluyen los anticuerpos anti-CD30, CD40, CD70 o Lewis Y y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico) a un mamífero. Los componentes del liposoma se colocan normalmente en una formación de bicapa, similar a la colocación lipídica de membranas biológicas.

El término "prospecto" se usa para hacer referencia a instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

Una molécula "aislada" de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa a partir de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en la fuente natural de ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula aislada de ácido nucleico es distinta en la forma o configuración en la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas aisladas de ácido nucleico se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe en células naturales. Sin embargo, una molécula aislada de ácido nucleico incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el anticuerpo cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico esta en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación unida operativamente en un organismo huésped en particular. Las secuencias de control que son

adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosomas. Se sabe que las células eucariotas usan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una secuencia previa o directora de secreción está unido operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como una proteína previa que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está unido operativamente a una secuencia de codificación si está colocado de modo que se facilite la traducción. Generalmente, "unido operativamente" Server las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas, y, en el caso de una directora de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La unión se puede realizar por ligadura en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos se pueden usar de acuerdo con la práctica convencional.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas las denominaciones incluyen progenie. Por lo tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y cultivos derivados de las mismas sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie pues de no ser exactamente idéntica en el contenido del ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica tal como se identifica sistemáticamente en la célula transformada originalmente. Siempre que se pretenden denominaciones distintas, éstas serán evidentes a partir del contexto.

En el presente documento, una "enfermedad autoinmune" es una enfermedad o trastorno que se deriva de y que se dirige frente a tejidos propios de un individuo o un cosegregado o manifestación de la misma o afección resultante de la misma. Ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunes incluyen, pero no se limitan a artritis (artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriática, y espondilitis anquilosante), psoriasis, dermatitis que incluye dermatitis atópica; urticaria idiopática crónica, que incluye urticaria autoinmune crónica, polimiositis/dermatomiositis, necrólisis epidérmica tóxica, esclerodermia sistémica y esclerosis, respuestas asociadas con enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), e IBD con cosegregado de pioderma gangrenoso, eritema nodoso, colangitis esclerosante primaria, y/o epiescleritis), síndrome de dificultad respiratoria, que incluye síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS), meningitis, enfermedades mediadas por IgE tales como anafilaxis y rinitis alérgica, encefalitis tales como encefalitis de Rasmussen, uveítis, colitis tal como colitis microscópica y colitis colágena, glomerulonefritis (GN) tal como GN membranosa, GN membranosa idiopática, GN membranosa proliferativa (MPGN), que incluye Tipo I y Tipo II, y GN rápidamente progresiva, afecciones alérgicas, ecema, asma, afecciones que implican infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas, aterosclerosis, miocarditis autoinmune, deficiencia de adhesión de leucocitos, lupus sistémico eritematoso (SLE) tal como SLE cutáneo, lupus (que incluye nefritis, cerebritis, pediátrica, no renal, discoide, alopecia), diabetes de inicio juvenil, esclerosis múltiple (MS) tal como MS espino-óptica, encefalomielitis alérgica, respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citoquinas y por linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis que incluye granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitis (incluyendo vasculitis de Vasos Grandes (que incluye Polimialgia Reumática y Arteritis de Células Gigantes (de Takayasu)), vasculitis de Vasos Medios (que incluye Enfermedad de Kawasaki y Poliarteritis Nodosa), vasculitis del SCN, y vasculitis asociada a ANCA, tales como vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS)), anemia aplásica, anemia positiva de Coombs, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica inmune que incluye anemia hemolítica autoinmune (AIHA), anemia perniciosa, aplasia pura de glóbulos rojos (PRCA), deficiencia del Factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmune, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapedesis de leucocitos, trastornos inflamatorios del SCN, síndrome de disfunción orgánica múltiple, miastenia gravis, enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípido, neuritis alérgica, enfermedad de Bechet, síndrome de Castleman, Síndrome de Goodpasture, Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjorgen, síndrome de Stevens-Johnson, rechazo al trasplante de órganos sólidos (que incluye tratamiento previo para títulos de anticuerpos de panel reactivo alto, depósito de IgA en tejidos, y rechazo que surge del trasplante renal, trasplante de hígado, trasplante de intestino, trasplante de corazón, etc.), enfermedad de injerto frente a huésped (GVHD), penfigoide bulloso, pénfigo (que incluye pénfigo vulgaris, foliáceo, y penfigoide de la membrana mucosa), poliendocrinopatías autoinmunes, enfermedad de Reiter, síndrome del hombre rígido, nefritis por complejos inmunes, polineuropatías de IgM o neuropatía mediada por IgM, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia (como la desarrollada por pacientes con infarto de miocardio, por ejemplo), que incluye trombocitopenia autoinmune, enfermedad autoinmune de los testículos y ovarios que incluye orquitis y ooforitis, hipotiroidismo primario; enfermedad endocrina autoinmunes que incluye tiroiditis autoinmune, tiroiditis crónica (Tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares autoinmunes (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), diabetes de Tipo I también denominada diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), que incluye IDDM pediátrica, y síndrome de Sheehan; hepatitis autoinmune, neumonitis intersticial Linfoide (HIV), bronquiolitis obliterante (no trasplante) frente a NSIP, Síndrome de Guillain-Barré, Enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), cirrosis biliar primaria, esprúe celíaco (enteropatía por gluten), esprúe refractario con dermatitis herpetiforme

cosegregada, crioglobulinemia, esclerosis lateral amiotrófica (ALS; enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad arterial coronaria, enfermedad autoinmune del oído interno (AIED), pérdida de audición autoinmune, síndrome de opsoclon mioclono (OMS), policondritis tal como policondritis refractaria, proteinosis alveolar pulmonar, amiloidosis, hepatitis de células gigantes, escleritis, gammopatía monoclonal de significado incierto/desconocido (MGUS), neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, canalopatías tales como epilepsia, migraña, arritmia, trastornos musculares, sordera, severa, parálisis periódica, y canalopatías del SCN; autismo, miopatía inflamatoria, y glomeruloesclerosis segmentaria focal (FSGS).

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

"Alquenilo" es hidrocarburo C_2-C_{18} que contiene átomos de carbono, normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir un doble enlace sp^2 , carbon-carbono. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: etileno ($-CH=CH_2$), alilo ($-CH_2CH=CH_2$), ciclopentenilo ($-C_5H_7$), y 5-hexenilo ($-CH_2CH_2CH_2CH=CH_2$).

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

"Alquileno" se refiere un radical hidrocarburo saturado, de cadena ramificada o lineal o cíclico de 1-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros de radical monovalente que se obtiene por la retirada de dos átomos de hidrógeno a partir del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alcano precursor. Los radicales alquileno habituales incluyen, pero no se limitan a: metileno ($-CH_2-$), 1,2-etilo ($-CH_2CH_2-$), 1,3-propilo ($-CH_2CH_2CH_2-$), 1,4-butilo ($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$), y similares.

"Alquenileno" se refiere a un radical hidrocarburo insaturado, de cadena ramificada o lineal o cíclico de 2-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros de radical monovalente que se obtiene por la retirada de dos átomos de hidrógeno a partir del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alqueno precursor. Los radicales alquenileno habituales incluyen, pero no se limitan a: 1,2-etileno ($-CH=CH-$).

"Alquinileno" se refiere a un radical hidrocarburo insaturado, de cadena ramificada o lineal o cíclico de 2-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros de radical monovalente que se obtiene por la retirada de dos átomos de hidrógeno a partir del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alquino precursor. Los radicales alquinileno habituales incluyen, pero no se limitan a: acetileno ($-C\equiv C-$), propargilo ($-CH_2C\equiv C-$), y 4-pentinilo ($-CH_2CH_2CH_2C\equiv CH-$).

"Arilo" significa un radical hidrocarburo aromático monovalente de 6-20 átomos de carbono que se obtiene por la retirada de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillo aromático precursor. Algunos grupos arilo se representan en las estructuras a modo de ejemplo como "Ar". Los grupos arilo habituales incluyen, pero no se limitan a, radicales derivados de benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo, y similares.

"Arilalquilo" se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unido a un átomo de carbono, por lo general un átomo de carbono terminal o sp^3 , está reemplazado con un radical arilo. Los grupos arilalquilo habituales incluyen, pero no se limitan a, bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-il y similares. El grupo arilalquilo comprende de 6 a 20 átomos de carbono, *por ejemplo*, el resto alquilo, que incluye grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del grupo arilalquilo es de 1 a 6 átomos de carbono y el resto arilo este 5 a 14 átomos de carbono.

"Heteroarilalquilo" se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unido a un átomo de carbono, por lo general un átomo de carbono terminal o sp^3 , está reemplazado con un radical heteroarilo. Los grupos heteroarilalquilo habituales incluyen, pero no se limitan a, 2-benzoimidazolilmetilo, 2-furiletilo, y similares. El grupo heteroarilalquilo comprende de 6 a 20 átomos de carbono, *por ejemplo*, el resto alquilo, que incluye grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del grupo heteroarilalquilo es de 1 a 6 átomos de carbono y el resto heteroarilo es de 5 a 14 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S. El resto heteroarilo del grupo heteroarilalquilo puede ser un monociclo que tiene de 3 a 7 miembros en el anillo (de 2 a 6 átomos de carbono o un biciclo que tiene de 7 a 10 miembros en el anillo (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos

seleccionados entre N, O, P, y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6].

"Alquilo sustituido", "arilo sustituido", y "arilalquilo sustituido" se refieren a alquilo, arilo, y arilalquilo respectivamente, en el que uno o más átomos de hidrógeno cada uno está reemplazado independientemente con un sustituyente. Los sustituyentes habituales incluyen, pero no se limitan a, -X, -R, -O⁻, -OR, -SR, -S⁻, -NR₂, -NR₃, =NR, -CX₃, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, NC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR₂, -SO₃⁻, -SO₃H, -S(=O)₂R, -OS(=O)₂OR, -S(=O)₂NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)₂, -P(=O)(OR)₂, -PO₃⁻, -PO₃H₂, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO₂R, -CO₂⁻, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR₂, -C(=S)NR₂, -C(=NR)NR₂, en los que cada X es independientemente un halógeno: F, Cl, Br, o I; y cada R es independientemente -H, alquilo C₂-C₁₈, arilo C₆-C₂₀, heterociclo C₃-C₁₄, grupo protector o resto de profármaco. Los grupos alquilenos, alquenilenos, y alquinilenos tal como se ha descrito anteriormente también pueden estar sustituidos de forma similar.

"Heteroarilo" y "Heterociclo" se refieren a un sistema de anillo en el que uno o más átomos en el anillo es 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 entre N, O, P, y S. Un heterociclo puede ser un monociclo que tienen de 3 a 7 miembros en el anillo (de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S) o un biciclo que tiene de 7 a 10 miembros en el anillo (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6].

Se describen heterociclos en Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, Nueva York, 1968), particularmente 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.

Ejemplos de heterociclos incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo oxidado con azufre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzoimida-zolilo, 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, tiantrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizínilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, 4aH-carbazolilo, carbazolilo, β-carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, benzoisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo, e isatinoilo.

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

A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos unidos a nitrógeno están unidos en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, en la posición 2 de un isoindol, o isoindolina, en la posición 4 de una morfolina, y que la posición 9 de un carbazol, o β-carbolina. Still Además de forma más habitual, los heterociclos unidos a nitrógeno incluyen 1-aziridilo, 1-azetido, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo, y 1-piperidinilo.

"Carbociclo" se refiere a un anillo saturado por insaturado que tiene de 3 a 7 átomos de carbono como un monociclo o de 7 a 12 átomos de carbono como un biciclo. Dos carbociclos monocíclicos tienen de 3 a 6 átomos en el anillo, además de forma más habitual 5 o 6 átomos en el anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen de 7 a 12 átomos en el anillo, *por ejemplo*, colocados con un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], o 9 o 10 átomos en el anillo colocados con un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. Ejemplos 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.

"Conector", "Unidad de Conector", o "conectar" se refiere un resto químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo a un resto de fármaco. En diversas realizaciones, conectó se especifica como LU. Los conectores incluyen un radical divalente tal como un alquildilo, un arildilo, un heteroarildilo, restos tales como: -(CR₂)_nO(CR₂)_n-, unidades repetición de alquilo (por ejemplo, polietilenoxi, PEG,

polimetileno) y alquilamino (*por ejemplo*, polietilenamino, JeffaminaTM); y éster diácido y amidas que incluyen succinato, succinamida, diglicolato, malonato, y caproamida.

El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superposición del compañero en la imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que se superponen en su compañero en la imagen especular.

El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen constitución química idéntica, pero que difieren con respecto a la colocación de los átomos o grupos en el espacio.

"Diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen propiedades físicas diferentes, *por ejemplo*, puntos de fusión, puntos de ebullición, sociedades espectrales, de actividades. Las mezclas de diastereómeros se pueden separar con procedimientos analíticos de alta resolución tales como electroforesis y cromatografía.

"Enantiómeros" se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí.

Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en el presente documento por lo general siguen S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel, E. y Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc Nueva York. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de girar el plano de luz polarizada en un 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 alrededor de su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se usan para designar el signo de rotación de la luz polarizada en el plano por el compuesto, con (-) o l significando que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos excepto en que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también se puede denominar enantiómero, y una mezcla de dichos isómeros a menudo se denomina una mezcla de enantiomérica. Una mezcla de enantiómeros a 50:50 se denomina una mezcla racémica o un racemato, que se puede producir cuando no se ha producido estereoselección ni estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Las expresiones "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovistas de actividad óptica.

Ejemplos de un "paciente" incluyen, pero no se limitan a, un ser humano, rata, ratón, cobaya, mono, cerdo, cabra, vaca, caballo, perro, gato, pájaro y ave de corral. En una realización a modo de ejemplo, el paciente es un ser humano.

"Ariolo" se refiere a un grupo aromático carbocíclico. Ejemplos de grupos ariolo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo y antraceno. Un grupo aromático carbocíclico o un grupo aromático heterocíclico pueden estar sin sustituir o sustituidos con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en los que cada R' se selecciona independientemente entre H, -alquilo C₁-C₈ y ariolo.

El término "alquilo C₁-C₈", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un hidrocarburo saturado o insaturado, de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 8 átomos de carbono. Grupos "alquilo C₁-C₈" representativos incluyen, pero no se limitan a, -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo, -n-octilo, -n-nonilo y -n-decilo; mientras que los alquilos C₁-C₈ ramificados incluyen, pero no se limitan a, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo, 2-metilbutilo, los alquilos C₁-C₈ insaturados incluyen, pero no se limitan a, -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, -acetilenilo, -propinilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo, -3-metil-1 butinilo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, isohexilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetil-butilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 2,3,4-trimetilpentilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetil-hexilo, 2,4-dimetilhexilo, 2,5-dimetilhexilo, 3,5-dimetilhexilo, 2,4-dimetilpentilo, 2-metilheptilo, 3-metilheptilo, n-heptilo, isoheptilo, n-octilo, y isooctilo. Un grupo alquilo C₁-C₈ puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, - halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en los que cada R' se selecciona independientemente entre H, -alquilo C₁-C₈ y ariolo.

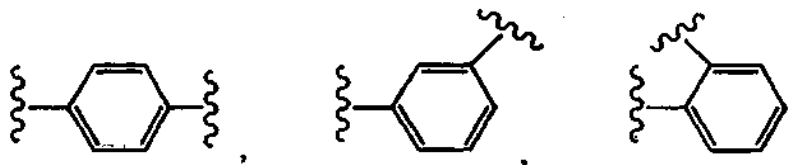
Un "carbociclo C₃-C₈" es un anillo carbocíclico no aromático saturado o insaturado de 3, 4, 5, 6, 7 o 8 miembros. Los carbociclos C₃-C₈ representativos incluyen, pero no se limitan a, -ciclopropilo, -ciclobutilo, -ciclopentilo, -ciclopentadienilo, -ciclohexilo, -ciclohexenilo, -1,3-ciclohexadienilo,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

C₁-C₈ y arilo.

Un "carbociclo C₃-C₈" se refiere a un grupo carbociclo C₃-C₈ que se ha definido anteriormente en el que uno de los átomos de hidrógeno de los grupos carbociclo está reemplazado con un enlace.

5 Un "alquileo C₁-C₁₀" es un grupo hidrocarburo saturado, de cadena lineal de fórmula -(CH₂)₁₋₁₀-. Ejemplos de un alquileo C₁-C₁₀ incluyen metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno y decaleno.

10 Un "arileno" es un grupo arilo que tiene dos enlaces covalentes y puede estar en las configuraciones orto, meta, o para tal como se muestra en las siguientes estructuras



15 en las que el grupo fenilo puede estar sin sustituir o sustituido con hasta cuatro grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, - halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en los que cada R' se selecciona independientemente entre H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

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

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

Un "Compuesto a modo de Ejemplo" es un Compuesto de Fármaco o un Compuesto de Fármaco-Conector.

40 Un "Conjugado a modo de Ejemplo" es un Conjugado de Fármaco-Ligando que tiene una unidad de Fármaco que se puede escindir del Conjugado de Fármaco-Ligando o un Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando.

En algunas realizaciones, los Compuestos a modo de Ejemplo y los Conjugados a modo de Ejemplo están en forma aislada o purificada. Tal como se usa en el presente documento, "aislado" se refiere a separado de los otros componentes de (a) una fuente natural, tal como una célula o cultivo celular vegetal o animal, o (b) una mezcla de reacción química orgánica sintética. Tal como se usa en el presente documento, "purificado" se refiere que cuando está aislado, el aislado contiene al menos un 95 %, y en otro aspecto al menos un 98 %, de Compuesto o Conjugado a modo de Ejemplo en peso del aislado.

50 Ejemplos de un "grupo protector hidroxilo" incluyen, pero no se limitan a, metoximetil éter, 2-metoxietoximetil éter, éter tetrahidropiranílico, éterbencílico, éter p-metoxibencílico, éter trimetilsilílico, éter trietilsilílico, triisopropil silil éter, t-butildimetil silil éter, trifenilmetil silil éter, éster de acetato, ésteres de acetato sustituido, pivaloato, benzoato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato.

55 "Grupo saliente" se refiere a un grupo funcional que se puede sustituir con otro grupo funcional. Dichos grupos salientes son bien conocidos en la técnica, y ejemplos incluyen, pero no se limitan a, un haluro (*por ejemplo*, cloruro, bromuro, yoduro), metanosulfonilo (mesilo), p-toluenosulfonilo (tosilo), trifluorometilsulfonilo (triflato), y trifluorometilsulfonato.

60 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un Compuesto a modo de Ejemplo o Conjugado a modo

de Ejemplo. Los Compuestos a modo de Ejemplo y los Conjugados a modo de Ejemplo contienen al menos un grupo amino, y en consecuencia se pueden formar sales de adición ácida con este grupo amino. Las sales a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato, y pamoato (*es decir*, sales de 1,1'-metil-en-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ión de acetato, un ión de succinato otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que establezca la carga en el compuesto precursor. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Ejemplos en los que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

"Solvato farmacéuticamente aceptable" o "solvato" se refiere a una asociación de una o más moléculas de disolvente y un compuesto de la invención, *por ejemplo*, un Compuesto a modo de Ejemplo o Conjugado a modo de Ejemplo. Ejemplos de disolventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético, y etanolamina.

En el presente documento se usan las siguientes abreviaturas y tienen las definiciones que se indican: AE es auristatina E, Boc es N-(*t*-butoxicarbonilo), cit es citrulina, dap es dolaproína, DCC es 1,3-diciclohexilcarbodiimida, DCM es diclorometano, DEA es dietilamina, DEAD es dietilazodicarboxilato, DEPC es dietilfosforilcianidato, DIAD es diisopropilazodicarboxilato, DIEA es N,N-diisopropiletilamina, dil es dolaisoleucina, DMAP es 4-dimetilaminopiridina, DME es etilenglicol dimetil éter (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 clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, EEDQ es 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, ES-MS es espectrometría de masas por electronebulización, EtOAc es acetato de etilo, Fmoc es N-(9-fluorenilmetoxicarbonilo), gly es glicina, HATU es hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio, HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, HPLC es cromatografía líquida de alta presión, ile es isoleucina, lys es lisina, MeCN (CH₃CN) es acetonitrilo, MeOH es metanol, Mtr es 4-anisildifenilmetilo (o 4-metoxitritilo), nor es (1*S*, 2*R*)-(+)-norefedrina, PAB es p-aminobencilo, PBS es solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4), PEG es polietilenglicol, Ph es fenilo, Pnp es p-nitrofenilo, MC es 6-maleimidocaproilo, phe es L-fenilalanina, PyBrop es hexafluorofosfato de bromo *tris*-pirrolidino fosfonio, SEC es cromatografía de exclusión por tamaño, Su es succinimida, TBTU es tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N,N'-tetrametiluronio, TFA es ácido trifluoroacético, TLC es cromatografía en capa fina, UV es ultravioleta, y val es valina.

En el presente documento se usan las siguientes abreviaturas para conectores y tienen las definiciones que se indican: Val Cit es una valina-citrulina, sitio dipeptídico en el conector de escisión de proteasa; PAB es p-aminobencilcarbamoilo; (Me)vc es N-metil-valina citrulina, en la que el enlace peptídico del conector se ha modificado para evitar su escisión por la catepsina B; MC(PEG)6-OH es maleimidocaproilo-polietilenglicol; SPP es Pentanoato de N-succinimidil-4-(2-piridilto); y SMCC es N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1 carboxilato.

Los términos "tratar" o "tratamiento", a menos que se indique de otro modo en el contexto, se refieren a tratamiento tanto terapéutico como profiláctico o medidas preventivas, en los que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como el desarrollo o propagación del cáncer. Para fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados beneficioso incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas, disminución del alcance de la enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (*es decir*, que no empeora), retraso o disminución del avance de una enfermedad, mejora o alivio del estado de enfermedad, y remisión (tanto parcial como total), tanto detectable como indetectable. "Tratamiento" también se puede referir a prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada sino se recibiera tratamiento. Los individuos que tienen necesidad de tratamiento incluyen los que ya padecen la afección o trastorno así como los propensos a tener la afección o trastorno o aquéllos en los que se va a prevenir la afección o trastorno.

En el contexto del cáncer, el término "que trata" incluye cualquiera o todos de: prevenir el crecimiento de células tumorales, células cancerosas, o de un tumor; prevenir la replicación de células tumorales o de células cancerosas, disminuir la carga tumoral global o disminuir el número de células cancerosas, y mejorar uno o más síntomas asociados con la enfermedad.

En el contexto de una enfermedad autoinmune, el término "que trata" incluye cualquiera o todos de: prevenir la replicación de células asociadas con un estado de enfermedad autoinmune que incluyen, pero no se limitan a, células que producen un anticuerpo autoinmune, disminución de la carga de anticuerpo autoinmune y mejorar uno o más síntomas de una enfermedad autoinmune.

En el contexto de una enfermedad infecciosa, el término "que trata" incluye cualquiera o todos de: prevenir el crecimiento, multiplicación o replicación del agente patógeno que causa la enfermedad infecciosa y mejorar uno o

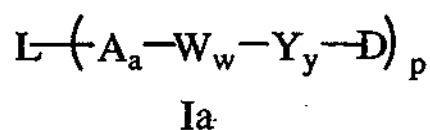
más síntomas de una enfermedad infecciosa.

En el presente documento se usan las siguientes abreviaturas para fármacos citotóxicos y tienen las definiciones que se indican: MMAE es mono-metil auristatina E (Pm 718); MMAF es N-metilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproína-fenilalanina (Pm 731,5); MMAF-DMAEA es MMAF con DMAEA (dimetilaminoetilamina) en una unión amida con la fenilalanina C-terminal (Pm 801,5); MMAF-TEG es MMAF con tetraetilenglicol esterificado a la fenilalanina; MMAF-NtBu es N-t-butilo, unido como una amida al extremo C de MMAF; AEVB es auristatina E valeril bencilhidrazona, conector lábil ácido a través del extremo C de AE (Pm 732); y AFP es Monoamida de p-fenilen diamina con Fenilalanina C-terminal de Auristatina F (Pm 732).

4.2 Los compuestos de la invención

4.2.1 LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA (Ia)

En un aspecto, la invención proporciona Conjugados Fármaco-Conector-Ligando que tienen la Fórmula Ia:



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo en la que,

L- es una unidad de Ligando;

-A_a-W_w-Y_y- es una unidad de Conector (LU), en la que la unidad de Conector incluye: -A- es a unidad Bastidor,

a es 0 o 1,

cada -W- es independientemente una unidad de Aminoácido,

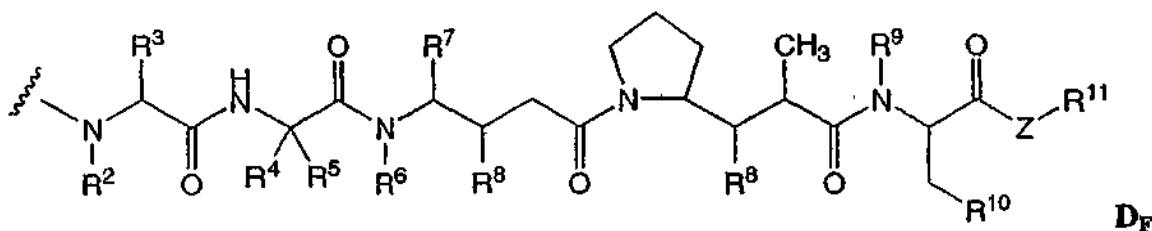
w es un número entero que varía de 0 a 12,

-Y- es a unidad Espaciadora, y

y es 0, 1 o 2;

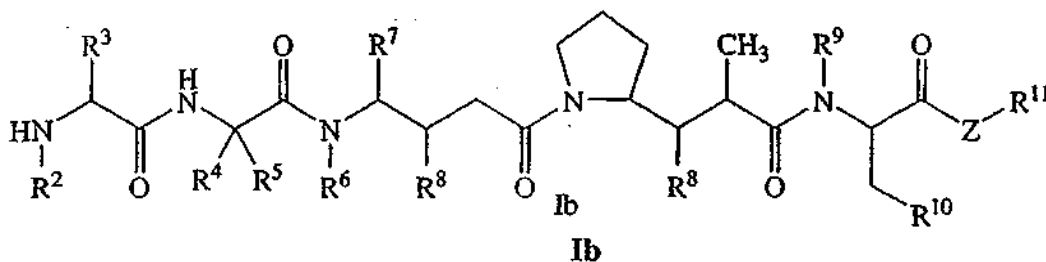
p varía de 1 a aproximadamente 20; y

-D es una unidad de Fármaco que tiene la Fórmula D_F:



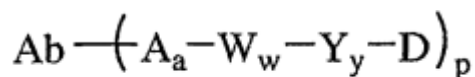
tal como se define en la reivindicación 2.

En otra realización, la presente invención proporciona Compuestos de Fármaco que tienen la Fórmula Ib:



o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, tal como se define en la reivindicación 1.

En otra realización más, la invención proporciona Conjugados Fármaco-Conector-Ligando que tienen la Fórmula Ia':

**Fórmula Ia'**

o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, tal como se define en la reivindicación 4.

Ab es cualquier anticuerpo unido covalentemente a una o más unidades de fármaco. Ab incluye un anticuerpo que se une a antígeno CD30, CD40, CD70, Lewis Y. En otra realización, Ab no incluyen un anticuerpo que se une a un receptor ErbB o a uno o más receptores (1)-(35):

- (1) BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB, N° de acceso en Genbank NM_001203);
- (2) E16 (LAT1, SLC7A5, N° de acceso en Genbank NM_003486);
- (3) STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata, N° de acceso en Genbank NM_012449);
- (4) 0772P (CA125, MUC16, N° de acceso en Genbank AF361486);
- (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor de potenciación de megacariocitos, mesotelina, N° de acceso en Genbank NM_005823);
- (6) Napi3b (NAPI-3B, NPT1b, SLC34A2, familia de transportadores de soluto 34 (fosfato sódico), miembro 2, transportador de fosfato dependiente de sodio de tipo II 3b, N° de acceso en Genbank NM_006424);
- (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (de tipo 1 y similar al tipo 1), dominio transmembrana (TM) and dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B, N° de acceso en Genbank AB040878);
- (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 gene, N° de acceso en Genbank AY358628);
- (9) ETBR (Receptor de endotelina de tipo B, N° de acceso en Genbank AY275463);
- (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, N° de acceso en Genbank NM_017763);
- (11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata 2, proteína de próstata de seis dominios transmembrana, N° de acceso en Genbank AF455138);
- (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial de receptores transitorios, subfamilia M, miembro 4, N° de acceso en Genbank NM_017636);
- (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, N° de acceso en Genbank NP_003203 o NM_003212);
- (14) CD21 (CR2 (Receptor de complemento2) o C3DR (receptor de C3d/virus de Epstein Barr) o Hs.73792, N° de acceso en Genbank M26004);
- (15) CD79b (IGb (asociado a inmunoglobulina beta), B29, N° de acceso en Genbank NM_000626);
- (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína de anclaje 1a de fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C, N° de acceso en Genbank NM_030764);
- (17) HER2 (N° de acceso en Genbank M11730);
- (18) NCA (N° de acceso en Genbank M18728);
- (19) MDP (N° de acceso en Genbank BC017023);
- (20) IL20Rα (N° de acceso en Genbank AF184971);
- (21) Brevican (N° de acceso en Genbank AF229053);
- (22) Ephb2R (N° de acceso en Genbank NM_004442);
- (23) ASLG659 (N° de acceso en Genbank AX092328);
- (24) PSCA (N° de acceso en Genbank AJ297436);
- (25) GEDA (N° de acceso en Genbank AY260763);
- (26) BAFF-R (N° de acceso en Genbank NP_443177.1);
- (27) CD22 (N° de acceso en Genbank NP-001762.1);
- (28) CD79a (CD79A, CD79α, asociado a inmunoglobulina alfa, una proteína específica de linfocitos B que interactúa covalentemente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie de moléculas de IgM, transduce una señal implicada en la diferenciación de linfocitos B, N° de acceso en Genbank NP_001774.1);
- (29) CXCR5 (receptor del linfoma de Burkitt 1, un receptor acoplado a la proteína G que se activa con la quimioquina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y en la defensa humoral, desempeña un papel en la infección por VIH-2 y quizá en el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma, y leucemia, N° de acceso en Genbank NP_001707.1);
- (30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula MHC de clase II (antígeno Ia) que se une a péptidos y los presenta a linfocitos T CD4+, N° de acceso en Genbank NP_002111.1);
- (31) P2X5 (Canal iónico 5 abierto por el ligando receptor purinérgico P2X, un canal aniónico abierto por ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión y en la neurogénesis sináptica, la deficiencia puede contribuir a la patofisiología de inestabilidad, N° de acceso en Genbank NP_002552.2);
- (32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de linfocitos B, Lyb-2, N° de acceso en Genbank

NP_001773.1);

(33) LY64 (Antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repetición rica en leucina (LRR), regula la activación y apoptosis de linfocitos B, la pérdida de función está asociada con mayor actividad de la enfermedad en pacientes con lupus sistémico eritematoso, N° de acceso en Genbank NP_005573.1);

(34) FCRH1 (proteína 1 de tipo receptor de Fc, 1 supuesto receptor para el dominio Fc de la inmunoglobulina que contiene los dominios similar a Ig de tipo C2 e ITAM, puede tener un papel en la diferenciación de linfocitos B, N° de acceso en Genbank NP_443170.1); y/o

(35) IRTA2 (Translocación asociada al receptor 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas, un supuesto inmunoreceptor con posibles papeles en el desarrollo y la linfomagénesis de linfocitos B; la desregulación de los genes por translocación se produce en algunas neoplasias de linfocitos B, N° de acceso en Genbank NP_112571.1).

En una realización -Ww- es -Val-Cit-.

En otra realización, R^3 , R^4 y R^7 son independientemente isopropilo o sec-butilo y R^5 es -H. En una realización a modo de ejemplo, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^5 es -H, y R^7 es sec-butilo. En otra realización más, R^2 y R^6 son cada uno metilo, y R^9 es -H.

Además, en otra realización, cada aparición de R^8 es -OCH₃.

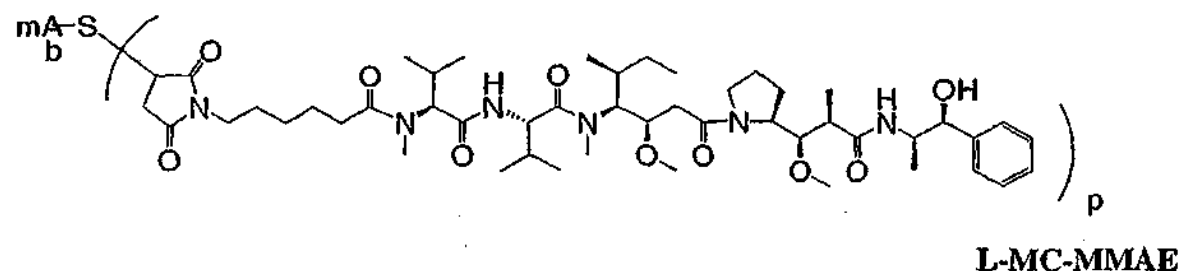
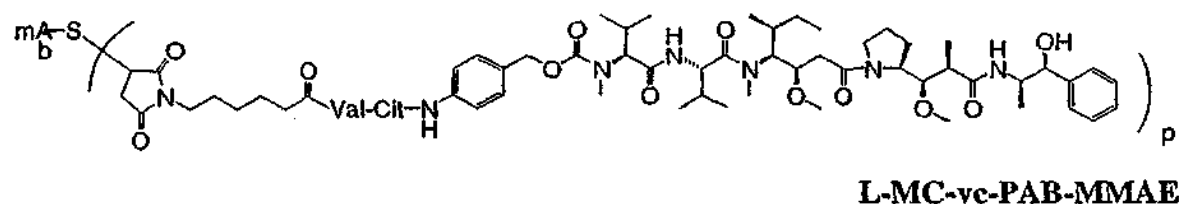
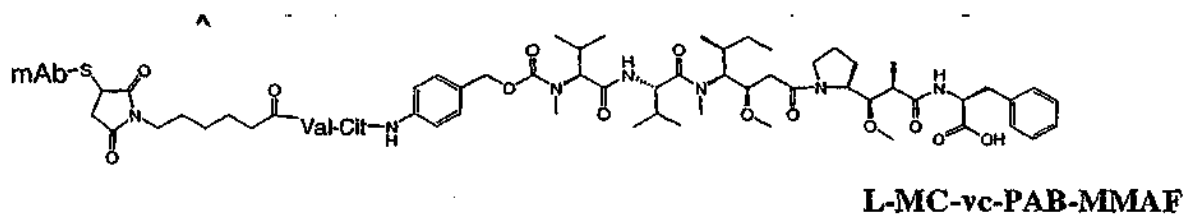
En una realización a modo de ejemplo, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^2 y R^6 son cada uno metilo, R^5 es -H, R^7 es sec-butilo, cada aparición de R^8 es -OCH₃, y R^9 es -H.

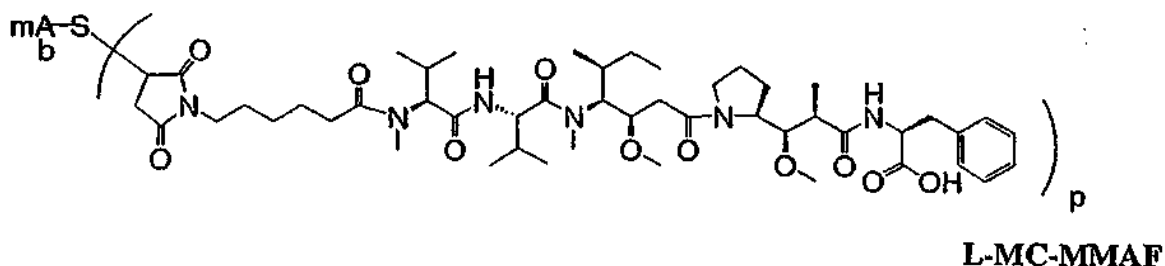
En una realización, R^{10} es arilo.

En una realización a modo de ejemplo, R^{10} es -fenilo.

En un aspecto, Ab es cAC10, cBR96, cS2C6, c1F6, c2F2, hAC10, hBR96, hS2C6, h1F6, y h2F2.

Ejemplos de conjugados de fármaco-anticuerpo que se desvelan en el presente documento incluyen los que tienen las siguientes fórmulas:



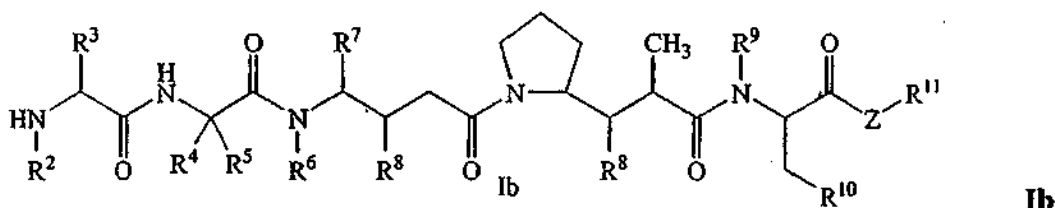


en las que L es un anticuerpo, Val es valina, y Cit es citrulina.

La carga del fármaco drug se representa con p, el número medio de moléculas de fármaco por anticuerpo en una molécula (por ejemplo, de Fórmula Ia, Ia' e Ic). La carga del fármaco puede variar de 1 a 20 fármacos (D) por Ligando (por ejemplo, Ab o mAb). Las composiciones de Fórmula Ia y de Fórmula Ia' incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con un intervalo de fármacos, de 1 a 20. El número medio de fármacos por anticuerpo en la preparación de reacciones de conjugación se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayo de ELISA, y HPLC. Además, se puede determinar la distribución cuantitativa de Conjugados de Ligando-Fármaco en términos de p. En algunos casos, la separación, purificación, y caracterización de conjugados de Ligando-Fármaco en los que p es un valor determinado para Conjugados de Ligando-Fármaco con otras cargas de fármaco se pueden conseguir por cualquier medio tal como HPLC en fase inversa o electroforesis.

4.2.2 LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA (Ib)

En otro aspecto, la presente invención proporciona Compuestos de Fármaco que tienen la Fórmula (Ib):



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, tal como se define en la reivindicación 1.

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

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

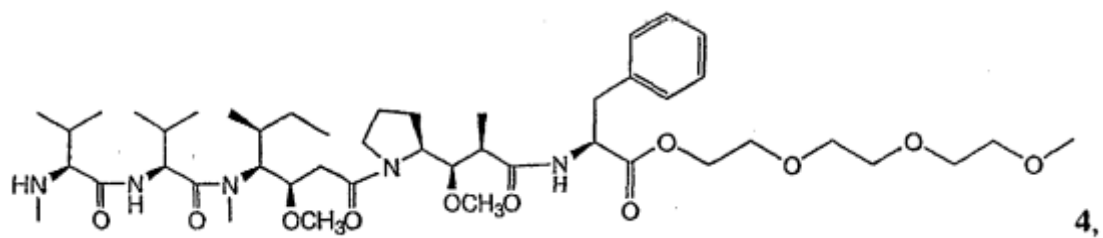
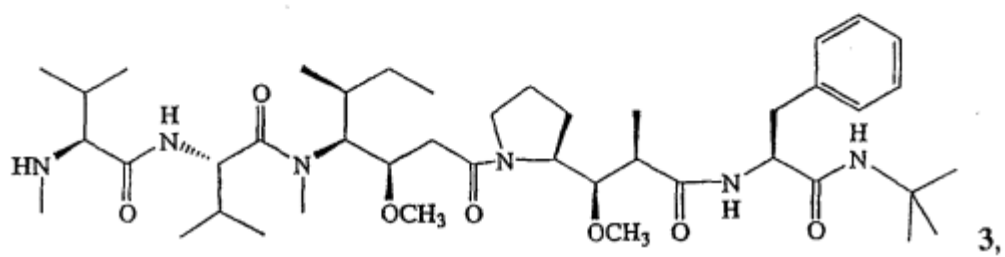
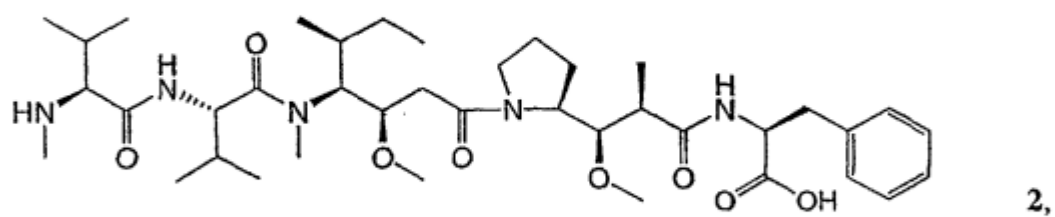
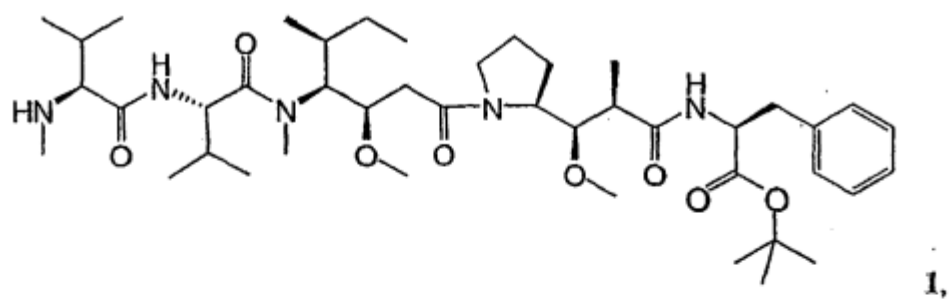
Además, en otra realización, cada aparición de R⁸ es -OCH₃.

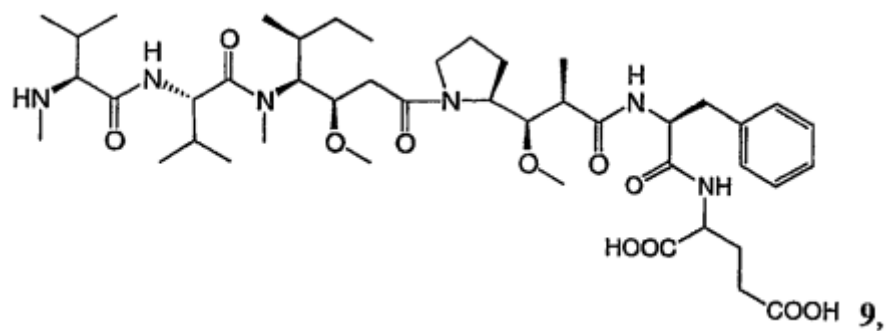
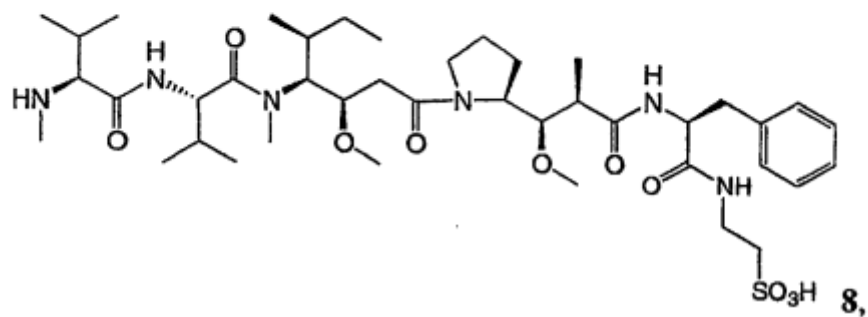
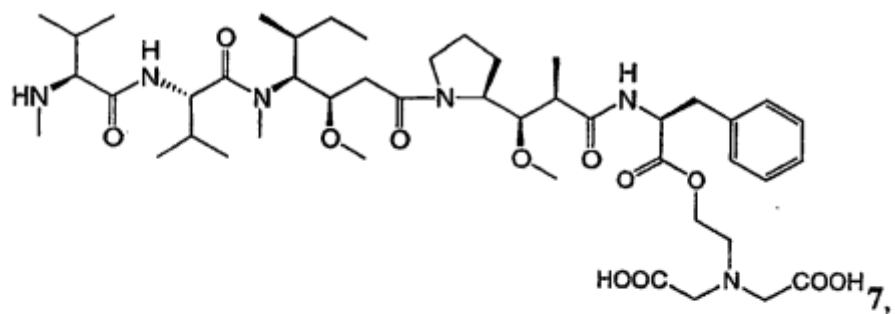
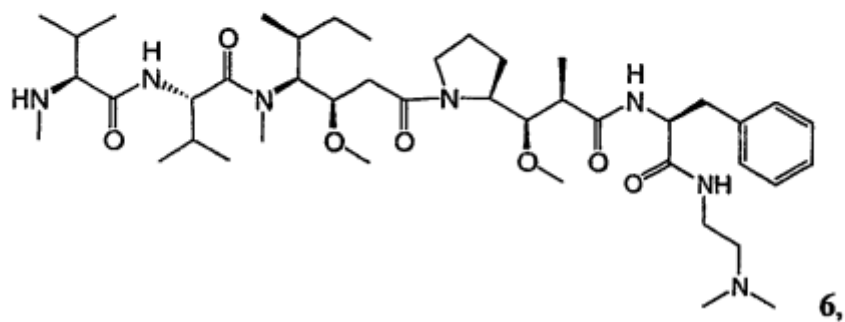
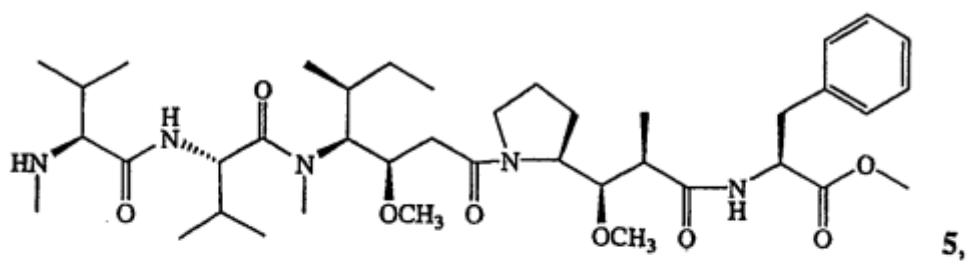
En una realización a modo de ejemplo, R³ y R⁴ son cada uno isopropilo, R² y R⁶ son cada uno metilo, R⁵ es -H, R⁷ es sec-butilo, cada aparición de R⁸ es -OCH₃, y R⁹ es -H.

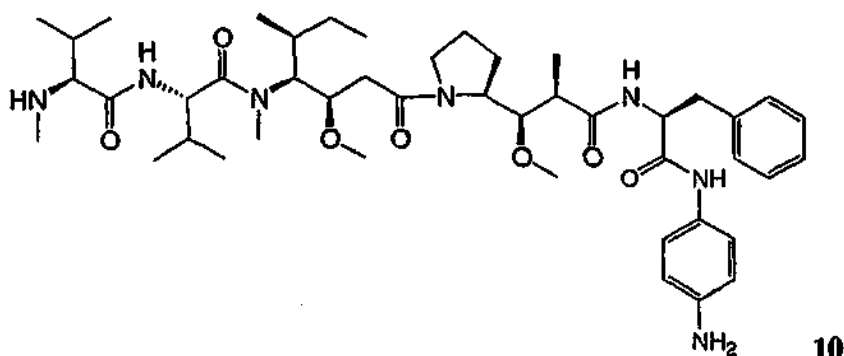
En una realización, R¹⁰ es arilo.

En una realización a modo de ejemplo, R¹⁰ es -fenilo.

Los Compuestos Ilustrativos que se desvelan en el presente documento, cada uno de los cuales se puede usar como restos de fármaco (D) en ADC, incluyen compuestos que tienen las siguientes estructuras:



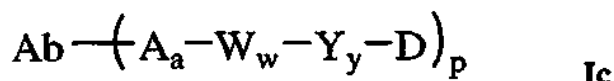




y sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

5 LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA (Ic)

En otro aspecto, la invención proporciona compuestos de conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que tienen la Fórmula Ic:



que comprenden un anticuerpo unido covalentemente a uno o más unidades de fármaco (restos). Los compuestos de conjugados de anticuerpo-fármaco incluyen sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

15 Se definen compuestos de Fórmula Ic, en la que:

Ab es un anticuerpo que se une a uno o más receptores de antígenos asociados a tumor (1)-(35):

- (1) BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB, N° de acceso en Genbank NM_001203);
- (2) E16 (LAT1, SLC7A5, N° de acceso en Genbank NM_003486);
- (3) STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata, N° de acceso en Genbank NM_012449);
- (4) 0772P (CA125, MUC16, N° de acceso en Genbank AF361486);
- (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor de potenciación de megacariocitos, mesotelina, N° de acceso en Genbank NM_005823);
- (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTI1b, SLC34A2, familia de transportadores de soluto 34 (fosfato sódico), miembro 2, transportador de fosfato dependiente de sodio de tipo II 3b, N° de acceso en Genbank NM_006424);
- (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (de tipo 1 y similar al tipo 1), dominio transmembrana (TM) and dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B, N° de acceso en Genbank AB040878);
- (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 gene, N° de acceso en Genbank AY358628);
- (9) ETBR (Receptor de endotelina de tipo B, N° de acceso en Genbank AY275463);
- (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, N° de acceso en Genbank NM_017763);
- (11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata 2, proteína de próstata de seis dominios transmembrana, N° de acceso en Genbank AF455138);
- (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial de receptores transitorios, subfamilia M, miembro 4, N° de acceso en Genbank NM_017636);
- (13) CRIPTO, (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, N° de acceso en Genbank NP_003203 o NM_003212);
- (14) CD21 (CR2 (Receptor de complemento2) o C3DR (receptor de C3d/virus de Epstein Barr) o Hs.73792 N° de acceso en Genbank M26004);
- (15) CD79b (CD79B, CD79β, Igb (asociado a inmunoglobulina beta), B29, N° de acceso en Genbank NM_000626);
- (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína de anclaje 1a de fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C, N° de acceso en Genbank NM_030764);
- (17) HER2 (N° de acceso en Genbank M11730);
- (18) NCA (N° de acceso en Genbank M18728);
- (19) MDP (N° de acceso en Genbank BC017023);

(20) IL20R α (Nº de acceso en Genbank AF184971);
 (21) Brevican (Nº de acceso en Genbank AF229053);
 (22) Ephb2R (Nº de acceso en Genbank NM_004442);
 (23) ASLG659 (Nº de acceso en Genbank AX092328);
 (24) PSCA (Nº de acceso en Genbank AJ297436);
 (25) GEDA (Nº de acceso en Genbank AY260763);
 (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, receptor 3 de BLyS, BR3, NP_443177.1);
 (27) CD22 (isoforma CD22-B de receptores de linfocitos B, NP-001762.1);
 (28) CD79a (CD79A, CD79 α , asociado a inmunoglobulina alfa, una proteína específica de linfocitos B que interactúa covalentemente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie de moléculas de IgM, transduce una señal implicada en la diferenciación de linfocitos B, Nº de acceso en Genbank NP_001774.1);
 (29) CXCR5 (receptor del linfoma de Burkitt 1, un receptor acoplado a la proteína G que se activa con la quimioquina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y en la defensa humoral, desempeña un papel en la infección por VIH-2 y quizá en el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma, y leucemia, Nº de acceso en Genbank NP_001707.1);
 (30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula MHC de clase II (antígeno Ia) que se une a péptidos y los presenta a linfocitos T CD4+, Nº de acceso en Genbank NP_002111.1);
 (31) P2X5 (Canal iónico 5 abierto por el ligando receptor purinérgico P2X, un canal aniónico abierto por ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión y en la neurogénesis sináptica, la deficiencia puede contribuir a la patofisiología de inestabilidad, Nº de acceso en Genbank NP_002552.2);
 (32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de linfocitos B, Lyb-2, Nº de acceso en Genbank NP_001773.1);
 (33) LY64 (Antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repetición rica en leucina (LRR), regula la activación y apoptosis de linfocitos B, la pérdida de función está asociada con mayor actividad de la enfermedad en pacientes con lupus sistémico eritematoso, Nº de acceso en Genbank NP_005573.1);
 (34) FCRH1 (proteína 1 de tipo receptor de Fc,1 supuesto receptor para el dominio Fc de la inmunoglobulina que contiene los dominios similar a Ig de tipo C2 e ITAM, puede tener un papel en la diferenciación de linfocitos B, Nº de acceso en Genbank NP_443170.1); y
 (35) IRTA2 (Translocación asociada al receptor 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas, un supuesto inmunoreceptor con posibles papeles en el desarrollo y la linfomagénesis de linfocitos B; la disregulación de los genes por translocación se produce en algunas neoplasias de linfocitos B, Nº de acceso en Genbank NP_112571.1).

A es a unidad Bastidor,

a es 0 o 1,

cada W es independientemente una unidad de Aminoácido,

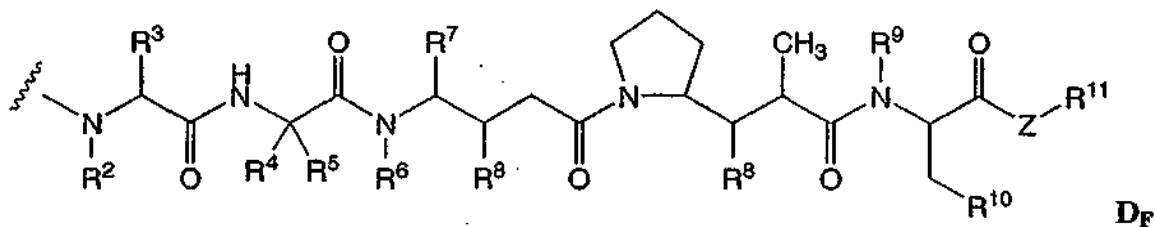
w es un número entero que varía de 0 a 12,

Y es a unidad Espaciadora, e

y es 0, 1 o 2,

p varía de 1 a aproximadamente 8, y

D es un resto de Fármaco que tiene la Fórmula D_F:



tal como se define en la reivindicación 2,

en la que la línea ondulada de D_E y D_F indica el sitio de unión covalente para A, W, o Y.

En una realización -Ww- es -Val-Cit-.

En otra realización, R³, R⁴ y R⁷ son independientemente isopropilo o sec-butilo y R⁵ es -H. En una realización a

modo de ejemplo, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^5 es -H, y R^7 es sec-butilo.

En otra realización más, R^2 y R^6 son cada uno metilo, y R^9 es -H.

5 Además, en otra realización, cada aparición de R^8 es $-\text{OCH}_3$.

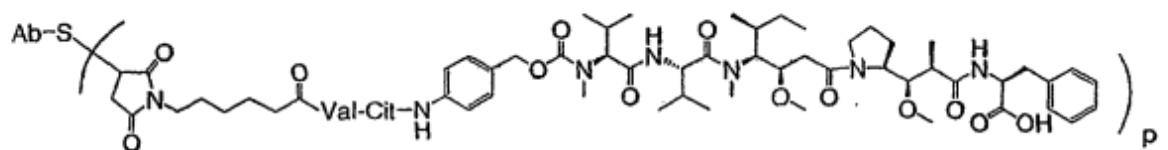
En una realización a modo de ejemplo, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^2 y R^6 son cada uno metilo, R^5 es -H, R^7 es sec-butilo, cada aparición de R^8 es $-\text{OCH}_3$, y R^9 es -H.

10 En una realización, R^{10} es arilo.

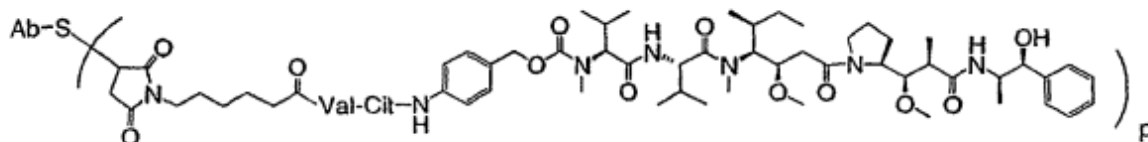
En una realización a modo de ejemplo, R^{10} es -fenilo.

Los conjugados ilustrativos de anticuerpo-fármaco que se describen en el presente documento incluyen:

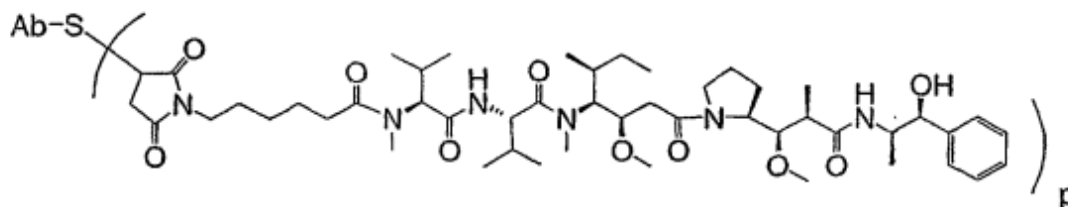
15



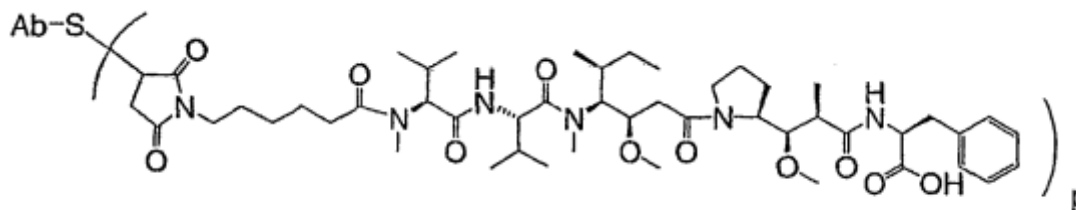
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

20 en los que Ab es un anticuerpo que se une a uno o más receptores de antígenos asociados a tumor (1)-(35); Val es valina; y Cit es citrulina.

25 La carga de fármacos se representa por p, el número medio de fármacos por anticuerpo en una molécula de Fórmula I. La carga del fármaco puede variar de 1 a 20 fármacos (D) por anticuerpo (Ab o mAb). Las composiciones de ADC de Fórmula I incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con un intervalo de fármacos, de 1 a 20. El número medio de fármacos por anticuerpo en las preparaciones de ADC a partir de reacciones de conjugación se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectroscopía de UV/visible, espectrometría de masas, ensayo de ELISA, y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de ADC en términos de p. En algunos casos, la separación purificación, y caracterización de ADC homogéneos en los que p es un determinado valor a partir de ADC con otras cargas de fármaco se pueden conseguir por medios tales como HPLC de fase

inversa o electroforesis.

Para algunos conjugados de fármaco de anticuerpo, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión es un tiol de la cisteína, tal como las realizaciones a modo de ejemplo mencionadas anteriormente, un anticuerpo puede tener solamente uno o varios grupos tiol de la cisteína, o por detener solamente uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través los que se puede unir un conector.

Por lo general, menos del máximo teórico de restos de fármaco se conjugan con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, muchos restos de lisina que no reaccionan con el compuesto intermedio de fármaco-conector o reactivo conector. Solamente los grupos lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo conector de amina-reactivo. Generalmente, los anticuerpos no contienen muchos, si los hubiera, grupos tiol de la cisteína libres y reactivos que se pueden unir a un resto de fármaco. La mayoría de los restos tiol de la cisteína en los anticuerpos de los compuestos de la invención existen como puentes disulfuro se deben reducir con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT). Además, el anticuerpo se debe someter a condiciones de desnaturalización para dejar al descubierto grupos nucleófilos reactivos tales como lisina o cisteína. La carga (relación de fármaco/anticuerpo) de un ADC se puede controlar diferentes maneras, que incluyen: (i) limitar el exceso molar de compuesto intermedio de fármaco-conector o reactivo conector con respecto al anticuerpo, (ii) limitar el tiempo o la temperatura de la reacción de conjugación, y (iii) hacer parciales o limitar las condiciones de reducción para la modificación del tiol de la cisteína.

Se debe observar que cuando más de un grupo nucleófilo reacciona con un compuesto intermedio de fármaco-conector, o reactivo conector seguido de reactivo de resto de fármaco, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de uno o más restos de fármaco unidos a un anticuerpo. El número medio de fármacos por anticuerpo se puede calcular a partir de la mezcla mediante ensayos de anticuerpos por ELISA doble, específicos para anticuerpos y específicos para el fármaco. Se pueden identificar moléculas individuales de ADC en la mezcla por espectroscopía de masas, y separa por HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrófoba ("Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", Hamblett, K.J., et al, Resumen N° 624, American Association for Cancer Research; Annual Meeting de 2004, 27-31 de marzo de 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, marzo de 2004; "Controlling the Location of Drug Attachment in Antibody-Drug Conjugates", Alley, S.C., et al, Resumen N° 627, American Association for Cancer Research; Annual Meeting de 2004, 27-31 de marzo de 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, marzo de 2004). Por lo tanto, un ADC homogéneo con un solo valor de carga se puede aislar a partir de la mezcla de conjugación mediante electroforesis o cromatografía.

4.3 LA UNIDAD DE CONECTOR

Una "unidad de Conector" (LU) es un compuesto bifuncional, que se puede usar para unir una unidad de Fármaco y una unidad de Ligando para formar Conjugados de Fármaco-Conector-Ligando, o que son útiles en la formación de inmunoconjugados dirigidos frente a antígenos asociados a tumores. Dichos inmunoconjugados permiten la administración selectiva de fármacos tóxicos a células tumorales. En una realización, la unidad de Conector del Compuesto de Fármaco-Conector y Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando tiene la fórmula:



en la que:

- A- es a unidad Bastidor;
a es 0 por 1;
- cada -W- es independientemente una unidad de Aminoácido;
w es independientemente un número entero que varía de 0 a 12;
- Y- es a unidad Espaciadora; y
y es 0, 1 o 2.

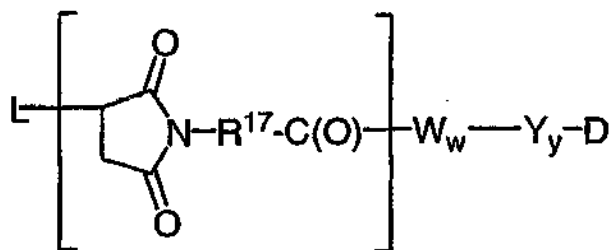
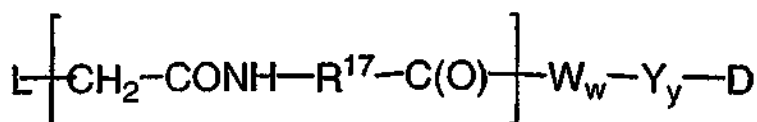
En el Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando, el Conector es capaz de unirse al resto Fármaco y a la unidad de Ligando.

4.3.1 LA UNIDAD BASTIDOR

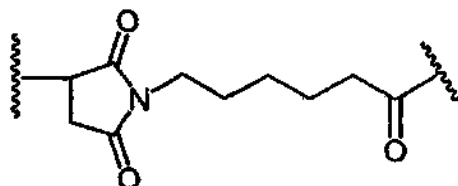
La unidad Bastidor (-A-), cuando está presente, es capaz de unirse a una unidad de Ligando para formar una unidad de aminoácido (-W-). A este respecto, un Ligando (L) tiene un grupo funcional que puede formar un enlace con grupo funcional de un Bastidor. Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un ligando, bien naturales o a través de manipulación química incluyen, pero no se limitan a, sulfhidrilo (-SH), amino, hidroxilo, carboxi, el grupo hidroxilo anómero de un hidrato de carbono, y carboxilo. En un aspecto, los grupos funcionales de Ligando son sulfhidrilo y amino. Los grupos sulfhidrilo se pueden generar por reducción de un enlace disulfuro intramolecular de un Ligando. Como alternativa, los grupos sulfhidrilo se pueden generar por reacción de un grupo amino de un resto de lisina de un Ligando usando 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otro reactivo que genere

sulfhidrido.

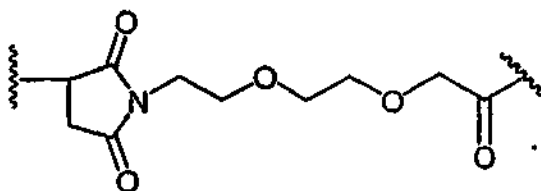
En una realización, la unidad Bastidor forma un enlace con un átomo de azufre de la unidad de Ligando. El átomo de azufre puede provenir de un grupo sulfhidrido de un Ligando. Las unidades Bastidor representativas de la presente realización se representan dentro de los corchetes de las Fórmulas **IIIa** y **IIIb**, en las que L-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal como se han definido anteriormente, y R^{17} se selecciona entre -alquileo C_1-C_{10} -, -carbociclo C_3-C_8 -, -O-(alquilo C_1-C_8)-, -arileno-, -alquilen C_1-C_{10} -arileno-, -arilen-alquileo C_1-C_{10} -, -alquilen C_1-C_{10} -(carbociclo C_3-C_8)-, -(carbociclo C_3-C_8)-alquileo C_1-C_1 -, -heterociclo C_3-C_8 -, -alquilen C_1-C_{10} -(heterociclo C_3-C_8)-, -(heterociclo C_3-C_8)-alquileo C_1-C_{10} -, $-(CH_2CH_2O)_r$ - y $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2$ -; y r es un número entero que varía de 1-10. Se debe entender que a partir de todas las realizaciones a modo de ejemplo de Fórmula **Ia**, tales como **III-VI**, que incluso cuando no se indica de forma expresa, de 1 a 20 restos de fármaco están unidos a un Ligando ($p = 1-20$).

**IIIa****IIIb**

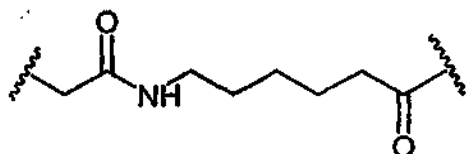
Una unidad Bastidor ilustrativa es la de Fórmula **IIIa** en la que R^{17} es $-(CH_2)_5$:



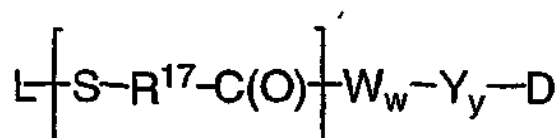
Otra unidad Bastidor ilustrativa es la de Fórmula **IIIa** en la que R^{17} es $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2$; y r es 2:



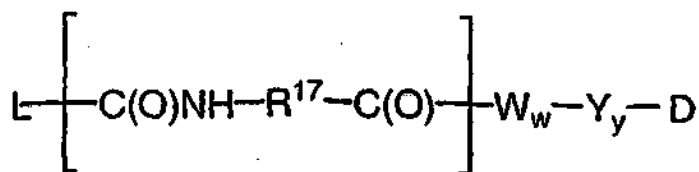
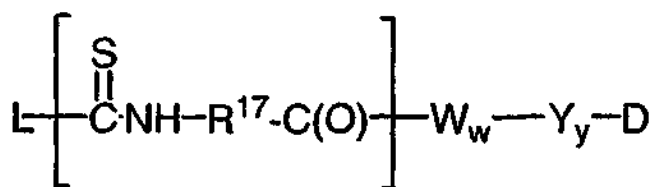
Además, otra unidad Bastidor ilustrativa es la de Fórmula **IIIb** en la que R^{17} es $-(CH_2)_5$:



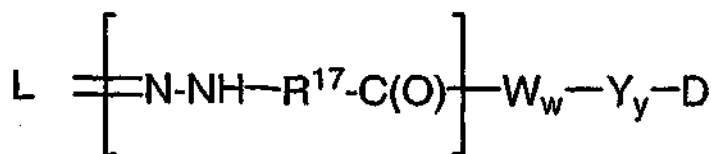
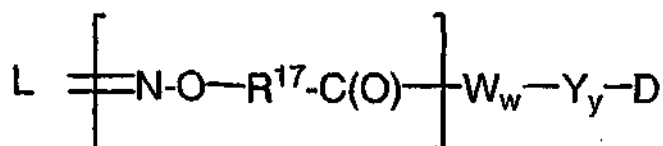
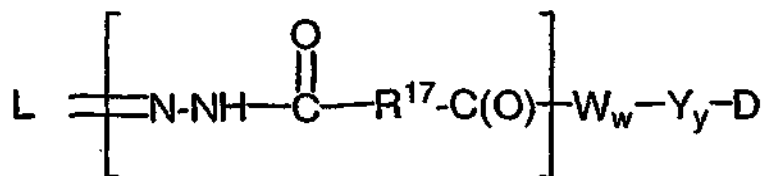
En otra realización, la unidad Bastidor está unida a la unidad de Ligando a través de un enlace disulfuro entre un átomo de azufre de la unidad de Ligando y un átomo de azufre de la unidad Bastidor. Una unidad Bastidor representativa de la presente realización se representa dentro de los corchetes de Fórmula IV, en la que R^{17} , L-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal como se han definido anteriormente.

**IV**

En otra realización más, el grupo reactivo del Bastidor contiene husillo reactivo que puede formar un enlace con un grupo amino primario o secundario de un Ligando. Ejemplos de estos sitios reactivos incluyen, pero no se limitan a, 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 Bastidor representativas de la presente realización se representan dentro de los corchetes de las Fórmulas Va y Vb, en las que $-R^{17}$ -, L -, $-W$ -, $-Y$ -, $-D$, w e y son tal como se han definido anteriormente;

**Va****Vb**

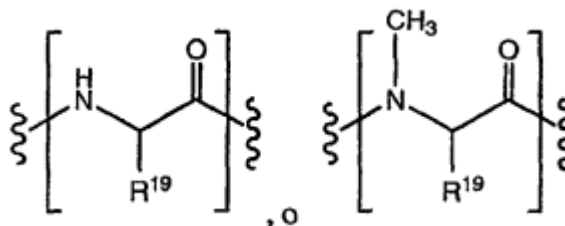
En otro aspecto más, el grupo reactivo del Bastidor contiene un sitio reactivo que es reactivo a un grupo modificado del hidrato de carbono ($-CHO$) que puede estar presente en un por. Por ejemplo, un hidrato de carbono se puede oxidar suavemente usando un reactivo tal como peryodato sódico y la unidad ($-CHO$) resultante del hidrato de carbono oxidado se puede condensar con un Bastidor que contiene una funcionalidad tal como una hidrazida, una oxima, una amina primaria o secundaria, una hidrazina, una tiosemicarbazona, un carboxilato de hidrazina, y una arilhidrazida tal como las que se describen en Kaneko, T. et al. (1991) Bioconjugate Chem 2: 133-41. Las unidades Bastidor representativas de la presente realización se representan dentro de los corchetes de Fórmulas **Vla**, **Vlb**, y **Vlc**, en las que $-R^{17}$ -, L -, $-W$ -, $-Y$ -, $-D$, w e y son tal como se han definido anteriormente.

**Vla****Vlb****Vlc**

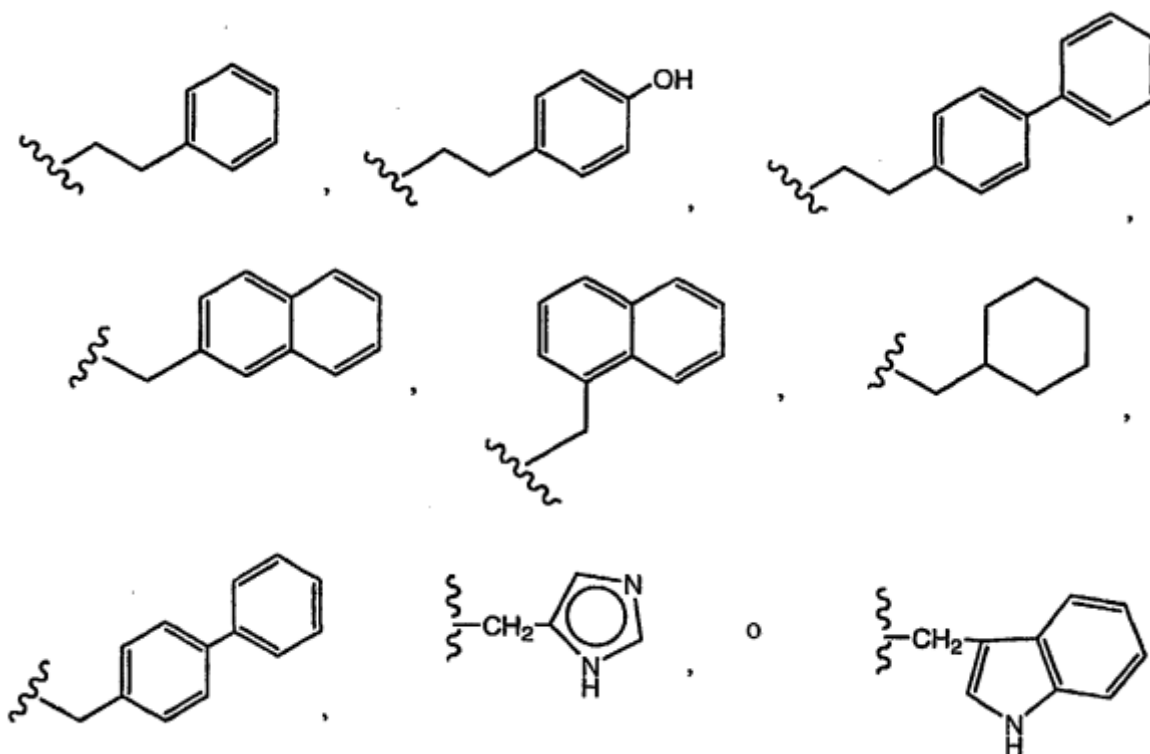
4.3.2 LA UNIDAD DE AMINOÁCIDO

La unidad de Aminoácido (-W-), cuando está presente, une la unidad Bastidor a la unidad Espaciadora si la unidad Espaciadora está presente, une la unidad Bastidor al resto de Fármaco si la unidad Espaciadora está ausente, y une la unidad de Ligando a la unidad de Fármaco si la unidad Bastidor y la unidad Espaciadora están ausentes.

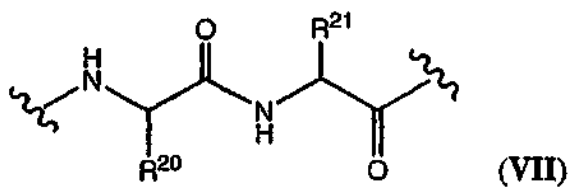
W_w es una unidad dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapeptido, undecapéptido o dodecapeptido. Cada unidad -W- tiene independientemente la fórmula que se indica a continuación entre paréntesis, y w es un número entero que varía de 0 a 12:



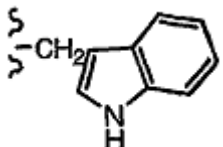
en las que R^{19} es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, *sec*-butilo, bencilo, *p*-hidroxibencilo, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$,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

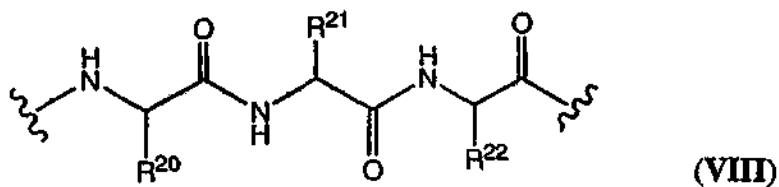


La unidad de Aminoácido se puede escindir enzimáticamente con una o más enzimas, que incluyen proteasa asociada a tumores, para liberar la unidad de Fármaco (-D), que en una realización se protona *in vivo* después de su liberación para proporcionar un Fármaco (D). Unidades W_w ilustrativas se representan con las fórmulas (VII)-(IX):



en la que R^{20} y R^{21} son como sigue a continuación:

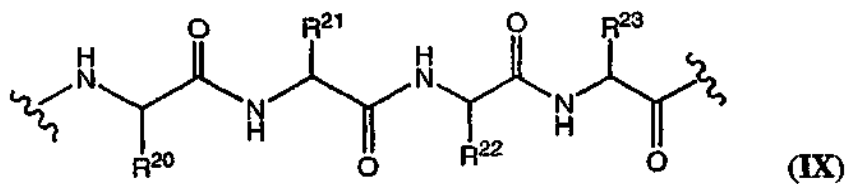
R^{20}	R^{21}
bencilo	$(CH_2)_4NH_2$;
metilo	$(CH_2)_4NH_2$;
isopropilo	$(CH_2)_4NH_2$;
isopropilo	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
bencilo	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
isobutilo	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
sec-butilo	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
bencilo	metilo; y
bencilo	$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$;



5

en la que R^{20} , R^{21} y R^{22} son como sigue a continuación:

R^{20}	R^{21}	R^{22}
bencilo	bencilo	$(CH_2)_4NH_2$;
isopropilo	bencilo	$(CH_2)_4NH_2$; y
I		
H	bencilo	$(CH_2)_4NH_2$;



10

en R^{20} , R^{21} , R^{22} y R^{23} son como sigue a continuación:

R ²⁰	R ²¹	R ²²	R ²³
H	bencilo	isobutilo	H; y
		I	
metilo	isobutilo	metilo	Isobutilo
	I		.

Unidades Aminoácido a modo de ejemplo unidad incluyen, pero no se limitan a, unidades de fórmula (VII) en la que: R²⁰ es bencilo y R²¹ es -(CH₂)₄NH₂; R²⁰ isopropilo y R²¹ es -(CH₂)₄NH₂; R²⁰ isopropilo y R²¹ es -(CH₂)₃NHCONH₂. Otra unidad de Aminoácido a modo de ejemplo es una unidad de fórmula (VIII) en la que R²⁰ es bencilo, R²¹ es bencilo, y R²² es -(CH₂)₄NH₂.

Las unidades -W_w- útiles se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para escisión enzimática con una enzima en particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumores. En una realización, una unidad -W_w- es aquella cuya escisión está catalizada por catepsina B, C y D, o una proteasa de plásmido.

En una realización, -W_w- es un dipéptido, tripéptido, tetrapéptido o pentapéptido.

Cuando R¹⁹, R²⁰, R²¹, R²² o R²³ es distinto de hidrógeno, el átomo de carbono al que R¹⁹, R²⁰, R²¹, R²² o R²³ está unido es quiral.

Cada átomo de carbono al que R¹⁹, R²⁰, R²¹, R²² o R²³ está unido está independientemente en la configuración (S) o (R).

En un aspecto de la unidad de Aminoácido, la unidad de Aminoácido es valina-citrulina. En otro aspecto, la unidad de Aminoácido es fenilalanina-lisina (es decir, fk). En otro aspecto más de la unidad de Aminoácido, la unidad de Aminoácido es N-metilvalina-citrulina. En otro aspecto más, la unidad de Aminoácido es ácido 5-aminovalérico, homo fenilalanina lisina, tetraisoquinolinacarboxilato de lisina, ciclohexilalanina lisina, ácido isonipecótico lisina, beta-alanina lisina, glicina serina valina glutamina y ácido isonipecótico.

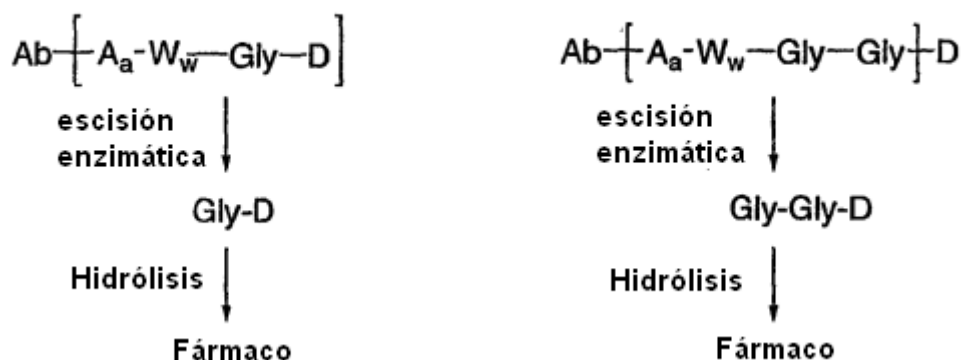
En determinadas realizaciones, la unidad de Aminoácido puede comprender aminoácidos naturales. En otras realizaciones, la unidad de Aminoácido puede comprender aminoácidos no naturales.

4.3.3 LA UNIDAD ESPACIADORA

La unidad Espaciadora (-Y-), cuando está presente, une una unidad de Aminoácido al resto de Fármaco cuando una unidad de Aminoácido está presente. Como alternativa, la unidad Espaciadora une la unidad Bastidor al resto de Fármaco cuando la unidad de Aminoácido está ausente. La unidad Espaciadora también une el resto de Fármaco a la unidad de Ligando cuando tanto la unidad de Aminoácido como la unidad Bastidor están ausentes.

Las unidades Espaciadoras son de dos tipos generales: autoinmolativas y no autoinmolativas. Una unidad Espaciadora no autoinmolativa es una en la que parte o toda la unidad Espaciadora permanece unida al resto de Fármaco después de la escisión, particularmente enzimática, de una unidad de Aminoácido a partir del Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando o del Compuesto Fármaco-Conector. Ejemplos de una unidad Espaciadora no autoinmolativa incluyen, pero no se limitan a una unidad Espaciadora (glicina-glicina) y una unidad Espaciadora glicina (ambas representadas en el Esquema 1) (véase a continuación). Cuando un Compuesto a modo de Ejemplo que contiene una unidad Espaciadora glicina-glicina o una unidad Espaciadora glicina experimenta escisión enzimática a través de una proteasa asociada a células tumorales, una proteasa asociada a células cancerosas o una proteasa asociada a linfocitos, un resto de Fármaco glicina-glicina o un resto de Fármaco glicina se escinde de L-A_a-Ww-. En una realización, una reacción de hidrólisis independiente se produce dentro de la célula diana, escindiendo el resto de Fármaco glicina y liberando el Fármaco.

En otra realización, -Y_v- es una unidad de alcohol p-aminobencílico (PAB) (véanse los Esquemas 2 y 3) cuya porción 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 0-4.

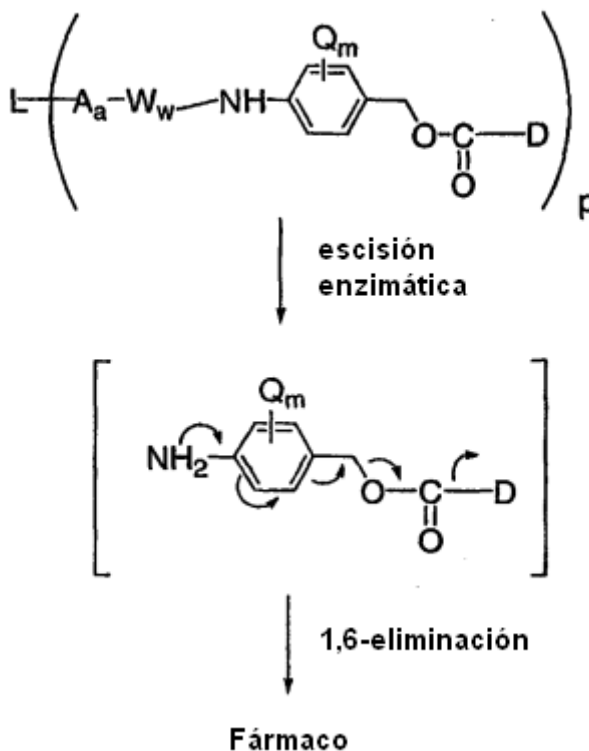
Esquema 1

En una realización, una unidad Espaciadora no autoinmolativa (-Y-) es -Gly-Gly-. En otra realización, una unidad Espaciadora no autoinmolativa (-Y-) es -Gly-.

5 En una realización, se proporciona un Compuesto de Fármaco-Conector o un Conjugado de Fármaco-Conector Ligando en el que la unidad Espaciadora está ausente ($y = 0$), o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

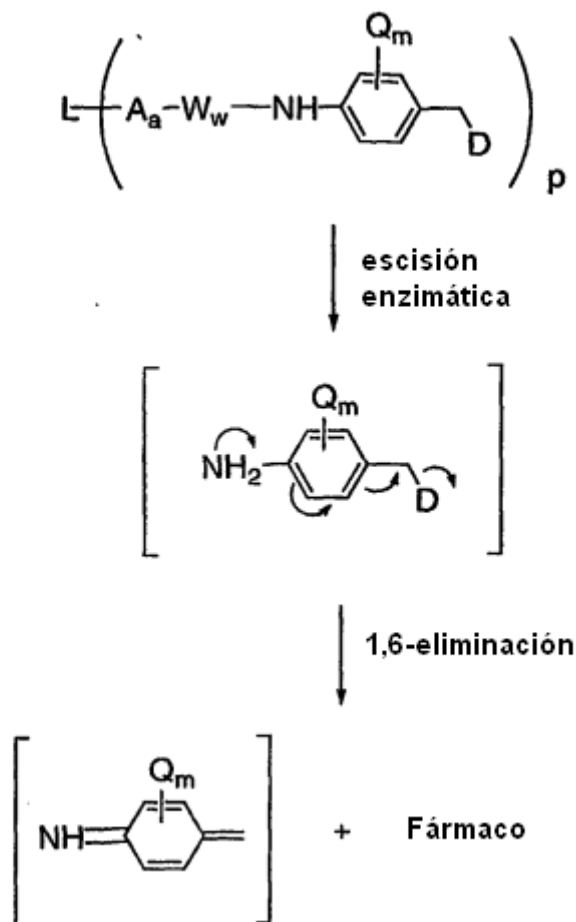
10 Como alternativa, un Compuesto a modo de Ejemplo que contiene una unidad Espaciadora autoinmolativa puede liberar -D sin la necesidad de una etapa de hidrólisis separada. En esta realización, -Y- es un grupo PAB que se une a -W_w- a través del átomo de nitrógeno del amino del grupo PAB, y se conecta directamente a -D a través de un grupo carbonato, carbamato o éter. Sin quedar ligado a teoría o mecanismo alguno en particular, el Esquema 2 representa un mecanismo posible de liberación de Fármaco de un grupo PAB que se une directamente a -D a través

15 de un grupo carbamato o carbonato adoptado por Toki et al. (2002) J Org. Chem. 67: 1866-1872.

Esquema 2

20 en el que Q es -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0-4; y p varía de 1 a aproximadamente 20.

Sin quedar ligado a teoría o mecanismo alguno en particular, el Esquema 3 representa un mecanismo posible de liberación de Fármaco de un grupo PAB que se une directamente a -D a través de una unión éter o amina.

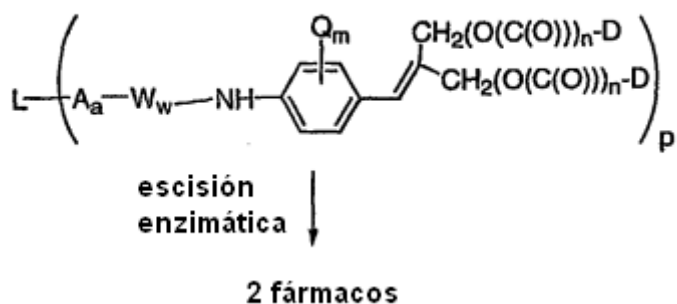
Esquema 3

5

en el que Q es -alquilo C_1-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -halógeno-, nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0-4; y p varía de 1 a aproximadamente 20.

10 Otros ejemplos de espaciadores autoinmolativos incluyen, pero no se limitan a, 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) y orto o para-aminobencilacetales. Se pueden usar espaciadores que experimentan ciclación tras la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas sustituidas y sin sustituir del ácido 4-aminobutírico (Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2, 223), sistemas de anillo biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] sustituidos apropiadamente (Storm, et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815) y amidas del ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990, 55, 5867). La eliminación de fármacos que contienen amina que están sustituidos en la posición a de la glicina (Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447) también son ejemplos de espaciador autoinmolativo útil en Compuestos a modo de Ejemplo.

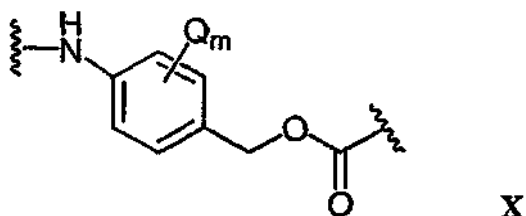
20 En una realización, la unidad Espaciadora es una unidad de bis(hidroximetil)estireno (BHMS) ramificado tal como se representa en el Esquema 4, que se puede usar para incorporar y liberar múltiples fármacos.

Esquema 4

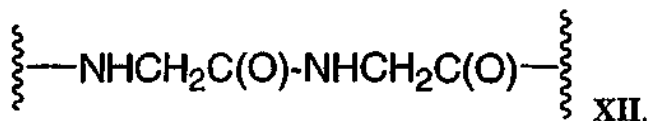
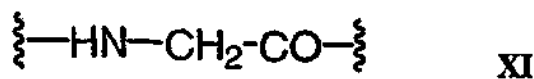
en el que Q es -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0-4; n es 0 o 1; y p varía de 1 a aproximadamente 20.

En una realización, los restos -D son los mismos. En otra realización más, los restos -D son diferentes.

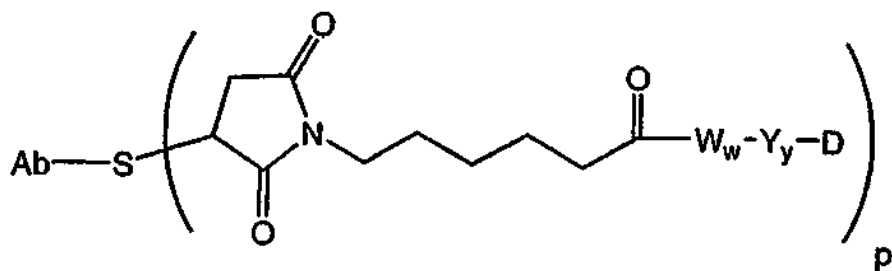
En un aspecto, las unidades Espaciadoras (-Y_y-) se representan con las Fórmulas (X)-(XII):



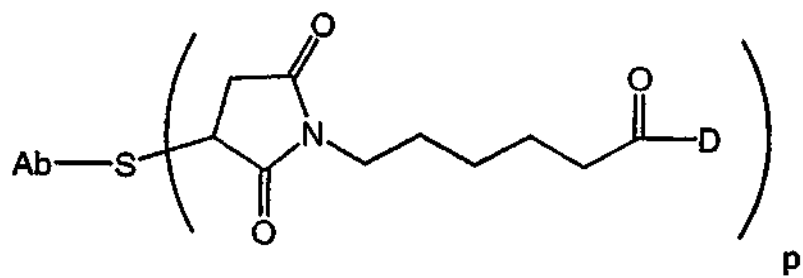
en la que Q es -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0-4;



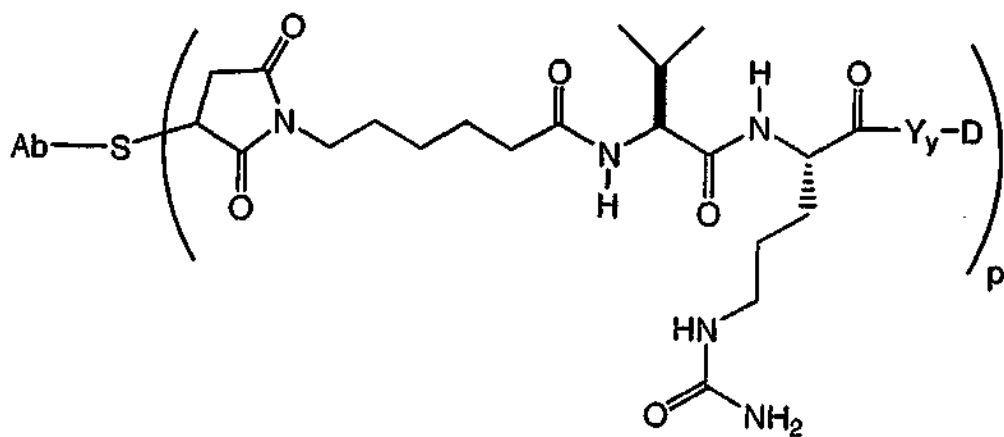
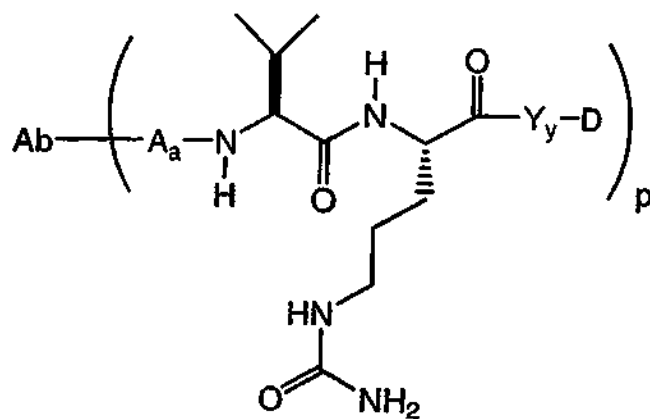
Realizaciones de los compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco de Fórmulas **la'** e **lc** incluyen:



y,

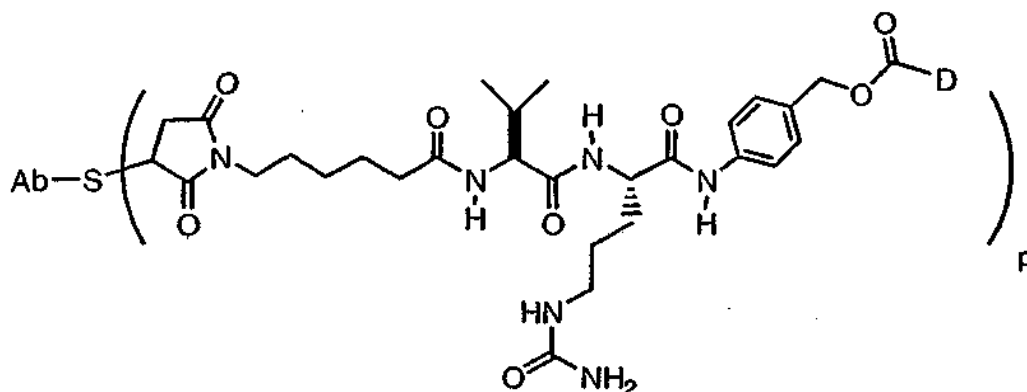


en la que w e y son cada uno 0,



5

y

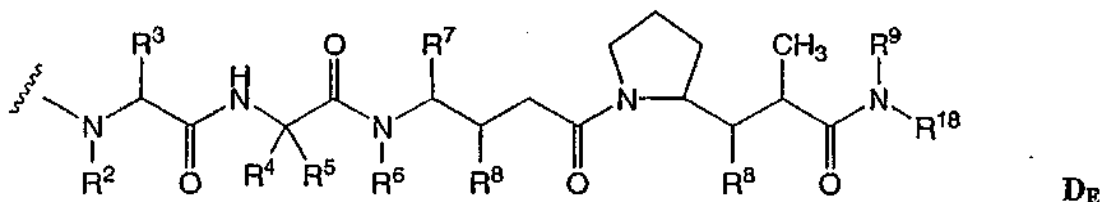


4.4 LA UNIDAD FÁRMACO (RESTO)

El resto de fármaco (D) de los conjugados de anticuerpo fármaco (ADC) son los del tipo dolastatina/auristatina (Patentes de Estados Unidos N° 5635483; N° 5780588) que se ha mostrado que interfieren con la dinámica de microtúbulos, hidrólisis de GTP, y división nuclear y celular (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents y Chemother. 45 (12): 3580-3584) y tienen actividad anticáncer (Patente de Estados Unidos N° 5663149) y antifúngica (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2961-2965).

D es una unidad de Fármaco (resto) que tiene un átomo de nitrógeno que puede formar un enlace con la unidad Espaciadora cuando $y = 1$ o 2 , con el grupo carboxilo C-terminal de una unidad de Aminoácido cuando $y = 0$, con el grupo carboxilo de una unidad Bastidor cuando w e $y = 0$, y con el grupo carboxilo de una unidad de Fármaco cuando a , w , e $y = 0$. se debe observar que las expresiones "unidad de fármaco" y "resto de fármaco" son sinónimos y se usan indistintamente en el presente documento. La unidad de fármaco tiene una estructura tal como se define en las reivindicaciones.

Además, en el presente documento se describen unidades de fármaco que tiene la fórmula **D_E**:



en la que, independientemente en cada posición:

R^2 se selecciona entre H y alquilo C_1-C_8 ;

R^3 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquilarilo C_1-C_8 , alquil C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 y alquil C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

R^4 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquilarilo C_1-C_8 , alquil C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 y alquil C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

R^5 se selecciona entre H y metilo;

o R^4 y R^5 forman de manera conjunta un anillo carbocíclico y tienen la fórmula $-(CR^aR^b)_n-$ en la que R^a y R^b se seleccionan independientemente entre H, alquilo C_1-C_8 y carbociclo C_3-C_8 y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6;

R^6 se selecciona entre H y alquilo C_1-C_8 ;

R^7 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquil C_1-C_8 -arilo, alquil C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 y alquil C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

cada R^8 se selecciona independientemente entre H, OH, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 y O-(alquilo C_1-C_8); R^9 se selecciona entre H y alquilo C_1-C_8 ;

R^{18} se selecciona entre $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -arilo, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(heterociclo C_3-C_8), y $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(carbociclo C_3-C_8); y

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

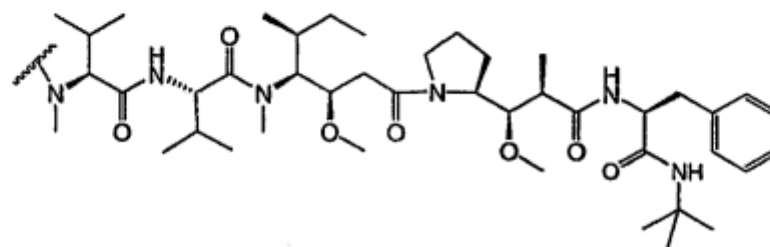
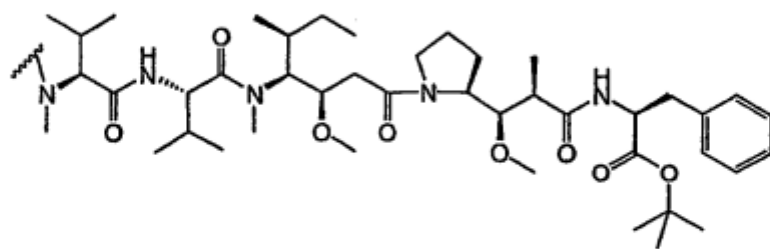
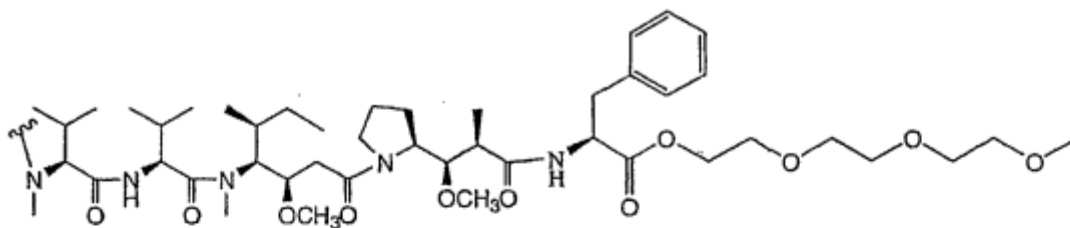
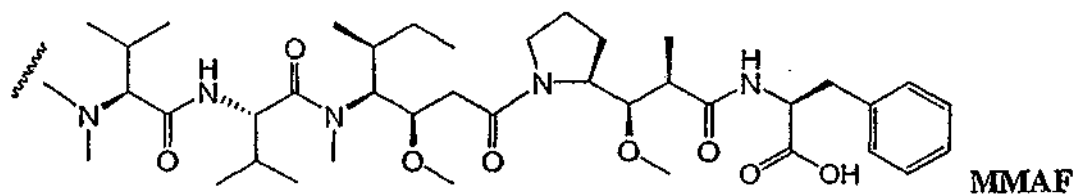
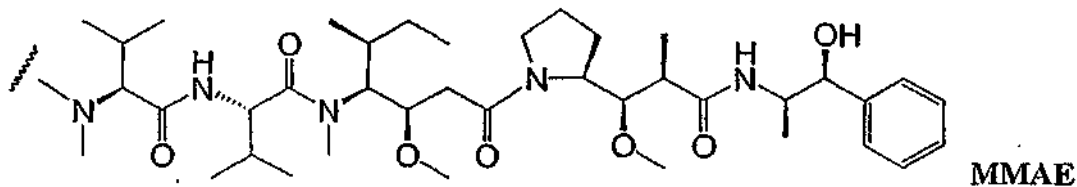
En un caso, R^3 , R^4 y R^7 son independientemente isopropilo o sec-butilo y R^5 es -H. En un caso modo de ejemplo, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^5 es H, y R^7 es sec-butilo.

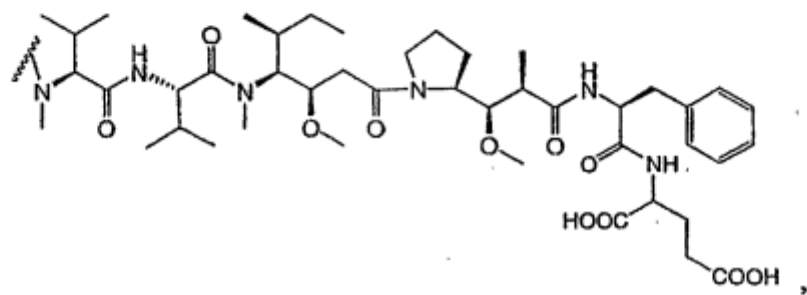
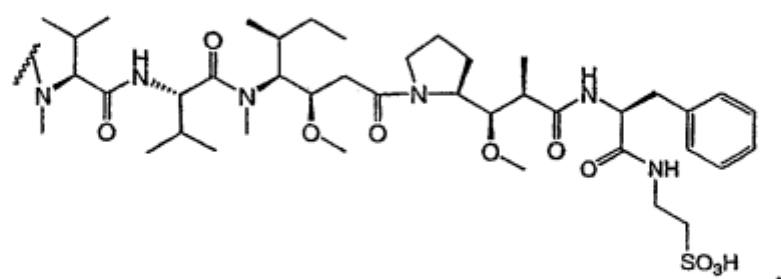
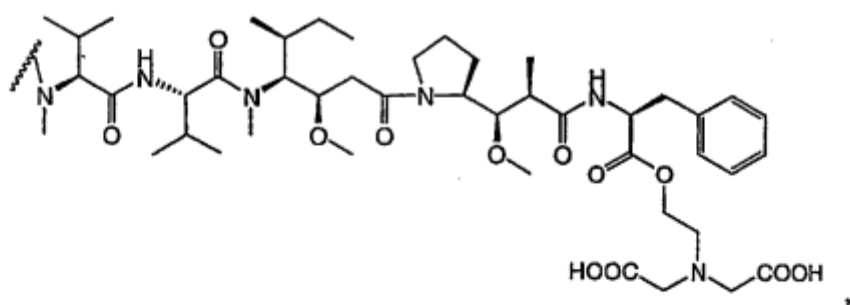
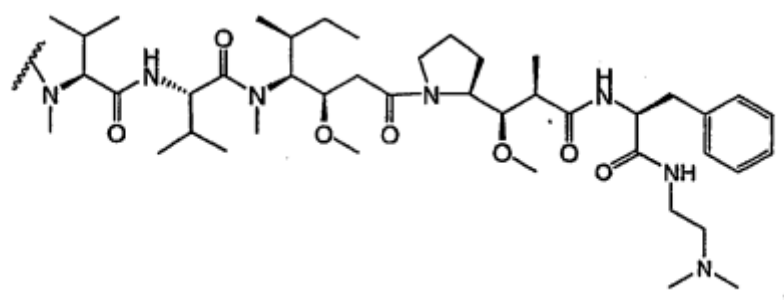
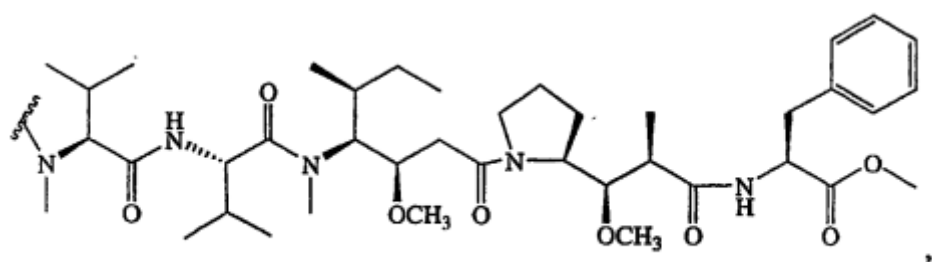
En otro caso, R^2 y R^6 son cada uno metilo, y R^9 es H.

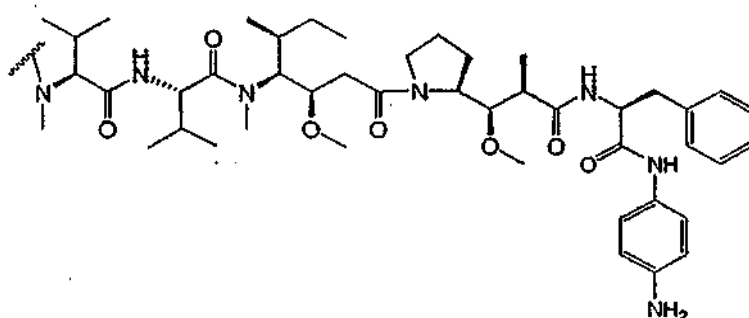
Además en otro caso, cada aparición de R^8 es $-OCH_3$.

En un caso a modo de ejemplo, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^2 y R^6 son cada uno metilo, R^5 es H, R^7 es sec-butilo, cada aparición de R^8 es $-OCH_3$, y R^9 es H.

Unidades de Fármaco (-D) a modo de ejemplo incluyen las unidades de fármaco que tiene las siguientes estructuras:







y sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de las mismas.

- 5 Tal como se describen en el presente documento, grupos hidróxidos, como tal pero no limitados a ésteres de trietilenglicol (TEG), como se ha mostrado anteriormente, se pueden unir a la Unidad de Fármaco en R¹¹. Sin quedar ligado a la teoría, los grupos hidrácidos ayudan en la internalización y no aglomeración de la Unidad de Fármaco.

4.5 LA UNIDAD DE LIGANDO

10 La unidad de Ligando (L-) incluye dentro de su alcance cualquier unidad de un Ligando (L) que se una o que se asocie de forma reactiva o que forme complejos con un receptor, antígeno u otro resto receptor asociado con una relación dada de células diana. Un Ligando es una molécula que se une a, forma complejos con, o reacciona con un resto de una población celular que se trata de modificar terapéuticamente o de otro modo biológicamente. En un
15 aspecto, la unidad de Ligando actúa para administrar la unidad de Fármaco a la población de células diana en particular con la que reacciona la unidad de Ligando. Dichos Ligandos incluyen, pero no se limitan a, proteínas de alto peso molecular tales como, por ejemplo, anticuerpos de longitud total, fragmento de anticuerpos, proteínas de peso molecular más pequeño, polipéptidos o péptidos, lectinas, glicoproteínas, no péptidos, vitaminas, moléculas transportadoras de nutrientes (tales como, pero no limitadas a, transferrina), o cualquier otra molécula o sustancia de unión a células.

Una unidad de Ligando puede formar un enlace con una unidad Bastidor, una unidad de Aminoácido, una Unidad Espaciadora, o una Unidad Fármaco. Una unidad de Ligando puede formar un enlace con una unidad de Conector a través de un heteroátomo del Ligando. Los heteroátomos que pueden estar presentes en una unidad de Ligando
25 incluyen azufre (en una realización, de un grupo sulfhidrilo de un Ligando), oxígeno (en una realización, de un grupo carbonilo, carboxilo o hidroxilo de un Ligando) y nitrógeno (en una realización, de un grupo amino primario o secundario de un Ligando). Estos heteroátomos pueden estar presentes en el Ligando en el estado natural del Ligando, por ejemplo un anticuerpo de origen natural, o se pueden introducir en el Ligando a través de modificación química.

30 En una realización, un Ligando tiene un grupo sulfhidrilo y el Ligando se une a la unidad de Conector a través del átomo de azufre del grupo sulfhidrilo.

En otro aspecto más, el Ligando tiene uno o más restos de lisina que se pueden modificar químicamente para introducir uno o más grupos sulfhidrilo. La unidad de Ligando se une a la unidad de Conector a través del átomo de
35 azufre del grupo sulfhidrilo. Los reactivos que se pueden usar para modificar lisinas incluyen, pero no se limitan a, S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA) y Clorhidrato de 2-iminotiolano (Reactivo de Traut).

En otra realización, el Ligando puede tener uno o más grupos de hidrato de carbono que se puede modificar químicamente para que tengan uno o más grupos sulfhidrilo. La unidad de Ligando se une a la Unidad de Conector, tal como la Unidad Bastidor, a través del átomo de azufre del grupo sulfhidrilo.

En otra realización más, el Ligando puede tener uno o más grupos de hidratos de carbono que se pueden oxidar para proporcionar un grupo aldehído (-CHO) (véase, *por ejemplo* Laguzza, et al., J. Med. Chem. 1989, 32 (3), 548-55). El aldehído correspondiente puede formar un enlace con un Sitio Reactivo en un Bastidor. Los sitios reactivos en un Bastidor que pueden reaccionar con un grupo carbonilo en un Ligando incluyen, pero no se limitan a, hidrazina e hidroxilamina. Otros protocolos para la modificación de proteínas para la unión o asociación de Unidades de Fármaco se describen en Coligan et al., Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley & Sons (2002), que se incorpora en el presente documento por referencia.

50 Ligandos útiles no inmunoreactivos de proteína, polipéptido, o péptido incluyen, pero no se limitan a, transferrina, factores de crecimiento epidérmico ("EGF"), bombesina, gastrina, péptido de liberación de gastrina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, IL-2, IL-6, factores de crecimiento transformantes ("TGF"), tales como TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento de vaccinia ("VGF"), factores de crecimiento I y II insulínicos y de tipo insulínico,

lectinas y apoproteína de lipoproteína de baja densidad.

Los anticuerpos policlonales útiles son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo que provienen de los sueros de animales inmunizados. Se pueden usar diversos procedimientos bien conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales para un antígeno de interés. Por ejemplo, para la producción de anticuerpos policlonales, diversos animales huésped se pueden inmunizar por inyección con un antígeno de interés o derivado del mismo, que incluyen, pero no se limitan a, conejos, ratones, ratas, y cobayas. Se pueden usar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de las especies huéspedes, e incluyen pero no se limitan a adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas de superficie tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Dichos adyuvantes también son bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales útiles son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un determinante antigénico en particular (*por ejemplo*, un antígeno de célula cancerosa, un antígeno viral, un antígeno microbiano, una proteína, un péptido, un hidrato de carbono, un agente químico, ácido nucleico, o fragmentos de los mismos). Un anticuerpo monoclonal (mAb) para un antígeno de interés se puede preparar usando cualquier técnica conocida en la materia que proporciona para la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridomas que se describió originalmente en Köhler y Milstein (1975, *Nature* 256, 495-497), la técnica de hibridomas de linfocitos B humanos (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4: 72), y la técnica de hibridomas de EBV (Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96). Dichos anticuerpos pueden ser de una clase de inmunoglobulinas que incluyen IgG, IgM, IgE, IgA, e IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce los mAb rehusó la presente invención se pueden cultivar *in vitro* o *in vivo*.

Los anticuerpos monoclonales útiles incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados, fragmento de anticuerpos, o anticuerpos monoclonales quiméricos humano-ratón (u otras especies). Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden tratar mediante cualquiera de numerosas técnicas bien conocidas en la materia (*por ejemplo*, Teng et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 7308-7312; Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4, 72-79; y Olsson et al., 1982, *Meth. Enzymol.* 92, 3-16).

El anticuerpo también puede ser un anticuerpo biespecífico. En la técnica se conocen métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud total se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein et al., 1983, *Nature* 305: 537-539). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas diferentes de anticuerpo, de las que solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. Procedimientos similares se desvelan en la Publicación Internacional Nº WO 93/08829, y en Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se condensan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones C_{H2}, y C_{H3}, bisagra. Es preferente que la primera región constante de cadena pesada (C_{H1}) que contiene el sitio necesario para unión a la cadena ligera, esté presente en al menos una de las fusiones. Los ácidos nucleicos con secuencias que codifican las fusiones de cadenas pesadas de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Ésto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación para dos o todas las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado altos rendimientos cuando las relaciones no son particularmente significativas.

En una realización de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos tienen una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama, y un par híbrido de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina (que proporciona una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina solamente en una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo de separación fácil (Publicación Internacional Nº WO 94/04690) que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Para detalles adicionales para generar anticuerpos biespecíficos véanse, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 1986, 121: 210; Rodrigues et al., 1993, *J. of Immunology* 151: 6954-6961; Carter et al., 1992, *Bio/Technology* 10: 163-167; Carter et al., 1995, *J. of Hematotherapy* 4: 463-470; Merchant et al., 1998, *Nature*

Biotechnology 16: 677-681. Usando dichas técnicas, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades tal como se define en el presente documento.

Además, se describen anticuerpos bifuncionales, en Publicación de Patente Europea N° EPA 0 105 360. Tal como se desvela en esta referencia, los anticuerpos híbridos o bifuncionales se pueden derivar biológicamente, es decir, mediante técnicas de fusión celular, o químicamente, especialmente con agentes de reticulación o reactivos formadores de puentes disulfuro, y puede comprender anticuerpos enteros o fragmentos de los mismos. Métodos para obtener dichos anticuerpos híbridos se desvelan por ejemplo, en la Publicación Internacional WMO 83/03679, y en la Publicación de Patente Europea N° EPA 0 217 577, ambas de las cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

El anticuerpo puede ser un fragmento, derivado o análogo funcionalmente activo de un anticuerpo que se une de forma y específica a antígenos de células cancerosas, antígenos virales, o antígenos microbianos u otros anticuerpos unidos a células o matrices tumorales. A este respecto, "funcionalmente activo" se refiere a que el fragmento, derivado o análogo es capaz de obtener anticuerpos anti-anti-idiotipo que reconocen el mismo antígeno que el anticuerpo a partir del que el fragmento, derivado o análogo se deriva o se reconoce. De forma específica, en una realización a modo de ejemplo, la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina se puede potenciar por supresión de las secuencias marco y CDR que son C-terminales a la secuencia CDR que reconoce específicamente al antígeno. Para determinar que secuencias de CDR se unen al antígeno, se pueden usar péptidos sintéticos que contienen las secuencias CDR en ensayos de unión con el antígeno mediante cualquier método de ensayo de unión conocido en la técnica (*por ejemplo*, el ensayo de núcleos BIA) (Véase, *por ejemplo*, Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, Md; Kabat E et al., 1980, J. of Immunology 125 (3): 961-969).

Otros anticuerpos útiles incluyen fragmentos de anticuerpos tales como, pero no limitados a, fragmentos de $F(ab')_2$, que contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada que se pueden producir por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y fragmentos de Fab, que se pueden generar por reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos de $F(ab')_2$. Otros anticuerpos útiles son dímeros de cadena pesada y de cadena ligera de anticuerpos, o cualquier fragmento mínimo de los mismos tales como Fvs o anticuerpos de una sola cadena single (SCA) (*por ejemplo*, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4946778; Bird, 1988, Science 242: 423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; y Ward et al., 1989, Nature 334: 544-54), o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo.

Además, anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones tanto humanas como no humanas, que se pueden producir usando técnicas de ADN recombinante convencionales, son anticuerpos útiles. Un anticuerpo quimérico una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de regiones constantes de inmunoglobulina monoclonal de murino y humana. (Véase, *por ejemplo*, Cabilly et al., Patente de Estados Unidos N° 4816567; y Boss et al., Patente de Estados Unidos N° 4,816397, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad). País que inicia los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones de determinación de la complementariedad (CDR) de las especies no humanas y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana. (Véase, *por ejemplo*, Queen, Patente de Estados Unidos N° 5.585.089, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo usando métodos que se describen en la Publicación Internacional N° WO 87/02671; Publicación de Patente Europea N° 184.187; Publicación de Patente Europea N° 171496; Publicación de Patente Europea N° 173494; Publicación Internacional N° WO 86/01533; Patente de Estados Unidos N° 4816567; Publicación de Patente Europea N° 12.023; Berter et al., 1988, Science 240: 1041-1043; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139: 3521-3526; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218; Nishimura et al., 1987, Cancer. Res. 47: 999-1005; Wood et al., 1985, Nature 314: 446-449; y Shaw et al., 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559; Morrison, 1985, Science 229: 1202-1207; Oi et al., 1986, BioTechniques 4: 214; Patente de Estados Unidos N° 5225539; Jones et al., 1986, Nature 321: 552-525; Verhoeven et al. (1988) Science 239: 1534; y Beidler et al., 1988, J. Immunol. 141: 4053-4060; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables y se pueden producir usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes endógenos de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, pero que pueden expresar genes humanos de cadena pesada y ligera. Los ratones transgénicos e inmunizan de la forma habitual con un antígeno seleccionado, *por ejemplo*, toda o una porción de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno se pueden obtener usando tecnología convencional de hibridomas. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados en los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de linfocitos B, y posteriormente experimentan intercambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión de conjunto de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93). Para un análisis detallado de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y

anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, *por ejemplo*, las Patentes de Estados Unidos N° 5625126; N° 5633425; N° 5569825; N° 5661016; N° 5545806; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Los anticuerpos humanos pueden obtener en el mercado en, por ejemplo, Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Genpharm (San Jose, CA).

Los anticuerpos totalmente humanos que reconocen un epítipo seleccionado se pueden generar usando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se usa para guiar la selección de un anticuerpo totalmente humano que reconoce el mismo epítipo. (Jespers et al. (1994) *Biotechnology* 12: 899-903). Los anticuerpos humanos tales se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la materia, que incluyen bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991); Quan, M. P. y Carter, P. 2002. The rise of monoclonal antibodies as therapeutics. In *Anti-IgE and Allergic Disease*, Jardieu, P. M. y Fick Jr., R. B, eds., Marcel Dekker, Nueva York, NY, Capítulo 20, páginas 427-469).

En otras realizaciones, el anticuerpo es una proteína de fusión de un anticuerpo, o un fragmento funcionalmente activo de la misma, por ejemplo en la que el anticuerpo se funde a través de un enlace covalente (*por ejemplo*, un enlace peptídico), del extremo N o al extremo C a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o porción de la misma, preferentemente al menos 10, 20 o 50 porciones de aminoácidos de una proteína) que no son el anticuerpo. Preferentemente, el anticuerpo o fragmento del mismo se une covalentemente a la otra proteína en el extremo N del dominio constante.

Los anticuerpos incluyen análogos y derivados que están modificados, *es decir*, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula siempre y cuando dicha unión covalente permita que el anticuerpo retenga su inmunoespecificidad de unión a antígenos. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados y análogos de los anticuerpos incluyen los que se han modificado adicionalmente, *por ejemplo*, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a una unidad de anticuerpo celular u otra proteína, etc. Se puede realizar cualquiera de numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc. Además, el análogo derivado por contener uno o más aminoácidos no naturales.

Los anticuerpos incluyen anticuerpos que tienen modificaciones (*por ejemplo*, sustituciones, supresiones o adiciones) en restos de aminoácidos que interactúan con receptores Fc. En particular, los anticuerpos incluyen anticuerpos que tienen modificaciones en restos de aminoácidos que se identifican como implicados en la interacción entre el dominio anti-Fc y el receptor FcRn (véase, *por ejemplo*, Publicación Internacional N° WO 97/34631, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). Los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa se pueden obtener en el mercado, por ejemplo, en Genentech (San Francisco, CA) o se pueden producir mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, *por ejemplo*, técnicas de síntesis química o de expresión recombinante. La secuencia de nucleótidos que codifica anticuerpos y específicos para un antígeno de célula cancerosa se puede obtener, *por ejemplo*, a partir de la base de datos de GenBank o una base de datos similar a ésta, las publicaciones de bibliografía, o mediante clonación y secuenciación de rutina.

En una realización específica, se pueden usar anticuerpos conocidos para el tratamiento o prevención del cáncer. Se pueden obtener anticuerpos específicos para un antígeno de célula cancerosa en el mercado coproducir mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, *por ejemplo*, técnicas de expresión recombinante. La secuencia de nucleótidos que codifica anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa se puede tener, *por ejemplo*, a partir de la base de datos de GenBank o una base de datos similar a ésta, las publicaciones de bibliografía, o mediante clonación y secuenciación de rutina. Ejemplos de anticuerpos disponibles para el tratamiento del cáncer incluyen, pero no se limitan a, anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado, HERCEPTIN® (trastuzumab; Genentech) para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico; RITUXAN® (rituximab; Genentech) que es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin; OvaRex (AltaRex Corporation, MA) que es un anticuerpo de murino para el tratamiento de cáncer de ovarios; Panorex (Glaxo Wellcome, NC) que es un anticuerpo IgG_{2a} de murino para el tratamiento de cáncer colorrectal; Cetuximab Erbitux (Imclone Systems Inc., NY) que es un anticuerpo quimérico IgG anti-EGFR para el tratamiento de cánceres positivos para el factor de crecimiento epidérmico, tales como cáncer de cabeza y cuello; Vitaxin (MedImmune, Inc., MD) que es un anticuerpo humanizado para el tratamiento de sarcoma; Campath I/H (Leukosite, MA) que es un anticuerpo IgG₁ humanizado para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica (CLL); Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado para el tratamiento de leucemia mieloide aguda (AML); LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ) que es un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado para el tratamiento de linfoma no Hodgkin; Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo anti-HLA-DR humanizado para el tratamiento de linfoma no Hodgkin; Oncolym (Techniclone, Inc., CA) que es un anticuerpo anti-HLA-Dr10 de murino radiomarcado para el tratamiento de linfoma no Hodgkin; Allomune (BioTransplant, CA) es un mAb anti-CD2 humanizado para el tratamiento de Enfermedad de Hodgkin o linfoma no Hodgkin; Avastin (Genentech, Inc., CA) que es un anticuerpo humanizado anti-VEGF para el tratamiento de cánceres de pulmón y colorrectales; Epratuzamab (Immunomedics, Inc., NJ and Amgen, CA) que es un

anticuerpo anti-CD22 para el tratamiento de linfoma no Hodgkin; y CEAcide (Immunomedics, NJ) que es un anticuerpo anti-CEA humanizado para el tratamiento de cáncer colorrectal.

Otros anticuerpos útiles en el tratamiento del cáncer incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos frente a los siguientes antígenos: CA125 (ovarios), CA15-3 (carcinomas), CA19-9 (carcinomas), L6 (carcinomas), Lewis Y (carcinomas), Lewis X (carcinomas), alfa fetoproteína (carcinomas), CA 242 (colorrectal), fosfatasa alcalina placentaria (carcinomas), antígeno específico de próstata (próstata), fosfatasa ácida prostática (próstata), factor de crecimiento epidérmico (carcinomas), MAGE-1 (carcinomas), MAGE-2 (carcinomas), MAGE-3 (carcinomas), MAGE-4 (carcinomas), receptor de anti-transferrina (carcinomas), p97 (melanoma), MUC1-KLH (cáncer de mama), CEA (colorrectal), gp100 (melanoma), MART1 (melanoma), PSA (próstata), IL-2 receptor (leucemia y linfomas de linfocitos T), CD20 (linfoma no Hodgkin), CD52 (leucemia), CD33 (leucemia), CD22 (linfoma), gonadotropina coriónica humana (carcinoma), CD38 (mieloma múltiple), CD40 (linfoma), mucina (carcinomas), P21 (carcinomas), MPG (melanoma), y producto oncogénico Neu (carcinomas). Algunos anticuerpos útiles, específicos incluyen, pero no se limitan a, mAb BR96 (Trailo, P. A., Willner, D. Lasch, S. J., Henderson, A. J., Hofstead, S. J., Casazza, A. M., Firestone, R. A., Hellström, I., Hellström, K. E., "Cure of Xenografted Human Carcinomas by BR96-Doxorubicin Immunoconjugates" Science 1993, 261, 212-215), BR64 (Trailo, P. A., Willner, D., Knipe, J., Henderson, A. J., Lasch, S. J., Zoeckler, M. E., Trailsmith, M. D., Doyle, T. W., King, H. D., Casazza, A. M., Braslawsky, G. R., Brown, J. P., Hofstead, S. J., (Greenfield, R. S., Firestone, R. A., Mosure, K., Kadow, D. F., Yang, M. B., Hellstrom, K. E., y Hellstrom, I. "Effect of Linker Variation on the Stability, Potency, and Efficacy of Carcinoma-reactive BR64-Doxorubicin Immunoconjugates" Cancer Research 1997, 57, 100-105, mAb frente al antígeno CD40, tales como mAb S2C6 (Francisco, J. A., Donaldson, K. L., Chace, D., Siegal, C. B., y Wahl, A. F. "Agonistic properties and in vivo antitumor activity of the anti-CD-40 antibody, SGN-14" Cancer Res. 2000, 60, 3225-3231), mAb frente al antígeno CD70, tales como mAb 1F6 y mAb 2F2, y mAb frente al antígeno CD30, tales como AC10 (Bowen, M. A., Olsen, K. J., Cheng, L., Avila, D., y Podack, E. R. "Functional effects of CD30 on a large granular lymphoma cell line YT" J. Immunol., 151, 5896-5906, 1993; Wahl et al., 2002 Cancer Res. 62 (13): 3736-42). Se pueden usar otros muchos anticuerpos de internalización que se unen a antígenos asociados a tumores y se han revisado (Franke, A. E., Sievers, E. L., y Scheinberg, D. A., "Cell surface receptor-targeted therapy of acute myeloid leucemia: a review" Cancer Biother Radiopharm. 2000, 15, 459-76; Murray, J. L., "Monoclonal antibody treatment of solid tumors: a coming of age" Semin Oncol. 2000, 27, 64-70; Breitling, F., y Dubel, S., Recombinant Antibodies, John Wiley, y Sons, Nueva York, 1998).

En determinadas realizaciones, el anticuerpo no es Trastuzumab (anti-HER2 humanizado, de longitud total, (PM 145167)), Herceptina F(ab')₂ (derivado de anti-HER2 enzimáticamente (PM 100000)), 4D5 (antiHER2 de murino, de longitud total, de hibridoma), rhu4D5 (anticuerpo humanizado de longitud total, expresado de forma transitoria), rhuFab4D5 (Fab humanizado recombinante (PM 47738)), 4D5Fc8 (antiHER2 de murino, de longitud total, con dominio de unión a FcRn mutado), o Hg (4D5 humanizado de longitud total "sin bisagra", con cisteínas bisagra de cadena pesada mutadas a serinas. Expresadas en E. coli (por lo tanto no glicosiladas)).

En otra realización específica, se usan anticuerpos conocidos para el tratamiento de la prevención de una enfermedad autoinmune de acuerdo con las composiciones y métodos de la invención. Anticuerpos inmuno-específicos para un antígeno de una célula que es responsable de la producción de anticuerpos autoinmunes se pueden obtener a partir de cualquier organización (*por ejemplo*, una universidad científica o una empresa) o reducir mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, *por ejemplo*, técnicas de síntesis química o de expresión recombinante. En otra realización, los anticuerpos útiles son inmuno-específicos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes e incluyen, pero no se limitan a, Anticuerpo Anti-Nuclear; ADN Anti-ds; ADN Anti-ss, Anticuerpo IgM Anti-Cardiolipina, IgG; Anticuerpo IgM Anti-Fosfolípido, IgG; Anticuerpo Anti-SM; Anticuerpo Anti-Mitocondrial; Anticuerpo Tiroideo; Anticuerpo Microsómico; Anticuerpo Tiroglobulina; Anti-SCL-70; Anti-Jo; Anti-U₁RNP; Anti-La/SSB; Anti SSA; Anti-SSB; Anticuerpo de Células Anti-Parietales; Anti-Histonas; Anti-RNP; C-ANCA; P-ANCA; Anti centrómero; Anti-Fibrilarina, y Anticuerpo Anti-GBM.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos útiles se pueden unir tanto a un receptor como un complejo receptor expresado en un linfocito activado. El receptor el complejo receptor puede comprender un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulina, un miembro de la superfamilia receptores TNF, una integrina, un receptor de citoquinas, un receptor quimioquinas, una proteína de histocompatibilidad principal, una lectina, o una proteína de control de complementos. Los ejemplos no limitantes de miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas adecuados son CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD22, CD28, CD79, CD90, CD152/CTLA-4, PD-1, e ICOS. Ejemplos no limitantes de miembros de la superfamilia de receptores TNF son CD27, CD40, CD95/Fas, CD134/OX40, CD137/4-1BB, TNF-R1, TNFR-2, RANK, TACI, BCMA, osteoprotegerina, Apo2/TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, y APO-3. Ejemplos no limitantes de integrinas adecuadas son CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD41, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD103, y CD104. Ejemplos no limitantes de lectinas adecuada son lectina de tipo C, de tipo S, y de tipo 1.

En una realización, el Ligando se une a un linfocito activado que está asociado con una enfermedad autoinmune.

En otra realización específica, los Ligandos inmuno-específicos útiles para un antígeno viral o microbiano son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados o

humanos. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "antígeno viral" incluye, pero no se limita a, cualquier péptido viral, proteína polipeptídica (*por ejemplo*, VIH gp120, VIH nef, glicoproteína RSV F, virus de la gripe neuraminidasa, hemaglutinina del virus de la gripe, HTLV tax, glicoproteína del virus del herpes simplex (*por ejemplo*, gB, gC, gD, y gE) y antígeno de superficie de hepatitis B) que es capaz de provocar una respuesta inmune.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "antígeno microbiano" incluye pero no se limita a, cualquier péptido microbiano, polipéptido, proteína, sacárido, polisacárido, o molécula de lípido (*por ejemplo*, un polipéptido bacteriano, fúngico, protozoo patógeno, o levadura que incluye, *por ejemplo*, polisacárido 5/8 LPS y capsular) que es capaz de provocar una respuesta inmune.

Los anticuerpos inmuno-específicos para un agente viral o microbiano se pueden obtener en el mercado, *por ejemplo*, en BD Biosciences (San Francisco, CA), Chemicon International, Inc. (Temecula, CA), o Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA) o producir mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal y como, *por ejemplo*, técnicas de síntesis química o de expresión recombinante. La secuencia de nucleótidos que codifica anticuerpos que son inmuno-específicos para un agente viral o microbiano se puede obtener, *por ejemplo*, a partir de la base de datos de GenBank o una base de datos similar a ésta, publicaciones de bibliografía, o mediante clonación y secuenciación de rutina.

En una realización específica, útiles Ligandos son los que son útiles para el tratamiento con la prevención de una infección vírica o microbiana de acuerdo con los métodos que se desvelan en el presente documento. Ejemplos de anticuerpos disponibles útiles para el tratamiento de sección vírica o infección bacteriana incluyen, pero no se limitan a, SYNAGIS (MedImmune, Inc., MD) que es un anticuerpo monoclonal de virus sincitial anti-respiratorio humanizado (RSV) útil para el tratamiento de pacientes con infección por RSV; PRO542 (Progenics) que es un anticuerpo de fusión de CD4 útil para el tratamiento de infección por VIH; OSTAVIR (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo humano útil para el tratamiento de virus de la hepatitis B; PROTOVIR (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo IgG₁ humanizado útil para el tratamiento de citomegalovirus (CMV); y anticuerpos anti-LPS.

Otros anticuerpos útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos frente a los antígenos de cepas patogénicas de bacterias (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenas*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* (*Vibrio*) *fetus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertense*, *Treponema carateum*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia tsutsugumushi*, *Chlamydia* spp.); hongos patógenos (*Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*); protozoa (*Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Pneumocystis pneumonia*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*); o Helmintos (*Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, y anquilostomas).

Otros anticuerpos útiles en la presente invención para el tratamiento de enfermedades víricas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos frente a antígenos del virus patógenos, que incluyen como ejemplos y no como limitación: Poxviridae, Herpesviridae, virus 1 del Herpes Simplex, virus 2 del Herpes Simplex, Adenoviridae, Papovaviridae, Enteroviridae, Picornaviridae, Parvoviridae, Reoviridae, Retroviridae, virus de la gripe, virus de parainfluenza, paperas, sarampión, virus sincitial respiratorio, rubéola, Arboviridae, Rhabdoviridae, Arenaviridae, virus de la Hepatitis A, virus de la Hepatitis B, virus de la Hepatitis C, virus de la Hepatitis E, virus de la Hepatitis No A/No B, Rhinoviridae, Coronaviridae, Rotoviridae, y Virus de Inmunodeficiencia Humana.

En intentos para descubrir dianas celulares eficaces para diagnósticos y terapia de cáncer, los investigadores han buscado identificar polipéptidos transmembrana o asociados de otro modo a tumores que se expresan específicamente en la superficie de uno o más tipos de cáncer en particular en comparación con una o más células no cancerosas normales. A menudo, dichos polipéptidos asociados a tumores se expresan más abundantemente la superficie de las células cancerosas en comparación con la expresión en la superficie de las células no cancerosas. La identificación de dichos polipéptidos antígenicos de superficie celular asociada a tumores ha dado lugar a la capacidad de dirigir específicamente células cancerosas para destrucción través de terapias basadas en anticuerpos.

Los anticuerpos que comprenden Ab en conjugados de anticuerpo y fármaco de Fórmula Ic (ADC) y que pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos frente a antígenos asociados a tumores (TAA). Dichos antígenos asociados a tumores son conocidos en la técnica, y se pueden preparar para su uso en la generación de anticuerpos usando métodos e información que son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de TAA incluyen (1)-(35), pero no se limitan a TAA (1)-(35) que se indican a continuación. Por conveniencia, la información

con respecto a estos antígenos, todos los cuales son conocidos en la técnica, se enumeran a continuación e incluye nombres, nombres alternativos, números de acceso en Genbank y referencia o referencias primarias. Los antígenos asociados a tumores dirigidos por anticuerpos incluyen todas las variantes secuencias de aminoácidos que isoformas que poseen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, o un 95 % con respecto a las secuencias identificadas en las correspondientes secuencias enumeradas (SEC ID N^o: 1-35) o las secuencias identificadas en las referencias citadas. En algunas realizaciones, TAA que tiene variantes de secuencia de aminoácidos es capaz de unirse específicamente un anticuerpo que se une específicamente a los TAA con la correspondiente secuencia enumerada. Las secuencias y divulgación mencionadas específicamente en el presente documento se incorporan expresamente por referencia.

ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMORES (1)-(35):

BMPIR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB, N^o de acceso en Genbank NM_001203, ten Dijke, P., et al. Science 264 (5155): 101-104 (1994), Oncogene 14 (11): 1377-1382 (1997)); documento WO2004063362 (Reivindicación 2); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); US2003134790-A1 (Páginas 38-39); documento WO2002102235 (Reivindicación 13; Página 296); documento WO2003055443 (Páginas 91-92); documento WO200299122 (Ejemplo 2; Páginas 528-530); documento WO2003029421 (Reivindicación 6); documento WO2003024392 (Reivindicación 2; Fig 112); documento WO200298358 (Reivindicación 1; Página 183); documento WO200254940 (Páginas 100-101); documento WO200259377 (Páginas 349-350); documento WO200230268 (Reivindicación 27; Página 376); documento WO200148204 (Ejemplo; Fig 4) receptor de proteína morfogenética ósea NP_001194, tipo IB /pid = NP_001194.1 – Referencias cruzadas: MIM:603248; NP_001194.1; NM_001203_1

502 aa

MLLSAGKLVGTTKEDGESTAPTTPRPKVLRCCHHHCPEDSVNNICSTDGYCFTMIEED
 DSGLPVVTSGCLGLEGSDFQCRDTPIPHQRRSIECCTERNECNKDLHPTLPPLKNRDFVD
 GPIHHRALLISVTVCSLLLVLIIILFCYFRYKRQETRPYSIGLEQDETYIPPGESLRDLI
 EQSQSSGSGSGLPLLQRTIAKQIQMVQKIGKGRYGEVWMGKWRGEKVAVKVFFTTTEEAS
 WFRETEIYQTVLMRHNILGFIAADIKGTGSWTQLYLIITDYHENGSLYDYLKSTTLDAKS
 MLKLAYSSVSGLCHLHTEIFSTQGKPAIAHRDLKSKNILVKKNGTCCADLGLAVKFISD
 TNEVDIPPNTRVGTGRYMPPEVLDES LN RNHFQSYIMADMYSFGLILWEVARRCVSGGIV
 EEYQLPYHDLVPSDPSYEDMREIVCICKLRPSFPNRWSSDECLRQMGKLMTECWAHNPAS
 RLTA LR VKKTLAKMSESQDIKL

(SEC ID N^o: 1)

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, N^o de acceso en Genbank NM_003486); Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999), Nature 395 (6699): 288-291 (1998), Gaugitsch, H.W., et al. (1992) J. Biol. Chem. 267 (16): 11267-11273; documento WO2004048938 (Ejemplo 2); documento WO2004032842 (Ejemplo IV); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento WO2003016475 (Reivindicación 1); documento WO200278524 (Ejemplo 2); documento WO200299074 (Reivindicación 19; Páginas 127-129); documento WO200286443 (Reivindicación 27; Páginas 222,393); documento WO2003003906 (Reivindicación 10; Página 293); documento WO200264798 (Reivindicación 33; Página 93-95); documento WO200014228 (Reivindicación 5; Páginas 133-136); US2003224454 (Fig 3); documento WO2003025138 (Reivindicación 12; Página 150); familia 7 de vehículos de soluto NP_003477 (transportador catiónico de aminoácidos, sistema y+), miembro 5 /pid = NP_003477.3 – Referencias cruzadas de Homo sapiens: MIM:600182; NP_003477.3; NM_015923; NM_003486_1

507 aa

MAGAGPKRRALAAPAAEEKEEAREKMLAAKSADGSAPAGEGEGVTLQRNITLLNGVAIIV
 GTIIGSGIFVTPTGVLKEAGSPGLALVVWAACGVFSIVGALCYAELGTTISKSGGDYAYM
 LEVYGSLPAFLKLWIELLIIRPSSQYIVALVFATYLLKPLFPTCPVPEEAAKLVAACLCVL
 LLTAVNCYSVKAATRVQDAFAAAKLLALALIILLGFVQIGKGVVSNLDPNFSFEGTKLDV
 GNIVLALYSGLFAYGGWNYLNFVTEEMINPYRNLPLAIIISLPVTLVYVLTNLAYFTTL
 STEQMLSSEAVAVDFGNHYHLGVMSWIIIPVFVGLSCFGSVNGSLFTSSRLFFVGSREGHLP
 SILSMIHPQLLTPVPSLVFTCVMTLLYAFSKDIFSVINFFSFFNWLCVALAIGMIWLRH
 RKPelerPIKVNALPVFFILACLFLIAVSFWKTPVECGIGFTIILSGLEPVYFFGVWWKN
 KPKWLLQGIFSTTVLCQKLMQVVPQET

(SEC ID N°: 2)

(3) STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata, N° de acceso en Genbank NM_012449

5 Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96 (25): 14523-14528);

documento WO2004065577 (Reivindicación 6); documento WO2004027049 (Fig 1L); documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento WO2004016225 (Reivindicación 2);

10 documento WO2003042661 (Reivindicación 12); US2003157089 (Ejemplo 5); US2003185830 (Ejemplo 5); US2003064397 (Fig 2); documento WO200289747 (Ejemplo 5; Páginas 618-619); documento WO2003022995 (Ejemplo 9; Fig 13A, Ejemplo 53; Páginas 173, Ejemplo 2; Fig 2A);

antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata NP_036581

Referencias cruzadas: MIM:604415; NP_036581.1; NM_012449_1

339 aa

MESRKDITNQEELWKMKPRRNLEEDDYLHKDTGETSMLKRPVLLHLHQTAHADEFDCPSE
 LQHTQELFPQWHLPIKIAAIIASLTFLYTLREVIHPLATSHQQYFYKIPILVINKVLPM
 VSITLLALVYLPGVIAAIVQLHNGTKYKKFPHWLDKWMLTRKQFGLLSFFFVAVLHAIYSL
 SYPMRRSYRYKLLNWAYQQVQONKEDAWIEHDVWRMEIYVSLGIVGLAILALLAVTSIPS
 VSDSLTWREFHYIQSKLGIVSLLLGTIHALIFAWNKWIDIKQFVWYTPPTFMIAVFLPIV
 VLIFKSILFLPCLRKKILKIRHGVEDVTKINKTEICSQL

(SEC ID N°: 3)

15

(4) 0772P (CA125, MUC16, N° de acceso en Genbank AF361486

J. Biol. Chem. 276 (29): 27371-27375 (2001)); documento WO2004045553 (Reivindicación 14); documento WO200292836 (Reivindicación 6; Fig 12); documento WO200283866 (Reivindicación 15; Páginas 116-121);

20 documento US2003124140 (Ejemplo 16); documento US2003091580 (Reivindicación 6); documento WO200206317 (Reivindicación 6; Páginas 400-408);

Referencias cruzadas: GI:34501467; AAK74120.3; AF361486_1

6995 aa

PVTSLLTPLGLVITTDRLMGISREPGTSSSTSNLSSTSHERLTTLEDTVDTEAMQPSTHTAVT
 NVRTSISGHESQSSVLSSETPKATSPMGTTYTMGETSVSISTSDFFETSRIQIEPTSSL
 TSGLRETSSSERISSATEGSTVLSEVPSTATTEVSRTEVISSRGTSMSGPDQFTISPDIS
 TEAITRLSTSPIMTESAESAITIETGSPGATSEGLTLTLDSTTTTFWSGTHSTASPGFHS
 EMTTLMSTRTPGDVPWPSPSLPSVEEASSVSSSLSSPAMTSTSFFSTLPESISSSPHPVTALL
 TLGPVKTTDMLRTSSEPETSSPPNLSSTSAEILATSEVTKDREKIHPSNTPVNVVGTVI
 YKHLSPSSVLADLVTTKPTSPMATTSTLGNTSVSTSTPAFPETMMTQPTSSLTSGLREIS
 TSQETSSATERSASLSGMPTGATTKVSRTEALS LGRTSTPGPAQSTISPEISTETITRIS
 TPLTTTGSAMTITPKTGHSGASSQGTFTLDTSSRASWPGTHSAATHRSPHSGMTTPMSR
 GPEDVSWPSRPSVEKTSPPSSVLVSLAVTSPSPLYSTPSESSHSSPLRVTSLFTPVMMKT
 TMDLDTSLPVTTSPPSMNITSDESLATSKATMETEAIQLSENTAVTQMGTISARQEFYS
 SYPGLPEPSKVTSPVVTSSSTIKDIVSTTIPASSEITRIEMESTSTLTPTPRETSTSQEIH
 SATKPSTVPYKALTSATIEDSMTQVMSSSRGPPSPDQSTMSQDISTEVITRLSTSPIKTES
 TEMTITTQTGSPGATSRGTLTLDSTTTFMSTASQGFHSQMTALMSRTPGEVPWLS
 HPSVEEASSASFSLSSPVMTSSSPVSSLTLPDSIHSSSLPVTSLLTSGLVKTTTELLGTSSE
 PETSSPPNLSSTSAEILATTEVTTDTEKLEMTNVVTSGYTHESPSSVLADSVTTKATSSM
 GITYPTGDTNVLSTTPAFSDTSRIQTKSKLSLTPGLMETSISEETSSATEKSTVLSSVPT
 GATTEVSRTEAIISSRTSIPGPAQSTMSSDTSMETITRISTPLTRKESTDMAITPKTGPS
 GATSQGTFTLDSSSTASWPGTHSATTQRFPRSVVTTTPMSRGPEDVSWPSPLSVEKNSPPS
 SLVSSSVTSPSPLYSTPSGSSHSSPVVTSLFTS IMM KATDMLDASLEPETTSAPNMNI
 TSESLAASKATTETEAIHVFENTAASHVETTSATEELYSSSPGFSEPTKVISPVVTTSSS
 IRDNMVSTTMPGSSGITRIEIESMSSLTPGLRETRTSQDITSSSTETSTVLYKMPGATPE
 VSRTEVMPSSRTSIPGPAQSTMSLDISDEVVTRLSTSPIMTESAEITITTQTGYSLATSQ
 VTLPLGTSMTFLSGTHSTMSQGLSHSEMTNLMSRGPELSWTS PRFVETTRSSSSLTSLP
 LTTSLSPVSSLTLDSSPSSPLPVTSLILPGLVKTTTEVLDTSSEPKTSSSPNLSSTSVETP
 ATSEIMTDEKIHPSNTAVAKVRTSSSVHESHSSVLADSETTITIPSMGITSAVEDTTV

FTSNPAFSETRRIPTFSLTPGFRETSTSEETTSITETSAVLFGVPTSATTEVSMTEI
 MSSNRTHIPDSQSTMSPDIITEVITRLSSSSMMSESTQMTITTQKSSPGATAQSTLTILA
 TTTAPLARHSTVPPRFLHSEMTTLMSPENPSWKSSPFVEKTSSSSLLSLPVTTSPS
 VSSTLPQSIPISSSFVTSLLTPGMVKTTDTSTEPGTSLSPNLSGTSVEILAASEVTTDTE
 KIHPSSSMAVTNVGTTSSGHELYSSSVSIHSEPSKATYPVGTPSSMAETSISTSMANFET
 TGFEAEFPHSLTSGLRKTNMSLDTSSVTPNTNPSSPGSTHLLQSSKTDFTSSAKTSSPDW
 PPASQYTEIPVDIITPFNASPSITESTGITSPFESRFTMSVTESTHLSLTDLLPSAETIS
 TGTVMPSLSEAMTSFATTGVPRAISGSGSPFSRTESGPGDATLSTIAESLPSSTPVPFSS
 STFTTTDSSTIPALHEITSSSATPYRVDTSLGTESSTTEGRLVMVSTLDTSSQPGRTSSS
 PILDTRMTESVELGTVTSAYQVPSLSTRLTRTDGIMEHITKIPNEAAHRTIRPVKGPQT
 STSPASPKGLHTGGTKRMETTTTALKTTTTALKTTSRATLTTSVYTPTLGLTLPNASMQ
 MASTIPTEMMITTPYVFPDVPETTSSLATSLGAETSTALPRTTPSVFNRESETTASLVSR
 SGAERSPVIQTLDVSSSEPDITASWVHPAETIPTVSKTTPNFFHSELDTVSSTATSHGA
 DVSSAIPITNISPELDAITPLVTISGTDSTTFPTLTKSPHETETRTTWLTHPAETSSTI
 PRTIPNFHSHESDATPSIATSPGAETSSAIPIMTVSPGAEDLVTSQVTSSGTDNRMTIPT
 LTLSPGEPKTIASLVTHPEAQTSAPITSTISPAVSRVLVSMVTSLAKTSTTNRALTNS
 PGEPATTVSLVTHSAQTSPTVPWTTSIFFHKSDDTPSMTTSHGAESSAVPTPTVSTEV
 PGVVTPLVTSSRAVISTTIPILTLSPGEPETTPSMATSHGEEASSAIPPTVSPGVPGVV
 TSLVTSSRAVTSTTIPILTFSLGEPETTPSMATSHGTEAGSAVPTVLPEVPGMVTSLVAS
 SRAVTSTTLPTLTLSPGEPETTPSMATSHGAEASSTVPTVSPEVPGVVTSLVTSSSGVNS
 TSIPTLILSPGELETPSMATSHGAEASSAVPTPTVSPGVSGVVTPLVTSSRAVTSTTIP
 ILTLSSSEPETTPSMATSHGVEASSAVLTVSPEVPGMVTFVLVTSSRAVTSTTIPTLTISS
 DEPETTTSLVTHSEAKMISAIPTLGVSPFTVQGLVTSLVTSSSGSETSAFNSLTVASSQPET
 IDSWVAHPGTEASSVPTLTVSTGEPFTNISLVTHPAESSSTLPRTTSRFSHSELDTMPS
 TVTSPEAESSAISTTISPGIPGVLTSLVTSSGRDISATFPTVPESPHSEATASWVTHP
 AVTSTTVPRTPPNYSHSEPDTPSIATSPGAETSDFTTITVSPDVPMVTSQVTSSGTD
 TSITIPTLTLSSGEPETTTSFITYSEHTSSAIPTLVSPDASKMLTSLVISSGTDSTTT
 FPTLTETPYEPETTAIQLIHPAETNTMVPRTTPKFHSHKSDTTLPVAITSPGPEASSAVS
 TTTISPDMSDLVTSLVPSGGIDTSTTFPTLSETPYEPETTATWLTHPAETSTTVSGTIEN
 FSHRGSDTAPSMVTS PGVDTRSGVPTTTTIPPSIPGVVTSQVTSSATDTSTAIPTLTPSPG
 EPETTASSATHPGTQTGFTVPIRTVPSSEPDITASWVTHPPQTSTPVSRTTSSFSHSSPD
 ATPVMATSPRTEASSAVLTTISPGAPEMVTSQITSSGAATSTTVPTLTHSPGMPETTALL
 STHPRTETSKTFPASTVFPQVSETTASLTIRPGAETSTALPTQTSSLFLLVTGTSRVD
 LSPTASPGVSAKTAPLSTHFGTETSTMIPTSTLSLGLLETTGLLATSSAETSTSTLTLT
 VSPAVSGLSSASITTDKPQTVTSWNTETSPSVTSVGPPEFSRTVTGTTMTLIPSEMPTPP
 KTSHGEGVSPTTILRTTMVEATNLATTGSSPTVAKTTTTFNTLAGSLFTPLTTPGMSTLA
 SESVTSRTSYNHRSWISTTSSYNRRYWPATSTPVTSTFSPGISTSSIPSSTAATVPFMV
 PFTLNFTITINLQYEEDMRHPGSRKFNATERELQGLLKPLFRNSSLEYLYSGCRLASLRPE
 KDSSATAVDAICTHRDPEDLGLDRERLYWELSNLTNGIQELGPYTLDRNSLYVNGFTHR
 SSMPTTSTPGTSTVDVGTSGTPSSSPSTTAGPLLMPTLNFTITINLQYEEDMRRTGSRK
 FNTMESVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLTLRPEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGLN
 REQLYWELSKLTNDIEELGPYTLDRNSLYVNGFTHQSSVSTTSTPGTSTVDLRTSGTPSS
 LSSPTIMAAGPLLVPFTLNFTITINLQYGEDMGHPGSRKFNTTERTVLQGLLGPYFKNTSVG
 PLYSGCRLTSLRSEKDGAATGVDAICIHHLDPKSPGLNRERLYWELSQLTNGIKELGPYT
 LDRNSLYVNGFTHRTSVPTTSTPGTSTVDLGTSGTFFSLPSPATAGPLLVLFTLNFTITIN

LKYEEDMHRPGSRKFNTTTERVLQTLVGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDA
 ICTHRLDPKSPGVDREQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHWIIPVPTSSTPG
 TSTVDLGSGTPSSSLPSPTSATAGPLLVPFTLNFTITNLKYEEDMHCPGSRKFNTTTERVLQ
 SLLGPMFKNTSVGPLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGVDREQLYWELS
 QLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHQTSAPNTSTPGTSTVDLGTSGTPSSSLPSPTSAGP
 LLVPFTLNFTITNLQYEEDMHHPGSRKFNTTTERVLQGLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLL
 RPEKNGAATGMDAICSHRLDPKSPGLNREQLYWELSQLTHGIKELGPYTLDRNSLYVNGF
 THRSSVAPTSTPGTSTVDLGTSGTPSSSLPSPTTAVPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMRHPG
 SRKFNTTTERVLQGLLGPLFKNSSVGPLYSGCRLISLRSEKDGAATGVDAICTHHLNPQSP
 GLDREQLYWQLSQMTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSGLTTSTPWTSTVDLGTSGT
 PSPVPSPTTAGPLLVPFTLNFTITNLQYEEDMHRPGSRKFNTTTERVLQGLLSPIFKNSSV
 GPLYSGCRLTSLRPEKDGAATGMDAVCLYHPNPKRPGLDREQLYWELSQLTHNITELGPY
 SLDRDSLYVNGFTHQNSVPTTSTPGTSTVYWATTGTPSSFPGHTEPGPLLIPFTFNFTIT
 NLHYEENMQHPGSRKFNTTTERVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKQEAATGVD
 TICTHRVDPIGPGLDRERLYWELSQLTNSITELGPYTLDRDSLYVNGFNPWSSVPTTSTP
 GTSTVHLATSGTPSSSLPGHTAPVPLLIPTLNFTITNLHYEENMQHPGSRKFNTTTERVLQ
 GLLKPLFKSTSVGPLYSGCRLTLLRPEKHGAATGVDAICTLRLDPTGPGLDRERLYWELS
 QLTNSVTELGPYTLDRDSLYVNGFTHRSSVPTTSTPGTSAVHLETSGTPASLPGHTAPGP
 LLVPFTLNFTITNLQYEEDMRHPGSRKFNTTTERVLQGLLKPLFKSTSVGPLYSGCRLTLL
 RPEKRGAAATGVDTICTHRLDPLNPGLDREQLYWELSKLTRGIIELGPYLLDRGSLYVNGF
 THRNFPVITSTPGTSTVHLGTSETPSSSLPRPIVPGPLLVPFTLNFTITNLQYEEAMRHPG
 SRKFNTTTERVLQGLLRPLFKNTSIGPLYSSCRLTLLRPEKDKAATRVDAICTHHPDPQSP
 GLNREQLYWELSQLTHGITELGPYTLDRDSLYVDGFTHWSP IPTTSTPGTSTIVNLGTSGI
 PPSLPETTATGPLLVPFTLNFTITNLQYEENMGHPGSRKFNTITESVLQGLLKPLFKSTSV
 GPLYSGCRLTLLRPEKDGVAATRVDAICTHRPDPKIPGLDRQQLYWELSQLTHSITELGPY
 TLDRDSLYVNGFTQRSSVPTTSTPGTFTVQPETSETPSSSLPGPTATGPVLLPFTLNFTII
 NLQYEEDMHRPGSRKFNTTTERVLQGLLMPLFKNTSVSSLYSGCRLTLLRPEKDGAATRVDA
 AVCTHRPDPKSPGLDRERLYWELSQLTHGITELGPYTLDRHSLYVNGFTHQSSMTTTRTP
 DTSTMHLATSRTASLSGPTTASPLLVLFTINFTITNLRYEENMHHPGSRKFNTTTERVLQ
 GLLRPVFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPKKDGAATKVDAICTYRPDPKSPGLDREQLYWELS
 QLTHSITELGPYTLDRDSLYVNGFTQRSSVPTTSTPGTPTVDLGTSGTPVSKPGPSAASP
 LLVLFTLNFTITNLRYEENMQHPGSRKFNTTTERVLQGLLRSLFKSTSVGPLYSGCRLTLL
 RPEKDGTATGVDAICTHHPDPKSPRLDREQLYWELSQLTHNITELGPYALDNDLSLVNGF
 THRSSVSTTSTPGTPTVYLGASKTPASIFGPSAASHLLILFTLNFTITNLRYEENMWPGS
 RKFNNTTTERVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGEATGVDAICTHRPDPTGPG
 LDREQLYLELSQLTHSITELGPYTLDRDSLYVNGFTHRSSVPTTSTGVVSEEPFTLNFTI
 NNLRYMADMGQPGSLKFNITDNVMQHLLSPLFQRSSLGARYTGCRVIALRSVKNGAETRV
 DLLCTYLQPLSGPLPIKQVFHELSQLTHGITRLGPYSLDKDSLYLNGYNEPGPDEPPTT
 PKPATTFLPPLSEATTAMGYHLKTLTLNFTISNLQYSPDMGKGSATFNSTEGVLQHLLRP
 LFQKSSMGPFYLGQQLISLRPEKDGAATGVDTTCTYHPDPVGPGLDIQQLYWELSQLTHG
 VTQLGFYVLDRLSLFINGYAPQNL SIRGEYQINFHIVNWNLSNPDPTSSEYITLLRDIQD
 KVTTLYKGSQHLDTFRFCLVTNLTMDSVLVTVKALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLNASFWH
 LGSTYQLVDIHVTEMESSVYQPTSSSSTQHLYLNFTITNLPYSQDKAQP GTTNYQRNKRN
 IEDALNQLFRNSSIKSYFSDCQVSTFRSVPNRHHTGVDSL CNFSPLARRVDRVAIYEEFL
 RMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLFWAVILIGLAGLLGLITCLIC

GVLVTTRRRKKEGEYNVQQCPGYYSHLDELDLQ

(SEC ID N°: 4)

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor de potenciación de megacariocitos, mesotelina, N° de acceso en Genbank NM_005823 Yamaguchi, N., et al. Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96 (20): 11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 (1): 136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37): 21984-21990 (1995)); documento WO2003101283 (Reivindicación 14); (documento WO2002102235 (Reivindicación 13; Páginas 287-288); documento WO2002101075 (Reivindicación 4; Páginas 308-309); documento WO200271928 (Páginas 320-321); documento WO9410312 (Páginas 52-57); Referencias cruzadas: MIM:601051; NP_005814.2; NM_005823_1

622 aa

MALPTARPLLGSCTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPLDGVLANPPNISS
LSRQQLLGFPCEVSGSLSTERVRELAVALAQKNVCLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPL
DLLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLPAALACGWVGRSLLSEA
DVRALGGLACDLPGRFVAESAELVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYGGPSTW
SVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAANRQRSSRDPSWRQPERTILRPRFRREVEKT
ACPSGKKAREIDESLI FYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELY
PQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLKALLEVNGHEMSPQVATLIDRFVK
GRGQLDKDTLDTLTA FYPGYLCSLSPPELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLVYPA
RLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQ
KLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDLTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGT
PCLLGPGPVLTVLALLLASTLA

(SEC ID N°: 5)

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIb, SLC34A2, familia de transportadores de soluto 34 (fosfato sódico), miembro 2, transportador de fosfato dependiente de sodio de tipo II 3b, N° de acceso en Genbank NM_006424, J. Biol. Chem. 277 (22): 19665-19672 (2002), Genomics 62 (2): 281-284 (1999), Feild, J.A., et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3): 578-582; documento WO2004022778 (Reivindicación 2); documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento WO2002102235 (Reivindicación 13; Página 326); documento EP875569 (Reivindicación 1; Páginas 17-19); documento WO200157188 (Reivindicación 20; Página 329); documento WO2004032842 (Ejemplo IV); documento WO200175177 (Reivindicación 24; Páginas 139-140); Referencias cruzadas: MIM:604217; NP_006415.1; NM_006424_1

690 aa

MAPWPELGDAQPNPDKYLEGAAGQQPTAPDKSKETNKTDNTEAPVTKEILLPSYSTATLI
DEPTEVDDPNLPTLQDSGIKWSERDTKGKILCFFQGIGRLIILLGFLYFFVCSLDILSS
AFQLVGKMGAGQFFSNSSIMSNPLLGLVIGVLVTVLVQSSSTSTSIIVSMVSSSLLTVRA
AIP IIMGANIGTSITNTIVALMQVGRSEFRRAFAGATVHDFFNWLSVLVLLPVEVATHY
LEIITQLIVESFHFKNGEDAPDLLKVITKPF TKLIVQLDKKVISQIAMNDEKAKNKS LVK
IWCKTFTNKTIQINVTVPSTANCTSPSLCWTGDIQNTMKNVTYKENIAKQHI FVNFHLP
DLAVGTILLILSLLVLCGLIMIVKILGSVLKGQVATVIKKTINTDFPFFFAWLTGYLAI
LVGAGMTFIVQSSSVFTSALTPLIGIGVITIERAYPLTLGSNIGTTTTAILAALASPGNA
LRSSLQIALCHFFFNISGILLWYPIPFTRLP IIRMAKGLGNISAKYRWFVAVFYLI IFFFLI
PLTVFGLSLAGWRVLVGVGVVVF I IILVLCRLLLQSRCPRVLPKKLQNWNLPLWMRSL
KPWDAVVS KFTGCFQMRCCYCCRVCCRACCLLCGCPKCCRC SKCCEDLEEAQEGQDVPVK
APETFDNITISREAAQGEVPASDSKTECTAL

(SEC ID N°: 6)

(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (de tipo 1 y similar al tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B, N° de acceso en Genbank AB040878, Nagase T., et al. (2000) DNA Res. 7 (2): 143-150); documento WO2004000997 (Reivindicación 1); documento WO2003003984 (Reivindicación 1); documento WO200206339 (Reivindicación 1; Página 50); documento WO200188133 (Reivindicación 1; Páginas 41-43, 48-58); documento WO2003054152 (Reivindicación 20); documento WO2003101400 (Reivindicación 11); Accession: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC:10737;

1093 aa

MVLAGPLAVSLLLPSLTLLVSHLSSSQDVSSEPSSEQQLCALSKHPTVAFEDLQPVWSNF
 TYPGARDFSQLALDPSGNQLIVGARNYLFRLSLANVSLQATEWASSEDTRRSCQSKGKT
 EEECCQNYVRVLIVAGRKVFMCGTNAFSPMCTSRQVGNLSRTTEKINGVARCPYDPRHNST
 AVISSQGELYAATVIDFSGRDPAIYRSLGSGPPLRTAQYNSKWLNEPNFVAAYDIGLFAY
 FFLRENAVEHDCGRTVYSRVARVCKNDVGGFRLLLEDTWTFMKARLNC SRPGEVPFFYYNE
 LQSAFHLPEQDLIYGVFTTNVNSIAASAVCAFNLSAISQAFNGPFRYQENPRAAWLP IAN
 PIPNFQCGTLPETGPNENLTERSLQDAQRLFLMSEAVQPVTPPEPCVTQDSVRFSHLVVDL
 VQAKDTLYHVLYIGTESGTLKALSTASRSLHGCVLEELHVLPPGRREPLRSLRILHSAR
 ALFVGLRDGVLRVPLERCAAYRSQGACLGARDPYCGWDGKQQRCSLTLEDSSNMSLWTQNI
 TACFVRNVTRDGGFGPWSWPQCEHLDDGNSGSLCRARSCDS PRPRCGGLDCLGPAIHI
 ANCSRNGAWTPWSSWALCSTSCGIGFQVRQRSCSNPAPRHGGRICVGKSREBRFCNENTP
 CPVPIFWASWGSWSKCSSNCGGGMQSRRRACENGNSCLGCGVEFKTCNPEGCEVRRNTP
 WTPWLPVNVVTQGGARQEQRFRFTCRAPLADPHGLQFGRRRTETRTCPADGSGSCD TDALV
 EDLLRSGSTSPTVSGGWAANGPWSSCSRDCELGFRVRKRTCTNPEPRNGGLPCVGDAAE
 YQDCNPQACPVRGAWSCWTSWSPCSASC GGHHYQRTSRCTSPAPSPGEDI CLGLHTEAL
 CATQACPEGWSPWSEWSKCTDDGAQSRSRHCEELLPGSSACAGNSSQSRPCPYSEIPVIL
 PASSMEEATGCAGFNLIHLVATGISCFGLGSLLTAVLYLSCQHCQRQSQUESTLVHPATPN

HLHYKGGGTPKNEKYTPMEFKTLNKNLIPDDRANFYPLQQTNVYTTTTYYPSPLNKH SFR
 PEASPGQRCFPNS

(SEC ID N°: 7)

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, gen RIKEN cADN2700050C12, N° de acceso en Genbank AY358628); US2003129192 (Reivindicación 2); US2004044180 (Reivindicación 12); US2004044179 (Reivindicación 11); US2003096961 (Reivindicación 11); US2003232056 (Ejemplo 5); documento WO2003105758 (Reivindicación 12); US2003206918 (Ejemplo 5); EP1347046 (Reivindicación 1); documento WO2003025148 (Reivindicación 20); Referencias cruzadas: GI:37182378; AAQ88991.1; AY358628_1

141 aa

MWVLGIAATFCGLFLLPGFALQIQCYQCEEFQLNND CSSPEFIVNCTVNVQDMCQKEVME
 QSAGIMYRKSCASSAACLIASAGYQSFCS PGKLN SVCISCCNTPLCNGPRPKKRGSSASA
 LRPGLRTTILFLKLALFSAHC

(SEC ID N°: 8)

(9) ETBR (Receptor de endotelina de tipo B, N° de acceso en Genbank AY275463); Nakamuta M., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 248-255, 1991; Arai H., et al. Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992; Arai H., et al. J. Biol. Chem. 268, 3463-3470,

1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656-663, 1991; Elshourbagy N.A., et al. J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., et al. J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., et al. Gene 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C., et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., et al. Biol. Chem. 272, 21589-21596, 1997; Verheij J.B., et al. Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002; Hofstra R.M. documento W., et al. Eur. J. Hum. Genet. 5, 180-185, 1997; Puffenberger E.G., et al. Cell 79, 1257-1266, 1994; Attie T., et al. Hum. Mol. Genet. 4, 2407-2409, 1995; Auricchio A., et al. Hum. Mol. Genet. 5:351-354, 1996; Amiel J., et al. Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M. documento W., et al. Nat. Genet. 12, 445-447, 1996; Svensson P.J., et al. Hum. Genet. 103, 145-148, 1998; Fuchs S., et al. Mol. Med. 7, 115-124, 2001; Pingault V., et al. (2002) Hum. Genet. 111, 198-206; documento WO2004045516 (Reivindicación 1); documento WO2004048938 (Ejemplo 2); documento WO2004040000 (Reivindicación 151); documento WO2003087768 (Reivindicación 1); documento WO2003016475 (Reivindicación 1); documento WO2003016475 (Reivindicación 1); documento WO200261087 (Fig 1); documento WO2003016494 (Fig 6); documento WO2003025138 (Reivindicación 12; Página 144); documento WO200198351 (Reivindicación 1; Páginas 124-125); EP522868 (Reivindicación 8; Fig 2); documento WO200177172 (Reivindicación 1; Páginas 297-299); documento US2003109676; documento US6518404 (Fig 3); documento US5773223 (Reivindicación 1a; Col 31-34); documento WO2004001004;

442 aa

**MQPPPSLCGRALVALVLACGLSRIWGEERGFPDRATPLLQTAEIMTPPTKTLWPKGSNA
SLARSLAPAEVPGKDRTAGSPPTISPPPCQGPPIEIKETFKYINTVVVSLVFLVGLIIGNS
TLLRIIYKNCMRNGPNILIASLALGDLHLHIVIDIPINVYKLLAEDWPFGAEMCKLVFFI
QKASVGITVLSLCALSIDRYRAVASWSRIKGIGVPKWTAVEIVLIWVVSVVLA VPEAIGF
DIITMDYKGSYLRIICLLHPVQKTA FMQFYKTAKDWLFSFYFCLPLAITAFFYTLMTCEM
LRKKSGMQIALNDHLKQRREVAKTVFCLVLV FALCWLP LHLRSRILKLTLYNQNDPNRCEL
LSFLLVLDYIGINMASLNSCINPIALYLVSKRFKNCFKSCLCCWCQSFEKQSLEEKQSC
LKFKANDHGYDNFRSSNKYSSS**

(SEC ID N°: 9)

(10)MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, N° de acceso en Genbank NM_017763); documento WO2003104275 (Reivindicación 1); documento WO2004046342 (Ejemplo 2); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento WO2003083074 (Reivindicación 14; Página 61); documento WO2003018621 (Reivindicación 1); documento WO2003024392 (Reivindicación 2; Fig 93); documento WO200166689 (Ejemplo 6); Referencias cruzadas: ID de Locus:54894; NP_060233.2; NM_017763_1

783 aa

MSGGHQLQLAALWPWLLMATLQAGFGRTGLVLAAVESERSAEQKAIIRVIPLKMDPTGK
 LNLTLLEGVFAGVAEITPAEGKLMQSHPLYLCNASDDDNLEPGFISIVKLESPRRAPRCL
 SLASKARMAGERGASAVLFDITEDRAAAEQQLQPLGLTWPVVLIWGNDAEKLMFVYKNQ
 KAHVRIELKEPPAWPDYDVWILMTVVGTFVIIILASVLRIRCRPRHSRDPDPLQQRATAWAI
 SQLATRRYQASCRQARGWPDSSGSSCAPVCAICLEEFSEGQELRVISCLHEFHNRNCVD
 PWLHQHRTCPLCVFNITEGDSFSQSLGSPRSYQEPGRRLHLIRQHHPGHAHYHLPAAYLLG
 PSRSVARPPRPFGPFLPSQEPGMGPRHHRFPRAAHPRAPGEQQRLAGAHPYAQGWGMSH
 LQSTSQHAAACPVPLRRARPPDSSSGSGESYCTERSGYLADGPASDSSSGPCHGSSSDSVV
 NCTDISLQGVHGSSSTFCSSLSSDFDPLVYCSPKGDQPQRVDMQPSVTSRPRSLDSVVPTG
 ETQVSSHVHYHRHRHHYKRFQWHGRKPGPETGVPQSRPPIPRTPQPEPPSPDQQVTG
 SNSAAPSGRLSNPQCPRALPEPAPGPVDASSICPSTSSLFNLQKSSLSARHPQRKRGGP
 SEPTPGSRPQDATVHPACQIFPHYTPSVAYPWSPEAHPLICGPPGLDKRLLPETPGPCYS
 NSQPVWLCLTPRQPLEPHPPGEGPSEWSSDTAEGRPCPYPHCQVLSAQPGSEEELEELCE
 QAV

(SEC ID N°: 10)

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de
 próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de
 5 próstata 2, proteína de próstata de seis dominios transmembrana, N° de acceso en Genbank AF455138,
 Lab. Invest. 82 (11): 1573-1582 (2002)); documento WO2003087306; documento US2003064397 (Reivindicación
 1; Fig 1); documento WO200272596 (Reivindicación 13; Páginas 54-55); documento WO200172962
 (Reivindicación 1; Fig 4B); documento WO2003104270 (Reivindicación 11); documento WO2003104270
 (Reivindicación 16); documento US2004005598 (Reivindicación 22); documento WO2003042661 (Reivindicación
 10 12); documento US2003060612 (Reivindicación 12; Fig 10); documento WO200226822 (Reivindicación 23; Fig
 2); documento WO200216429 (Reivindicación 12; Fig 10);
 Referencias cruzadas: GI:22655488; AAN04080.1; AF455138_1

490 aa

MESISMMGSPKSLSETVLPNGINGIKDARKVTVGVIGSGDFAKSLTIRLIRCGYHVIGS
 RNPKFASEFFPHVVDVTHHEDALTKTNIIFVAIHREHYTSLWDLRHLLVGKILIDVSNM
 RINQYPESNAEYLASLFPDSLIVKGFNVVSAWALQLGPKDASRQVYICSNNIQARQQVIE
 LARQLNFIPIIDLGLSSAREIENLPLRLFTLWRGPVVVAISLATFFFLYSFVRDVIHPYA
 RNQQSDFYKIPIEIVNKTLPIVAITLLSLVYLAGLLAAAYQLYYGTYRRFPFWLETWLQ
 CRKQLGLLSFFFAMVHVAYSCLPMRRSERYLFLNMAYQQVHANIENSWNEEBVWRIEMY
 ISFGIMSLGLLSLLAVTSIPSVSNALNWREFSFIQSTLGYVALLISTFHVLIYGWKRAFE
 EEYRFRYTPPNFVLALVLPISIVILGKIILFLPCISQKLKRIKKGWEKSQFLEEGIGGTIP
 HVSPERTVM

(SEC ID N°: 11)

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial de receptores transitorios,
 subfamilia M, miembro 4, N° de acceso en Genbank NM_017636
 Xu,X.Z., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98 (19): 10692-10697 (2001), Cell 109 (3): 397-407 (2002), J. Biol.
 Chem. 278 (33): 30813-30820 (2003)); documento US2003143557 (Reivindicación 4); documento WO200040614
 (Reivindicación 14; Páginas 100-103); documento WO200210382 (Reivindicación 1; Fig 9A); documento
 20 WO2003042661 (Reivindicación 12); documento WO200230268 (Reivindicación 27; Página 391); documento
 US2003219806 (Reivindicación 4); documento WO200162794 (Reivindicación 14; Fig 1A-D);
 Referencias cruzadas: MIM:606936; NP_060106.2; N_017636_1

1214 aa

MVVPEKEQSWIPKIFKKKTCTTFIVDSTDPGGTLCQCGRPRTAHPAVAMEDAFGAAVTV
WDSDAHTTEKPTDAYGELDFTGAGRKHSNFLRLSDRTDPAAVYSLVTRTWGFRAPNLVVS
VLGGSSGGPVLQTLQDLLRRGLVRAAQSTGAWIVTGGLHTGIGRHVGVAVRDHQMSTGG
TKVVAMGVAPWGVVRNRDTLINPKGSFPARYRWRGDPEDGVQFPLDYNYSAFFLVDDGTH

GCLGGENRFRRLRESYISQKKTGVGGTGIDIPVLLLLLIDGDEKMLTRIENTATQAQLPCLL
VAGSSGAADCLAETLEDTLAPGSGGARQGEARDRIIRFFPKGDLEVLQAQVERIMTRKEL
LTVYSSSEDGSEEFETIVLKALVKACGSSEASAYLDELRLAVAWNRVDIAQSELFRGDIQW
RSFHLASLMDALLNDRPEFVRLLI SHGLSLGHFLT PMRLAQLYSAAPSNLIRNLLDQA
SHSAGTKAPALKGGAAELRPPDVGHVLRMLLGKMCAPRYPSGGAWDPHPGQGFGESEMYLL
SDKATSPLSLDAGLGQAPWSDLLLWALLLNRAQMAMYFWEMGSNAVSSALGACLLLRVMA
RLEPDAEEAARRKDLAFKFEGMGVDLFGECYRSSEVRAARLLLRRCPWGDATCLQLAMQ
ADARAFFAQDGVQSLLTQKWWGDMASSTPIWALVLAFFCPPLIYTRLITFRKSEEEPTRE
ELEFDMDSVINGEGPVGTADPAEKTPLGVPRQSGRPGCCGRCGRRCLRRWFHFWGAPV
TIFMGNVVSYLELLFSLRVLLVDFQAPPGSLELLLYFWAFTLLCEELRQGLSGGGGSL
ASGGPGPGHASLSQRLRLYLADSWNQCDLVALTCFLLGVGCRLTPGLYHLGRTVLCIDFM
VFTVRLLLHIFTVNKQLGPKIVIVSKMMKDVFFFLFVLGVNLVAYGVATEGLLRPRDSDFP
SILRRVFYRPLYQIFGQIPQEDMDVALMEHSNCSSEPGFWAHPGAQAGTCVSQYANWL
VLLLVIFLLVANILLVNLIIAMFSYTFGKVQGNSDLYWKAQRYRLIREFHSPALAPFFI
VISHLRLLLRQLCRRPRSPQSSPALEHFRVYLSKEAERKLLTWESVHKENFLLARARDK
RESDSERLKRTSQKVDLALKQLGHIREYEQRLKVLEREVQQCSRVLGWVAEALSRSALLP
PGGPPPPDLPGSKD

(SEC ID N°: 12)

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, N° de acceso en Genbank NP_003203 o NM_003212,
Ciccodicola, A., et al. EMBO J. 8 (7): 1987-1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3): 555-565 (1991)); documento
US2003224411 (Reivindicación 1); documento WO2003083041 (Ejemplo 1); documento WO2003034984
(Reivindicación 12); documento WO2002288170 (Reivindicación 2; Páginas 52-53); documento WO2003024392
(Reivindicación 2; Fig 58); documento WO200216413 (Reivindicación 1; Páginas 94-95, 105); documento
WO200222808 (Reivindicación 2; Fig 1); documento US5854399 (Ejemplo 2; Col 17-18); documento US5792616
(Fig 2);
Referencias cruzadas: MIM:187395; NP_003203.1; NM_003212_1

188 aa

MDCKRMARFSYSVIWIMAIKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDSIWPQEEPAIR
PRSSQVRVPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPSFYGRNCEHDVRKENCGSVPH
DTWLPPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFPLPGCDGLVMDEHLVASRTPELPPSARTTTTFMLVGI
CLSIQSY

(SEC ID N°: 13)

(14) CD21 (CR2 (Receptor de complemento2) o C3DR (receptor de C3d/virus de Epstein Barr) o Hs.73792 N° de acceso en Genbank M26004,
Fujisaku et al. (1989) J. Biol. Chem. 264 (4): 2118-2125); Weis J.J., et al. J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988;
Moore M., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 9194-9198, 1987; Barel M., et al. Mol. Immunol. 35, 1025-1031,
1998; Weis J.J., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., et al. (1993) J. Immunol.
150,5311-5320; documento WO2004045520 (Ejemplo 4); documento US2004005538 (Ejemplo 1); documento

WO2003062401 (Reivindicación 9); documento WO2004045520 (Ejemplo 4); documento WO9102536 (Fig 9.1-9.9); documento WO2004020595 (Reivindicación 1); Acceso: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.

1033 aa

MGAAGLLGVFLALVAPGVLGISCGSPPPILNGRISYYSTPIAVGTVIRYSCSGTFRLLIGE
KSLLCITKDKVDGTWDPAPKCEYFNKYSSCPEPIVPGGYKIRGSTPYRHGDSVTFACKT
NFSMNGNKSVCQANNMWGPTRLPTCVSVFPLECPALPMIHNGHHTSENVGSIAPGLSVT
YSCESGYLLVGEKIINCLSSGKWSAVPPTCEEARCKSLGRFPNGKVKEPPILRVGVTANF
FCDEGYRLQGGPPSSRCVIAGQGVAVTKMPVCEEIFCPSPPPILNGRHIGNSLANVSYGSI
VTTYCDPDPEEGVNFILIGESTLRCTVDSQKTGTWSGPAPRCCELSTSAVQC PHPQILRGR
MVSGQKDRYTYNDTVIFACMFGFTLKGSKQIRCNAQGTWEPSAPVCEKECQAPPNINLNGQ
KEDRHMVRFDPGTSIKYSCNPGYVLVGEESIQTSEGVWTPPVQPCKVAACEATGRQLLT
KPQHGFVRPDVNSSCGEGYKLSGSVYQECQGTIPWFMEIRLCKEITCPPPPVIYNGAHTG
SSLEDFPYGTTVTTYTCNPGPERGVEFSLIGESTIRCTSNDQERGTWSGPAPLCKLSLLAV
QCSHVHIANGYKISGKEAPYFYNDTVTFKCYSGFTLKGSSQIRCKADNTWDPEIPVCEKE
TCQHVRQSLQELPAGSRVELVNTSCQDGYQLTG HAYQMCQDAENGIWFKKIPLCKVIHCH
PPPVIIVNGKHTGMAENFLYGNEVSYECDQGFYLLGEKKLQCRSDSKGHGWSGSPQCL
RSPPVTRCPNPEVKHGYKLNKTHSAYSHNDIVYVDCNPGFIMNGSRVIRCHTDNTWVPGV
PTCIKKAFIGCPPPFPKTPNGNHTGGNIARFSPGMSILYSCDQGYLLVGEALLLCTHEGTW
SQPAPHCKEVCNCSPPADMDGIQKGLEPRKMYQYGA VVTLECEDGYMLEGSPQSQCQSDHQ
WNPPLAVCRSRSLAPVLCGIAAGLILLTFLIVITLYVISKHRERNYYTDTSQKEAFHLEA
REVYSVDPYNPAS

(SEC ID N°: 14)

(15) CD79b (CD79B, CD79β, Igb (asociado a inmunoglobulina beta), B29, N° de acceso en Genbank NM_000626 o 11038674, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2003) 100 (7): 4126-4131, Blood (2002) 100 (9): 3068-3076, Muller et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22 (6): 1621-1625); documento WO2004016225 (reivindicación 2, Fig 140); documento WO2003087768, documento US2004101874 (reivindicación 1, página 102); documento WO2003062401 (reivindicación 9); documento WO200278524 (Ejemplo 2); documento US2002150573 (reivindicación 5, página 15); US5644033; documento WO2003048202 (reivindicación 1, páginas 306 y 309); documento WO 99/558658, documento US6534482 (reivindicación 13, Fig 17A/B); documento WO200055351 (reivindicación 11, páginas 1145-1146);

Referencias cruzadas: MIM:147245; NP_000617.1; NM_000626_1

229 aa

MARLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDYRNPKGSA CSRIWQSPRFIARKRGFT
VKMHCYMN SASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIY
FCQQKCNNTSEVYQCGTEL RVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLL
LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

(SEC ID N°: 15)

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína de anclaje 1a de fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C, N° de acceso en Genbank NM_030764, Genome Res. 13 (10): 2265-2270 (2003), Immunogenetics 54 (2): 87-95 (2002), Blood 99 (8): 2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98 (17): 9772-9777 (2001), Xu, M.J., et al. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3): 768-775; documento WO2004016225 (Reivindicación 2); documento WO2003077836; documento WO200138490 (Reivindicación 5; Fig 18D-1-18D-2); documento WO2003097803 (Reivindicación 12); documento WO2003089624 (Reivindicación 25);

Referencias cruzadas: MIM:606509; NP_110391.2; NM_030764_1

508 aa

MLLWSLLVIFDAVTEQADSLTLVAPSSVFEGDSIVLKCQGEQNWKIQKMAYHKDNKELSV
 FKKFSDFLIQSAVLSDSGNYFCSTKGQLFLWDKTSNIVKIKVQELFQRPVLTASSFQPIE
 GGPVSLKCETRLSPQRLDVQLQFCFFRENQVLGSGWSSSPQLQISAVWSEDTGSYWCKAE
 TVTHRIRKQSLQSQIHVQRIPISNVSLERAPGGQVTEGQKLILLCSVAGGTGNVTFWSY
 REATGTSMGKKTQRSLSAELEIPAVKESDAGKYICRADNGHVPIQSKVVNIIPVRIPVSRP
 VLTLRSPGAQAAVGDLLLELHCEALRGSPPILYQFYHEDVTLGNSSAPSGGGASFNLSLTA
 EHSNGYSCEANNGLGAQCSEAVPVSISGPDGYRRDLMTAGVLWGLFGVLGFTGVALLLYA
 LFHKISGESSATNEPRGASRPNPQEFTYSSPTPDMEELQPVYVNVGSVDVDVVYSQVWSM
 QQPESSANIRTLLLENKDSQVIYSSVKKS

(SEC ID N°: 16)

- 5 (16) HER2 (ErbB2, N° de acceso en Genbank M11730, Coussens L., et al. Science (1985) 230 (4730): 1132-1139); Yamamoto T., et al. Nature 319, 230-234, 1986; Semba K., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M., et al. J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004; Kuhns J.J., et al. J. Biol. Chem. 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., et al. Nature 421, 756-760, 2003; Ehsani A., et al. (1993) Genomics 15, 426-429; documento WO2004048938 (Ejemplo 2); documento WO2004027049 (Fig 1I); documento WO2004009622; documento WO2003081210; documento WO2003089904 (Reivindicación 9); documento WO2003016475 (Reivindicación 1); documento US2003118592; documento WO2003008537 (Reivindicación 1); documento WO2003055439 (Reivindicación 29; Fig 1A-B); documento WO2003025228 (Reivindicación 37; Fig 5C); documento WO200222636 (Ejemplo 13; Páginas 95-107); documento WO200212341 (Reivindicación 68; Fig 7); documento WO200213847 (Páginas 71-74); documento WO200214503 (Páginas 114-117); documento WO200153463 (Reivindicación 2; Páginas 41-46); documento WO200141787 (Páginas 15); documento WO200044899 (Reivindicación 52; Fig 7); documento WO200020579 (Reivindicación 3; Fig 2); documento US5869445 (Reivindicación 3; Col 31-38); documento WO9630514 (Reivindicación 2; Páginas 56-61); EP1439393 (Reivindicación 7); documento WO2004043361 (Reivindicación 7); documento WO2004022709; documento WO200100244 (Ejemplo 3; Fig 4); Acceso: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1.
- 10
- 15
- 20

1255 aa

MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHLVYQGCQVVGQNL
 ELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNVQRQVPLQRLRIVRGTLFEDNYALAVLDNG
 DPLNNTTPTVTGASPGGLRELQRLSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLA
 LTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQC
 AAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACP
 YNYLSTDVGSCTLVCPHNVQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSAN
 IQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLP
 DLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNNHLCFVHTV
 PWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQEC
 VEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFPCVARC
 PSGVKPDLSPYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGPAPQASPLTSIISAVVG
 ILLVVVLGVVFGILIKRRQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETEL
 RKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSP
 YVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCCLLDHVRENRLGSGDLLNWCMIAGMSYLEDVR
 LVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEHADGGKVPKWMALSIILRRRFT
 HQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPIAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWM
 IDSECRPRFRELVSFESRMARDPQRFVVIQNEDLGPASPLDSTFYRSLLLEDDMDGLVDA
 EEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEG
 AGSDVFDGDLGMAAGLQSLPTHDPSPQLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPPQPEYV
 NQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPO
 GGAAPQPHPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV

(SEC ID N°: 17)

(18) NCA (CEACAM6, N° de acceso en Genbank M18728);
 Barnett T., et al Genomics 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988;
 Strausberg R.L., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 16899-16903, 2002; documento WO2004063709;
 documento EP1439393 (Reivindicación 7); documento WO2004044178 (Ejemplo 4); documento
 WO2004031238; documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento WO200278524 (Ejemplo 2);
 documento WO200286443 (Reivindicación 27; Página 427); documento WO200260317 (Reivindicación 2);
 Acceso: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728;

344 aa

MGPPSAPPCRLHVPWKEVLLTASLLTFWNPPTAKLTISTPFNVABGKEVLLLAHNLPO
 NRIGYSWYKGERVDGNSLIVGYVIGTQQATPGPAYSGRETIYPNASLLIQNVTONDTGIFY
 TLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPEVQNTTYLWWV
 NGQSLPVSRLQLSNGNMTLLSVKRNDAAGSYECEIQNPASANRSDPVTNLNVLYGPDVP
 TISPSKANYRPGENLNLSCHAASNPPAQYSWFINGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQ
 AHNSATGLNRTTVTMITVSGSAPVLSAVATVGITIGVLARVALI

(SEC ID N°: 18)

(19) MDP (DPEP1, N° de acceso en Genbank BC017023,
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99 (26): 16899-16903 (2002)); documento WO2003016475 (Reivindicación 1);
 documento WO200264798 (Reivindicación 33; Páginas 85-87); documento JP05003790 (Fig 6-8); documento
 WO9946284 (Fig 9);
 Referencias cruzadas: MIM:179780; AAH17023.1; BC017023_1

411 aa

MWSGWLWPLVAVCTADFFRDEAERIMRDSVIDGHNDLPWQLLDMFNNRLQDERANLTT
 LAGTHTNIPKL RAGFVGGQFWSVYTPCDTQNKDAVRRITLEQMDVVHRMCRMPETFLYVT
 SSAGIRQAFREGKVASLIGVEGGHSIDSSLGVLRLALYQLGMRYLTLTHSCNTPWADNWL
 DTGDSEPQSQGLSPFGQRVVKELNRLGVLIDLAHVSVA TMKATLQLSRAPVIFSHSSAYS
 VCASRRNVPDDVLRVLVKQTDLSVMVNFYNNYISCTNKANLSQVADHLDHIKEVAGARAVG
 FGGDFDGVPRVPEGLEDVSKYPDLIAELLRRNWTEAEVKGALADNLLRVFEAVEQASNL
 QAPEEPIPLDQLGGSCRTHYGYSSGASSLHRHWGLLLASLAPLVLCSL

(SEC ID N°: 19)

(20) IL20R α (IL20Ra, ZCYTOR7, N° de acceso en Genbank AF184971);
 Clark H.F., et al. Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Mungall A.J., et al. Nature 425, 805-811, 2003; Blumberg
 H., et al. Cell 104, 9-19, 2001; Dumoutier L., et al. J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J., et al. J.
 Biol. Chem. 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S., et al. (2003) Biochemistry 42: 12617-12624; Sheikh F., et al.
 (2004) J. Immunol. 172, 2006-2010; documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento US2004005320 (Ejemplo
 5); documento WO2003029262 (Páginas 74-75); documento WO2003002717 (Reivindicación 2; Página 63);
 documento WO200222153 (Páginas 45-47); documento US2002042366 (Páginas 20-21); documento
 WO200146261 (Páginas 57-59); documento WO200146232 (Páginas 63-65); documento WO9837193
 (Reivindicación 1; Páginas 55-59);
 Acceso: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

553 aa

MRAPGRPALRPLPLPPLLLLLLAAPWGRAVPCVSGGLPKPANITFLSINMKNVLQWTPPE
 GLQGKVKVTVYTYQFYIYGQKKWLNKSECRNINRTYCDLSAETSDYEHQYYAKVKAIWGTCK
 SKWAESGRFPYFLETQIGPPEVALTTDEKSI SVVLTAPEKWKRN PEDLPVSMQOIYSNLK
 YNVSVLNTKSNRTWSQCVTNHTLVLTWLEPNTLYCVHVESFVPGPPRRAPSEKQCARTL
 KDQSSEFKAKIIFWYVLPISITVFLFSVMGYSIYRIHVGEKHPANLILYGNFDFKRF
 FVPAEKIVINFITLNISSDKISHQDMSLLGKSSDVSSLNDPQPSGNLRPPQEEEEVKHL
 GYASHLMEIFCDSEENTEGTSFTQQESLSRTIPPDKTVIEYEYDVRTT DICAGPEEQELS
 LQEEVSTQGTLLSQALAVLGPQTLQYSYTPQLQDLPLAQEHTDSEEGPEEPSTTLV
 DWDPQTGRLCIPSLSSFDQDSEGCEPSEGDLGEEGLLSRLYEPPAPDRPPGENETYLMQ
 FMEEWGLYVQMN

(SEC ID N°: 20)

(21) Brevican (BCAN, BEHAB, N° de acceso en Genbank AF229053)
 Gary S.C., et al. Gene 256, 139-147, 2000; Clark H.F., et al. Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L.,
 et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 16899-16903, 2002; documento US2003186372 (Reivindicación 11);
 documento US2003186373 (Reivindicación 11); documento US2003119131 (Reivindicación 1; Fig 52);
 documento US2003119121 (Reivindicación 1; Fig 52); documento US2003119126 (Reivindicación 1); documento
 US2003119122 (Reivindicación 1; Fig 52); documento US2003119129 (Reivindicación 1); documento
 US2003119130 (Reivindicación 1); documento US2003119128 (Reivindicación 1; Fig 52); documento
 US2003119125 (Reivindicación 1); documento WO2003016475 (Reivindicación 1); documento WO200202634
 (Reivindicación 1);

911 aa

MAQLFLPLLAALVLAQAPAAALADVLEGDSSSEDRAFRVRIAGDAPLQGVLGAL TIPCHVH
YLRPPPSRRRAVLGSPRVKWTFLSRGREAEVLVARGVRVKVNEAYRFRVALPAYPASLTDV
SLALSELRPNDSGIYRCEVQHIGIDSSDAVEVKVKGVVFLYREGSARYAFSFSGAQEACA
RIGAH IATPEQLYAAYLGGYEQCDAGWLS DQTVRYPIQTPREACYGDMDGFP GVRNYGVV
DPDDL YDVYCYAEDLNGELFLGDPPEKLTLEEARAYCQERGAEIATTGQLYAAWDGGLDH
CSPGWLADGSVRYP IVTPSQRCGGGLPGVKTLFLFPNQTGF PNKHSR FNVYCFRDSAQPS
AIPEASNPASNPASDGLEAIVTVTETLEELQLPQEATESESRGAIYSIPIMEDGGGGSST
PEDPAEAPRTLLEFETQSMVPPTGFS EEEGKALEEEEEKYEDEEEKEEEEEEEVEDEALW
AWPSELSSPGPEASLPTEPAAQEKSLSQAPARAVLQPGASPLPDGESEASRPFRVHGPPT
ETLPTPRERNLASPS PSTLVEAREVGEATGGPELSGVPRGESEETGSSEGA PSLLPATRA
PEGTRELEAPSEDNSGRTAPAGTSVQAQPVLP TDSASRGGVAVVPASGDCVPS PCHNGGT
CLEEEEGVRCLCLPGYGGDLCDVGLRFCNPGWDAFQGAC YKHFSTRRSWEEAETQCRMYG
AHLASISTPEEQDFINNRYREYQWIGLNDRTIEGDFLWSDGVPLLYENWNPNPGQPD SYFLS
GENCVVMVWHDQGGWSDVPCNYHLSYTKMGLVSCGPPPELPLAQVFGRPRLRYEVDTVL
RYRCREGLAQRNLP LIRCQENGRWEAPQISCVPRRPARALHPEEDPEGRQGRLLGRWKAL

LIPPSSPMPGP

(SEC ID N°: 21)

(22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, N° de acceso en Genbank NM_004442) Chan, J. y Watt, V.M.,
Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991) Oncogene 10 (5): 897-905 (1995), Annu. Rev. Neurosci. 21: 309-345 (1998),
Int. Rev. Cytol. 196: 177-244 (2000)); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento
WO200053216 (Reivindicación 1; Página 41); documento WO2004065576 (Reivindicación 1); documento
WO2004020583 (Reivindicación 9); documento WO2003004529 (Páginas 128-132); documento WO200053216
(Reivindicación 1; Página 42);

Referencias cruzadas: MIM:600997; NP_004433.2; NM_004442_1

987 aa

MALRRRLGAALLLLPLLAAVEETLMDSTTATAELGWMVHPPSGWEEVSGYDENMNTIRTYQ
VCNVFESSQNNWLRTKFIRRRGAHRIHVEMKFSVRDCSSIPSVPGSCKETFNLYYYEADF
DSATKTFPNWMENPWVKVDITIAADESFSQVDLGGVRMKINTEVRSFGPVSRSGFYLAQD
YGGCMSLIAVRVFYRKCPRIIQNGAIFQETLSGAESTSLVAARGSCIANAEVDVPIKLY
CNGDGEWLVPFIGRCMKAGFEAVENGTVCRGCPSTGTFKANQGDEACTHCPINSRTTSEGA
TNCVCRNGYYRADLDPLDMPCTTIPSAPQAVISSVNETSLMLEWTPPRDSGGREDLVYNI
ICKSCGSGRGACTRCGDNVQYAPRQLGLETPRIYISDLLAHTQYTFEIQAVNGVTDQSPF
SPQFASVNITTNAAPSASVIMHQVSRTVDSITLSWSQPDQPNGVILDYELQYYEKELSE
YNATAIKSPTNTVTQGLKAGAIYVFQVRARTVAGYGRYSGKMYFQTMTEAEYQTSIQEK
LPLIIGSSAAGLVFLIAVVVIAIVCNRRRGFERADSEYTDKLQHYTSGHMTPGMKIYIDP
FTYEDPNEAVREFAKEIDISCVKIEQVIGAGEFGEVCSGHLKLPKGKREIFVAIKTLKSGY
TEKQRRDFLSEASIMGQFDHPNVIHLEGVVTKSTPVMIIITEFMENGSLDSFLRQNDGQFT
VIQLVGMRLRGIAAGMKYLADMNIVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFGLSRFLEDDTSDPT
YTSALGGKIPIRWTAPEAIQYRKFTSASDVWSYGIWMWEVMSYGERPYWDMTNQDVINAI
EQDYRLPPFMDCPALHQLMLDCWQKDRNHRPKFGQIVNTLDKMI RNPNSLKAMAPLSSG
INLPLLDRTIPDYSFNTVDEWLEAIKMGQYKESFANAGFTSFDVVSQMMMEDILRVGVT
LAGHQKKILNSIQVMRAQMNQIQSVEV

(SEC ID N°: 22)

(23) ASLG659 (B7h, N° de acceso en Genbank AX092328)

documento US20040101899 (Reivindicación 2); documento WO2003104399 (Reivindicación 11); documento
5 WO2004000221 (Fig 3); documento US2003165504 (Reivindicación 1); documento USA2003124140 (Ejemplo
2); documento US2003065143 (Fig 60); documento WO2002102235 (Reivindicación 13; Página 299); documento
US2003091580 (Ejemplo 2); documento WO200210187 (Reivindicación 6; Fig 10); documento WO200194641
(Reivindicación 12; Fig 7b); documento WO200202624 (Reivindicación 13; Fig 1A-1B); documento
10 US2002034749 (Reivindicación 54; Páginas 45-46); documento WO200206317 (Ejemplo 2; Páginas 320-321,
Reivindicación 34; Páginas 321-322); documento WO200271928 (Páginas 468-469); documento WO200202587
(Ejemplo 1; Fig 1); documento WO200140269 (Ejemplo 3; Páginas 190-192); documento WO200036107
(Ejemplo 2; Páginas 205-207); documento WO2004053079 (Reivindicación 12); documento WO2003004989
(Reivindicación 1); documento WO200271928 (Páginas 233-234, 452-453); documento WO 0116318;

282 aa

MASLGQILFWSIIISIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEP
DIKLSDIVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKNV
QLTDAGTYKCYIIITSKGKKANLEYKTGAFSMPEVNVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVV
WASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKV
TESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMK

(SEC ID N°: 23)

(24) PSCA (Percusor antigénico de células madre prostáticas, N° de acceso en Genbank AJ297436) Reiter R.E.,
et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., et al. Oncogene 19, 1288-1296, 2000; Biochem.
20 Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3): 783-788; documento WO2004022709; documento EP1394274 (Ejemplo
11); documento US2004018553 (Reivindicación 17); documento WO2003008537 (Reivindicación 1); documento
WO200281646 (Reivindicación 1; Página 164); documento WO2003003906 (Reivindicación 10; Página 288);
documento WO200140309 (Ejemplo 1; Fig 17); documento US2001055751 (Ejemplo 1; Fig 1b); documento
WO200032752 (Reivindicación 18; Fig 1); documento WO9851805 (Reivindicación 17; Página 97); documento
WO9851824 (Reivindicación 10; Página 94); documento WO9840403 (Reivindicación 2; Fig 1B);
25 Acceso: 043653; EMBL; AF043498; AAC39607.1.

123 aa

**MKAVLLALLMAGLALQPGTALLCYSCKAQVSNEDCLQVENCTQLGEQCWTARIRAVGLLT
VISKGCSLNCVDDSDQDYVVGKKNITCCDITDLGNASGAHALQPAAAILALLPALGLLLWGP
GQL**

(SEC ID N°: 24)

(25) GEDA (N° de acceso en Genbank AY260763);
AAP14954 proteína de tipo pareja de fusión de lipoma de hmgic /pid = AAP14954.1 - Homo sapiens
Especie: Homo sapiens (humano)
documento WO2003054152 (Reivindicación 20); documento WO2003000842 (Reivindicación 1); documento
WO2003023013 (Ejemplo 3, Reivindicación 20); documento US2003194704
(Reivindicación 45);
Referencias cruzadas: GI:30102449; AAP14954.1; AY260763_1

236 aa

**MPGAAAAAAAAAAMLPAQEAAKLYHTNYVRNSRAIGVLWAIFTICFAIVNVVCFIQPYW
IGDGVDPQAGYFGLFHYCIGNGFSRELTGRGSFTDFSTLPSGAFKAASFFIGLSMMLII
ACIICFTLFFFCNTATVYKICAWMQLTSAACLVLGCMIFPDGWDSDVKRMCGEKTDKYT
LGACSVRWAYILAIIGILDALILSFLAFVLGNRQDSLMAEELKAENKVLLSQYSLE**

(SEC ID N°: 25)

(26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, receptor 3 de BLyS, BR3, N° de acceso en
Genbank NP_443177.1); NP_443177 BAFF receptor /pid=NP_443177.1 - Homo sapiens Thompson,J.S., et al.
Science 293 (5537), 2108-2111 (2001); documento WO2004058309; documento WO2004011611; documento
WO2003045422 (Ejemplo; Páginas 32-33); documento WO2003014294 (Reivindicación 35; Fig 6B); documento
WO2003035846 (Reivindicación 70; Páginas 615-616); documento WO200294852 (Col 136-137); documento
WO200238766 (Reivindicación 3; Página 133); documento WO200224909 (Ejemplo 3; Fig 3); Referencias
cruzadas: MIM:606269; NP_443177.1; NM_052945_1

184 aa

**MRRGPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRKPAGASSPAPRTALQPQ
ESVGAGAGEAALPLPGLLFGAPALLGLALVLVLVGLVSWRRRQRRLRGASSAEAPDGD
KDAPEPLDKVIILSPGISDATAPAWPPPGEDPGTTPPGHSVPVPATELGSTELVTTKTAG
PEQQ**

(SEC ID N°: 26)

(27) CD22 (isoforma CD22-B de receptores de linfocitos B, N° de acceso en Genbank NP-001762.1);
Stamenkovic,I. y Seed, B., Nature 345 (6270), 74-77 (1990); documento US2003157113; documento
US2003118592; documento WO2003062401 (Reivindicación 9); documento WO2003072036 (Reivindicación 1;
Fig 1); documento WO200278524 (Ejemplo 2);
Referencias cruzadas: MIM:107266; NP_001762.1; NM_001771_1

847 aa

MHLLGPWLLLLLVLEYLAFSDSSKVVFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFH
 NPEYNKNTSKFDGTRLYESTKDGVKVPSEQKRVQFLGDKNKNCTLSIHPVHLNDSGQLGLR
 MESKTEKWMERIHLNVSERPFPFPHIQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSYGYPIQLQWLLEG
 VPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSELKFSPQWSHHGKIIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKH
 TPKLEIKVTPSDAIVREGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNLREVT
 KDQSGKYCCQVSNVDVGPGRSEEVFLQVQYAPEPSTVQILHSPAVEGSQVEFLCMSLANPL
 PTNYTWYHNGKEMQGRTEEKVHIPKILPWHAGTYSVAENILGTGQRGPGAELDVQYPPK

KVTTVIQNPMPIREGDTVTLSCNYNSSNPSVTRYEWKPHGAWEEPGLVGLKIQNVGWDNT
 TIACARCNSWCSWASPVALNVQYAPRDVVRKIKPLSEIHSGNSVSLQCDFSSSHPKEVQ
 FFWEKNGRLLGKESQLNFDISISPEDAGSYSCWVNNSIGQTASKAWTLEVLYAPRRLRVSM
 SPGDQVMEGKSATLTCESDANPPVSHYTWFDWNNQSLPHHSQKLRLPEVKVQHSGAYWCQ
 GTNSVGKGRSPLSTLTVYSPETIGRRVAVGLGSLAILILAICGLKLQRRWKRTQSQQG
 LQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGPMSLGCYNPMMEDGISYTTLRFPENI PRTGDAES
 SEMQRPPRTCDDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENV
 DYVILKH

(SEC ID N°: 27)

(28) CD79a (CD79A, CD79 α , asociado a inmunoglobulina alfa, una proteína específica de linfocitos B que interactúa covalentemente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie de moléculas de IgM, transduce una señal implicada en la diferenciación de linfocitos B) SECUENCIA DE PROTEÍNA Total
 5 mpggpgv...dvqlekp (1..226; 226 aa), pl: 4.84, PM: 25028 TM: 2 [P] Gen Cromosoma: 19q13.2, N° de acceso en Genbank NP_001774.1;
 documento WO2003088808, documento US20030228319; documento WO2003062401 (reivindicación 9);
 documento US2002150573 (reivindicación 4, páginas 13-14); documento WO9958658 (reivindicación 13, Fig 16);
 10 documento WO9207574 (Fig 1); documento US5644033; Ha et al. (1992) J. Immunol. 148 (5): 1526-1531; Mueller et al (1992) Eur. J. Biochem. 22: 1621-1625; Hashimoto et al. (1994) Immunogenetics 40(4): 287-295; Preud'homme e al. (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1):141-146; Yu et al. (1992) J. Immunol. 148 (2) 633-637; Sakaguchi et al. (1988) EMBO J. 7 (11): 3457-3464;

226 aa

MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSN
 NANVTWVRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNGTLIIQNVNKS HGGIYVCRVQEGNESYQQSCG
 TYLRVRQPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGD
 EYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQGTQDVGSLNIGDVQLEKP

(SEC ID N°: 28)

(29) CXCR5 (receptor del linfoma de Burkitt 1, un receptor acoplado a la proteína G que se activa con la quimioquina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y en la defensa humoral, desempeña un papel en la infección por VIH-2 y quizá en el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma, y leucemia) SECUENCIA DE PROTEÍNA
 15 Total mnypltl...atstltf (1..372; 372 aa), pl: 8.54 PM: 41959 TM: 7 [P] Gen Cromosoma: 11q23.3, N° de acceso en Genbank NP_001707.1;
 documento WO2004040000; documento WO2004015426; documento US2003105292 (Ejemplo 2); documento
 US6555339 (Ejemplo 2); documento WO200261087 (Fig 1); documento WO200157188 (Reivindicación 20,
 20 páginas 269); documento WO200172830 (página 12-13); documento WO200022129 (Ejemplo 1, páginas 152-153, Ejemplo 2, páginas 254-256); documento WO9928468 (reivindicación 1, página 38); documento US5440021
 25 (Ejemplo 2, col 49-52); documento WO9428931 (páginas 56-58); documento WO9217497 (reivindicación 7, Fig 5); Dobner et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22: 2795-2799; Barella et al. (1995) Biochem. J. 309:773-779;

372 aa

MNYPLTLEMDLENLEDLFWELDRLDNYNDTSLVENHLCPATEGPLMASFKAVFVPVAYSL
IFLLGVIGNVLVLVILERHRQTRSSTETFLFHLAVADLLLVFILPFAVAEGSVGWVLGTF
LCKTVIALHKVNFYCSSLLACIAVDRYLAIVHAVHAYRHRRLLSIHITCGTIWLVGFL
ALPEILFAKVSQGHNNNSLPRCTFSQENQAETHAWFTSRFLYHVAGFLLPMLVMGCYVG
VVHRLRQAQRRPQRQKAVRVAILVTSIFFLCWSPYHIVIFLDTLARLKAVDNTCKLNGSL
PVAITMCEFLGLAHCCINPMLYTFAGVKFRSDLSRLLTKLGCTGPASLCQLFPSWRRSSL
SESENATSLTTF

(SEC ID N°: 29)

(30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula MHC de clase II (antígeno Ia) que se une a péptidos y los presenta a linfocitos T CD4+) SECUENCIA DE PROTEÍNA Total msgswvp...vllpqsc (1..273; 273 aa, pl: 6.56 PM: 30820 TM: 1 [P] Gen Cromosoma: 6p21.3, N° de acceso en Genbank NP_002111.1; Tonnelle et al. (1985) EMBO J. 4 (11): 2839-2847; Jonsson et al. (1989) Immunogenetics 29 (6): 411-413; Beck et al. (1992) J. Mol. Biol. 228: 433-441; Strausberg et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99: 16899-16903; Servenius et al. (1987) J. Biol. Chem. 262: 8759-8766; Beck et al. (1996) J. Mol. Biol. 255: 1-13; Naruse et al. (2002) Tissue Antigens 59: 512-519; documento WO9958658 (reivindicación 13, Fig 15); documento US6153408 (Col 35-38); documento US5976551 (col 168-170); documento US6011146 (col 145-146); Kasahara et al. (1989) Immunogenetics 30 (1): 66-68; Larhammar et al. (1985) J. Biol. Chem. 260 (26): 14111-14119;

273 aa

MSGWVPWVALLVNLTRLDSSMTQGTDSPEDFVIQAKADCYFTNGTEKVQFVVRFI FNL
EEYVRFDSDVGMFVALTKLGQPDAEQWNSRLDLLERSRQAVDGVCRHNYRLGAPFTVGRK
VQPEVTVYPERTPLLHQHNLHCSVTGFYPGDIKIKWFLNGQEERAGVMSTGPINRGDWT
FQTVVMLEMTPELGHVYTCLVDHSSLLSPVSVEWRAQSEYSWRKMLSGIAAFLGLIFLL
VGIVIQLRQKGYVRTQMSGNEVSRAVLLPQSC

(31) P2X5 (Canal iónico 5 abierto por el ligando receptor purinérgico P2X, un canal aniónico abierto por ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión y en la neurogénesis sináptica, la deficiencia puede contribuir a la patofisiología de inestabilidad) SECUENCIA DE PROTEÍNA Total mgqagck...lephrst (1..422; 422 aa), pl: 7.63, PM: 47206 TM: 1 [P] Gen Cromosoma: 17p13.3, N° de acceso en Genbank NP_002552.2; Le et al. (1997) FEBS Lett. 418 (1-2): 195-199; documento WO2004047749; documento WO2003072035 (reivindicación 10); Touchman et al. (2000) Genome Res. 10: 165-173; documento WO200222660 (reivindicación 20); documento WO2003093444 (reivindicación 1); documento WO2003087768 (reivindicación 1); documento WO2003029277 (página 82);

422 aa

MGQAGCKGLCLSLFDYKTEKYVIAKNKKVGLLYRLLQASILAYLVVWVFLIKKGYQD VDT
SLQSAVITKVKGVAFTNTSDLGQRIWDVADYVIPAQGENVFFVVTNLIVTPNQRQNVCAE
NEGIPDGACSKSDCHAGEAVTAGNGVKTGRCLRRENLARGTCEIFAWCPLETSSRPEEP
FLKEAEDFTIFIKNHIRFPKFNFSKSNVMDVKDRSFLKSCHFGPKNHYCPIFRLGSVIRW
AGSDFQDIALEGGVIGINIEWNCDLDKAASECHPHYSFSRLDNKLSKSVSSGYNFRFARY
YRDAAGVEFRTLKAYGIRFDVMVNGKGAFCDLVLIYLIKKREFYRDKKYEEVRGLED
SQEAEDEASGLGLSEQLTSGPGLLGMPQQELQEPPEAKRGSSSQKNGSVCPQLLEPHR
ST

(SEC ID N°: 31)

(33) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de linfocitos B , Lyb-2) SECUENCIA DE PROTEÍNA Total

maeaity...tafrpd (1..359; 359 aa), pl: 8.66, PM: 40225 TM: 1 [P] Gen Cromosoma: 9p13.3, N° de acceso en Genbank NP_001773.1; documento WO2004042346 (reivindicación 65); documento WO2003026493 (páginas 51-52, 57-58); documento WO200075655 (páginas 105-106); Von Hoegen et al. (1990) J. Immunol. 144 (12): 4870-4877; Strausberg et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99: 16899-16903;

359 aa

MAEAITYADLRVFKAPLKKS ISSRLGQDPGADDDGEITYENVQVPAVLGVPSSSLASSVLG
DKAAVKSEQPTASWRAVTS PAVGRILPCRITCLRYLLLGLLLTCLLLGVTAICLGVRYLQ
VSQQLQQTNRVLEVTNSSLRQQLRLKITQLGQSAEDLQGSRRRLAQSQEALQVEQRAHQA
AEGQLQACQADRQKTKETLQSEEQRRRALEQKLSNMENRLKPFFTCGSADTCCPSGWIMH
QKSCFYISLTSKNWQESQKQCETLSSKLATFSEIYPQSHSYFFLNSLLPNGGSGNSYWTG
LSSNKDWKLTDDETQRTTYAQSSKCNKVHKTWSWWTLESESCRSSLFYICEMTAFRFPD

(SEC ID N°: 32)

(33) LY64 (Antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repetición rica en leucina (LRR), regula la activación y apoptosis de linfocitos B, la pérdida de función está asociada con mayor actividad de la enfermedad en pacientes con lupus sistémico eritematoso) SECUENCIA DE PROTEÍNA Total mafdvsc...rwyqhi (1..661; 661 aa), pl: 6.20, PM: 74147 TM: 1 [P] Gen Cromosoma: 5q12, N° de acceso en Genbank NP_005573.1; documento US2002193567; documento WO9707198 (reivindicación 11, páginas 39-42); Miura et al. (1996) Genomics 3 (3): 299-304; Miura et al. (1998) Blood 92: 2815-2822; documento WO2003083047; documento WO9744452 (reivindicación 8, páginas 57-61); documento W0200012130 (páginas 24-26);

661 aa

MAFDVSCFFWVVLFSAGCKVITSWDQMCIEKEANKTYNCENLGLSEIPDTLPNTTEFLEF
SFNFLTPTIHNRTFSRLMNLTFDLTRCQINWIHEDTFQSHHQLSTLVLTGNPLIFMAETS
LNGPKSLKHLFLIQTGISNLEFIPVHNLENLESYLGSNHISSIKFPKDFPARNLKVLDL
QNNAIHYISREDMRSLEQAINLSLNFNGNNVKGIELGAFDSTVFQSLNFGGTPNLSVIFN
GLQNSTTQSLWLGTFEDIDDEDISSAMKGLCEMSVESLNLQEHFSDISSTTFQCFTQL
QELDLTATHLKGPSGMKGLNLLKLVLSVNHFQDQLCQISAANFPSLTHLYIRGNVKKLH
LGVGCLEKLGNLQTLDSLNDIEASDCSLQKLNLSHLQTLNLSHNEPLGLQSQAFKECP
QLELLDLAFTRLHINAPQSPFQNLHFLQVLNLTFCFLDTSNQHLLAGLPVLRHLNLKGNH
FQDGTITKTNLLQTVGSLEVLISSCGLLSIDQQAFLSLGKMSHVDLSHNSLTCDSDSL
SHLKGIIYLNLAANSINIISPRLLPILSQQSTINLSHNPLDCTCSNIHFLTWYKENLHKLE
GSEETTCANPPSLRGVKLSDVKLSCGITAIGIFFLIVFLLLLAILLFFAVKYLLRWKYQH
I

(SEC ID N°: 33)

(34) FCRH1 (proteína 1 de tipo receptor de Fc, 1 supuesto receptor para el dominio Fc de la inmunoglobulina que contiene los dominios similar a Ig de tipo C2 e ITAM, puede tener un papel en la diferenciación de linfocitos B) SECUENCIA DE PROTEÍNA Total mlprrll...vdy-dam (1..429; 429 aa), pl: 5.28, PM: 46925 TM: 1 [P] Gen Cromosoma: 1q21-1q22, N° de acceso en Genbank NP_443170.1; documento WO2003077836; documento WO200138490 (reivindicación 6, Fig 18E-1-18-E-2); Davis et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98 (17): 9772-9777; documento WO2003089624 (reivindicación 8); documento EP1347046 (reivindicación 1); documento WO2003089624 (reivindicación 7);

429 aa

MLPRLLLILCAPLCEPAELFLIASPSHPTEGSPVTLTCKMPFLQSSDAQFQFCFFRDTRA
 LGPGWSSSPKLQIAAMWKEDTGSYWCEAQTMAKVLRSRRSQINVHRVPVADVSLETQPP
 GGQVMEGDRVLICSVAMGTGDITFLWYKGAUGLNLQSKTQSRSLTAEYEIPSVRESDAEQ

YYCVAENGYGPSPSGLVSITVRIPVSRPILMLRAPRAQAAVEDVLELHCEALRGSPPILY
 WFYHEDITLGSRSAPSGGGASFNLSTEEHSGNYSCEANGLGAQRSEAVTLNFTVPTGA
 RSNHLTSGVIEGLLSTLGPATVALLFCYGLKRKIGRRSARDPLRSLPSPLPQEFTYLNSP
 TPGQLQPIYENVNVVSGDEVYSLAYNQPEQESVAAETLGTHMEDKVSLEIYSRLRKANI
 TDVDYEDAM

(SEC ID N°: 34)

(35) IRTA2 (Translocación asociada al receptor 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas, un supuesto
 inmunoreceptor con posibles papeles en el desarrollo y la linfomagénesis de linfocitos B; la desregulación de los
 genes por translocación se produce en algunas neoplasias de linfocitos B) SECUENCIA DE PROTEÍNA Total
 mllwvil...assaphr (1..977; 977 aa), pl: 6.88 PM: 106468 TM: 1 [P] Gen Cromosoma: 1q21, N° de acceso en
 Genbank NP_112571.1; documento WO2003024392 (reivindicación 2, Fig 97); Nakayama et al. (2000) Biochem.
 Biophys. Res. Commun. 277 (1): 124-127; documento WO2003077836; documento WO200138490
 (reivindicación 3, Fig 18B-1-18B-2);

977 aa

MLLWVILLVLAPVSGQFARTPRPIIFLQPPWTTVFQGERVTLTCKGFRFYSPQKTKWYHR
 YLGKEILRETPDNILEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVHLDFSSASLILQAPLSVFEGDSV
 LRCRAKAEVTLNNTIYKNDNVLAFLNKRTDFHIFHACLKDNGAYRCTGYKESCCPVSSNT
 VKIQVQEPFTRPVLRASSFQPISGNPVTLTCTQLSLERSDVPLRFRFFRDDQTLGLGWS
 LSPNFQITAMWSDSGFYWCKAATMPHSVISDSRPSWIQVQIPASHPVLTLSPEKALNFE
 GTKVTLLHCETQEDSLRTLRYFYHEGVPLRHKSVCRCERGASISFSLTTENSGNYYCTADNG
 LGAKPSKAVSLSVTVPVSHPVNLSSPEDLIFEGAKVTLHCEAQRGSLPILYQFHEDAA
 LERRSANSAGGVAISFSLTAEHSGNYYCTADNGFGPQRSKAVSLSVTVPVSHPVLTLSA
 EALTFEAGATVTLHCEVQRGSPQILYQFYHEDMPLWSSSTPSVGRVSFSFSLTEGHSGNYY
 CTADNGFGPQRSEVVSFVTVPVSRPILTLRVPRQAQAVVGDLLELHCEAPRGSPPILYWF
 YHEDVTLGSSSAPSGGEASFNLSTAEHSGNYSCEANGLVAQHSDTISLSVIVPVSRPI
 LTFRAPRAQAVVGDLLELHCEALRGSSPILYWFYHEDVTLGKISAPSGGGASFNLSTTE
 HSGIYSCEADNGPEAQRSEMVTLKVAVPVSRPVLTLRAPGTHAAVVGDLLELHCEALRGSP
 LILYRFFHEDVTLGNRSSPSGGASLNLSTAEHSGNYSCEADNGLGAQRSETVTLTYITGL
 TANRSGPFATGVAGGLLSIAGLAAGALLLYCWLRSRKGAKRPASDPARSPPDSQSEPTYH
 NVPaweELQPVYTNANPRGENVVYSEVRIIQEKKKHAVASDPRHLRNKGSPIIYSEVKVA
 STPVSGSLFLASSAPHR

(SEC ID N°: 35)

Véase también: documento WO4/045516 (03 Jun 2004); documento WO3/000113 (03 Ene 2003); documento
 WO02/016429 (28 Feb 2002); documento WO2/16581 (28 Feb 2002); documento WO3/024392 (27 Mar 2003);
 documento WO4/016225 (26 Feb 2004); documento WO1/40309 (07 Jun 2001), y solicitud de patente Provisional
 de Estados Unidos con N° de Serie 60/520842 "COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF
 TUMOR OF HEMATOPOIETIC ORIGIN", presentada el 17 Nov 2003; todos los cuales se incorporan en el presente
 documento por referencia en su totalidad.

En una realización, el Conjugado de Ligando-Conector-Fármaco tiene la Fórmula IIIa, en la que el Ligando es un

anticuerpo Ab que incluye uno que se une a al menos un antígeno de CD30, CD40, CD70, Lewis Y, $w = 0$, $y = 0$, y D tiene la Fórmula Ib. Conjugados a Modo de ejemplo de Fórmula IIIa incluyen aquéllos en los que R^{17} es $-(CH_2)_5-$. Además, se incluyen dichos Conjugados de Fórmula IIIa en la que D tiene la estructura del Compuesto 2 en el Ejemplo 3 y ésteres del mismo. Además, se incluyen dichos Conjugados de Fórmula IIIa que contienen de

aproximadamente 3 a aproximadamente 8, en un aspecto, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 restos de Fármaco D, es decir, los Conjugados de Fórmula Ia en la que p es un valor en el intervalo de aproximadamente 3-8, por ejemplo aproximadamente 3-5. Los Conjugados que contienen combinaciones de las características estructurales que se indican en este párrafo también se contemplan dentro del alcance de los compuestos de la invención.

En otra realización, el Conjugado de Ligando-Conector-Fármaco tiene la Fórmula IIIa, en la que el Ligando es un Anticuerpo Ab que se une a un antígeno de CD30, CD40, CD70, Lewis Y, $w = 1$, $y = 0$, y D tiene la Fórmula Ib. Se incluyen dichos Conjugados de Fórmula IIIa en la que R^{17} es $-(CH_2)_5-$. Además, se incluyen dichos Conjugados de Fórmula IIIa en la que W es -Val-Cit-, y/o en la que D tiene la estructura del Compuesto 2 en el Ejemplo 3 y ésteres del mismo. Además, se incluyen dichos Conjugados de Fórmula IIIa que contienen de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, preferentemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 restos de Fármaco D, es decir, Conjugados de Fórmula Ia en la que p es un valor en el intervalo de aproximadamente 3-8, preferentemente de aproximadamente 3-5. Los Conjugados que contienen combinaciones de las características estructurales que se indican en este párrafo también son a modo de ejemplo.

En una realización, el Conjugado de Ligando-Conector-Fármaco tiene la Fórmula IIIa, en la que el Ligando es un Anticuerpo Ab que se une a un antígeno de CD30, CD40, CD70, Lewis Y, $w = 1$, $y = 1$, y D tiene la Fórmula Ib. Se incluyen los Conjugados de Fórmula IIIa en la que R^{17} es $-(CH_2)_5-$. Además, se incluyen dichos Conjugados de Fórmula IIIa en la que: W es -Val-Cit-; Y has Fórmula X; D tiene la estructura del Compuesto 2 en el Ejemplo 3 y ésteres del mismo; p es de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, preferentemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 restos de Fármaco D. Los Conjugados que contienen combinaciones de las características estructurales que se indican en este párrafo también se contemplan dentro del alcance de los compuestos de la invención.

Una realización adicional es un conjugado de anticuerpo fármaco (ADC), o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que Ab es un anticuerpo que se une a uno de los antígenos asociados a tumores (1)-(35) que se han indicado anteriormente (el "Compuesto TAA").

Otra realización es el Compuesto TAA o sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo que está en forma aislada y purificada.

Otra realización es un método para eliminar o inhibir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa que comprende administrar a un paciente, por ejemplo un ser humano con un trastorno hiperproliferativo, una cantidad del Compuesto TAA o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, siendo dicha cantidad eficaz para eliminar o inhibir la multiplicación de una célula tumoral o una célula cancerosa.

Otra realización es un método para tratar cáncer que comprende administrar a un paciente, por ejemplo un ser humano con un trastorno hiperproliferativo, una cantidad del Compuesto TAA o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, siendo dicha cantidad eficaz para tratar cáncer, solo o junto con una cantidad eficaz de un agente anticáncer adicional.

Otra realización es un método para tratar una enfermedad autoinmune, que comprende administrar a un paciente, por ejemplo un ser humano con un trastorno hiperproliferativo, una cantidad del Compuesto TAA o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, siendo dicha cantidad eficaz para tratar una enfermedad autoinmune.

Los antídotos adecuados para su uso en la invención se pueden producir mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o mediante expresión recombinante, y se producen preferentemente mediante técnicas de expresión recombinante.

4.5.1 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES

Los anticuerpos de la invención se pueden producir usando cualquier método conocido en la técnica por ser útil para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o mediante expresión recombinante.

La expresión recombinante de anticuerpos, o fragmento, derivado o análogo de los mismos, requiere la construcción de un ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo se pueden ensamblar a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (*por ejemplo*, tal como se describe en Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17: 242), que implica la síntesis de oligonucleótidos de solapamiento que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, hibridación y ligadura de esos oligonucleótidos, y a continuación amplificación de los oligonucleótidos ligados, *por ejemplo*, por

PCR.

Como alternativa, una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo se puede generar a partir de una fuente adecuada. Si un clon que contiene el ácido nucleico que codifica el anticuerpo en particular no está disponible, pero se conoce la secuencia del anticuerpo, se puede obtener un ácido nucleico que codifica el anticuerpo a partir de una fuente adecuada (*por ejemplo*, una biblioteca de cADN de anticuerpos, o una biblioteca de cADN generada a partir de cualquier tejido o células que expresan la inmunoglobulina) mediante, *por ejemplo*, amplificación por PCR usando cebadores sintéticos que se pueden hibridar en los extremos 3' y 5' de la secuencia mediante clonación usando una secuencia de oligonucleótidos específica para la secuencia genética en particular.

Si un anticuerpo que reconoce específicamente un antígeno en particular no está disponible en el mercado (o una fuente para una biblioteca de cADN para clonar un ácido nucleico que codifica dicha inmunoglobulina), los anticuerpos específicos para un antígeno en particular se pueden generar mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por inmunización de un paciente, o modelo animal adecuado tal como conejo o ratón, para generar anticuerpos policlonales o, más preferentemente, mediante generación de anticuerpos monoclonales, *por ejemplo*, tal como se describe en Kohler y Milstein (1975, Nature 256: 495-497) o, tal como se describe en Kozbor et al. (1983, Immunology Today 4:72) o Cole et al. (1985 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96). Como alternativa, se puede obtener un clon que codifica al menos la porción Fab del anticuerpo por cribado de bibliotecas de expresión de Fab (por ejemplo, tal como se describe en Huse et al., 1989, Science 246: 1275-1281) para clones de fragmentos de Fab que se unen al antígeno específico o mediante cribado de bibliotecas de anticuerpos (Véase, *por ejemplo*, Clackson et al., 1991, Nature 352: 624; Hane et al., 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4937).

Una vez que se obtiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifican al menos el dominio variable del anticuerpo, se puede introducir en un vector que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica las regiones constantes del anticuerpo (véase, *por ejemplo*, Publicación Internacional N° WO 86/05807; documento WO 89/01036; y Patente de Estados Unidos N° 5122464). Están disponibles vectores que contienen la cadena ligera o pesada completa que permite la expresión de una molécula completa de anticuerpo. A continuación, se puede usar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo para introducir las sustituciones o supresiones de nucleótidos necesarias para sustituir (o suprimir) el uno o más restos de cisteína de la región variable que participan en una unión disulfuro intracadena con un resto de aminoácido que no contiene un grupo sulfhidrilo. Dichas modificaciones se pueden realizar mediante cualquier método conocido en la técnica para la introducción de mutaciones o supresiones específicas en una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, pero no se limitan a, mutagénesis química y mutagénesis dirigida al sitio *in vitro* (Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem. 253: 6551).

Además, se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312: 604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314: 452-454) mediante empalme de genes a partir del molécula de anticuerpos de ratón de una especificidad a antígenos apropiada junto con genes a partir de una molécula de anticuerpo humano y actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal de murino y una región constante de inmunoglobulina humana, *por ejemplo*, anticuerpos humanizados.

Como alternativa, técnicas que se describen para la producción de anticuerpos de una sola cadena (Patente de Estados Unidos N° 4.694.778; Bird, 1988, Science 242: 423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; y Ward et al., 1989, Nature 334: 544-54) se pueden adaptar para producir anticuerpos de una sola cadena. Los anticuerpos de una sola cadena se forman por unión de los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácido, dando como resultado un polipéptido de una sola cadena. Además, se pueden usar técnicas para el ensamblaje de fragmentos funcionales de Fv en *E. coli* (Skerra et al., 1988, Science 242: 1038-1041).

Se pueden generar fragmentos de anticuerpos que reconocen epítomos específicos mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, pero no se limitan a los fragmentos de F(ab')₂ que se pueden producir mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos de Fab que se pueden generar por reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos de F(ab')₂.

Una vez que se ha obtenido una secuencia de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo, el vector para la producción del anticuerpo se puede producir mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la materia. Se pueden usar métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen las secuencias que codifican el anticuerpo y señales de control de transcripción y traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las técnicas que se describen en Sambrook et al. (1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) y Ausubel et al. (eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de un anticuerpo o la secuencia de nucleótidos

de un anticuerpo se puede transferir a una célula huésped mediante técnicas convencionales (*por ejemplo*, electroporación, transfección liposomal, y precipitación con fosfato de calcio), y las células transfectadas se cultivan a continuación mediante técnicas convencionales para producir el anticuerpo. En realizaciones específicas, la expresión del anticuerpo se regula mediante un promotor específico constitutivo, inducible o un tejido.

Las células huésped usadas para expresar el anticuerpo recombinante pueden ser células bacterianas tales como *Escherichia coli*, o, preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de toda la molécula de inmunoglobulina recombinante. En particular, células de mamíferos tales como células de ovario de hámster chino (CHO), en conjunto con un vector tal como el elemento promotor genético primitivo intermedio principal de citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para inmunoglobulinas (Foecking et al., 198, Gene 45:101; Cockett et al., 1990, BioTechnology 8:2).

Diversos sistemas de vectores de expresión en huésped se puede usar para expresar los anticuerpos de inmunoglobulina. Dichos sistemas de expresión en huésped representan vehículos mediante los cuales se pueden producir las secuencias de codificación del anticuerpo y purificar posteriormente, pero también representan células que, cuando se transforma o se transfectan con la secuencia de codificación de nucleótidos apropiada, expresan una molécula de inmunoglobulina de anticuerpo *in situ*. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (*por ejemplo*, *E. coli* y *B. subtilis*) transformados con vectores de expresión de ADN bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o ADN cósmido que contiene secuencias de codificación de inmunoglobulina; levadura (*por ejemplo*, *Saccharomyces Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen secuencias de codificación de inmunoglobulina; sistemas celulares de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinante (*por ejemplo*, baculovirus) que contienen las secuencias de codificación de inmunoglobulina; sistemas celulares vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinante virus (*por ejemplo*, virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico del tabaco (TMV)) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (*por ejemplo*, plásmido Ti) que contienen secuencias de codificación de inmunoglobulina; o sistemas celulares de mamífero (*por ejemplo*, células COS, CHO, BH, 293, 293T, 3T3) que albergan constructos de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (*por ejemplo*, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (*por ejemplo*, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus de vaccinia).

En sistemas bacterianos, un número de vectores de expresión se puede seleccionar ventajosamente dependiendo del uso pretendido para el anticuerpo que se está expresando. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína, podrían ser deseables vectores que dirigen la expresión de niveles altos de productos de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector pUR278 de expresión de *E. coli* (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791), en el que la secuencia que codifica el anticuerpo se puede liberar individualmente en el vector en marco con la región de codificación *lac Z* de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509); y similares. Además, se pueden usar Vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas por adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de proteasa de trombina o factor Xa de modo que el producto genético diana clonado se puede liberar del resto de GST.

En un sistema de insecto, el virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) o el virus análogo de *Drosophila Melanogaster* se usa como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia que codifica anticuerpos se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (*por ejemplo*, el gen de polihedrina) del virus y colocar bajo control de un promotor AcNPV (*por ejemplo* el promotor de polihedrina).

En células huésped de mamífero, se puede usar un número de sistemas de expresión basados en virus. En casos en los que se usa un adenovirus como un vector de expresión, la secuencia que codifica anticuerpos de interés se puede ligar un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, *por ejemplo*, el promotor tardío y la secuencia directora tripartita. Este gen quimérico se puede insertar a continuación en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (*por ejemplo*, la región E1 o E3) da como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de inmunoglobulina en huéspedes infectados (*por ejemplo*, véase Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 355-359). Además como señales de iniciación específicas pueden ser necesarias para una traducción eficaz de secuencias de codificación de anticuerpos insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción de todo el inserto. Estas señales exógenas de control de traducción y codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de expresión se puede potenciar con la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminado desde transcripción, etc. (véase Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153: 51-544).

Además, se puede elegir una cepa de célula huésped para modular la expresión de las secuencias insertadas, o

modificar y procesar el producto genético en la forma específica deseada. Dichas modificaciones (*por ejemplo*, glicosilación) y procesamiento (*por ejemplo*, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación después de la traducción de productos proteicos y genéticos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas de huésped apropiados para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña expresada. Para este fin, se pueden usar células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para procesamiento apropiado del transcripto primario, glicosilación, y fosforilación del producto genético. Dichas células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a, CHO, VERY, BH, HeLa, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.

Para producción de proteínas recombinantes con alto rendimiento, a largo plazo, es precedente la expresión estable. Por ejemplo, se puede modificar genéticamente líneas celulares que expresan de forma estable un anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, se pueden transformar células huésped con ADN controlado mediante elementos de control de expresión apropiados (*por ejemplo*, promotor, potenciador, secuencias, terminado desde la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador que se puede seleccionar. Después de la introducción del ADN extraño, se puede permitir que células modificadas genéticamente crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y a continuación se intercambian a un medio selectivo. El marcador que se puede seleccionar en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez se pueden clonar y expandir en líneas celulares. Este método se puede usar ventajosamente para modificar genéticamente líneas celulares que expresan el anticuerpo. Dichas líneas celulares modificadas genéticamente pueden ser particularmente útiles en el cribado y evaluación de antígenos tumorales que interactúan directa o indirectamente con el anticuerpo.

Se puede usar un número de sistemas de selección, que incluyen pero no se limitan a la timidina quinasa del virus del herpes simplex (Wigler et al., 1977, Cell 11: 223), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 192, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., 1980, Cell 22: 817), se pueden usar genes en células tk-, hgprt- o apt-, respectivamente. Además, se puede usar resistencia antimetabolitos como la base de selección para los siguientes genes: DHFR, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Clinical Pharmacy 12: 488-505; Wu y Wu, 1991, Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596; Mulligan, 1993, Science 260: 926-932; y Morgan y Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; mayo de 1993, TIB TECH 11 (5): 155-215) e hgro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre et al., 1984, Gene 30: 147). Los métodos conocidos normalmente en la técnica de tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel et al. (eds., 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1).

Los niveles de expresión de un anticuerpo se pueden elevar por amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa un anticuerpo se puede amplificar, un aumento en el nivel de inhibir el presente en cultivo de células huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada se asocia con la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

La célula huésped se puede cotransfectar con dos vectores de expresión, el primer vector que codifica una cadena pesada derivada de polipéptidos y el segundo vector que codifica una cadena ligera derivada de polipéptidos. Los dos lectores pueden contener marcadores idénticos que se pueden seleccionar que permiten la misma expresión de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, se puede usar un solo vector que codifique polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera se debería colocar antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada sin tóxicos (Proudfoot, 1986, Nature 322: 52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2197). Las secuencias de codificación para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender cADN o ADN genómico.

Una vez que el anticuerpo se ha expresado de forma recombinante, se puede purificar usando cualquier método conocido en la técnica a la purificación de un anticuerpo, por ejemplo, por cromatografía (*por ejemplo*, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad para el antígeno específico después de Proteína A, y cromatografía de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas.

Además, en otra realización a modo de ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En cualquier caso, los anticuerpos híbridos tienen una especificidad doble, preferentemente con uno o más sitios de

unión específicos para el hapteno de elección o uno o más sitios de unión específicos para un o antígeno diana, por ejemplo, un antígeno asociado con un tumor, una enfermedad autoinmune, un organismo infeccioso, u otro estado de enfermedad.

5 **4.5.2 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS**

La producción de anticuerpos se ilustrará con referencia a anticuerpos anti-CD30 pero será evidente para los expertos en la materia que se pueden producir anticuerpos para otros miembros de la familia de receptores la TNF y modificar de una manera similar. El uso de CD30 para la producción de anticuerpos se hace solamente a modo de ejemplo y no pretende ser limitante.

El antígeno CD30 a usar para la producción de anticuerpos puede ser, *por ejemplo*, una forma soluble del dominio extracelular de CD30 o una porción del mismo, que contiene el epítipo deseado. Como alternativa, las células que expresan CD30 en su superficie celular (*por ejemplo*, L540 (línea celular derivada de linfoma Hodgkin con un fenotipo de linfocitos T) y L428 (línea celular derivada de linfoma Hodgkin con un fenotipo de linfocitos B)) se pueden usar para generar anticuerpos. Otras formas de CD30 útiles para generar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia.

En otra realización a modo de ejemplo, el antígeno ErbB2 a usar para la producción de anticuerpos puede ser, *por ejemplo*, una forma soluble del dominio extracelular de ErbB2 o una porción del mismo, que contiene el epítipo deseado. Como alternativa, las células que expresan ErbB2 en su superficie celular (*por ejemplo*, células NIH-3T3 transformadas para que sobreexpresen ErbB2; o una línea celular de carcinoma tal como células SK-BR-3, véase Stancovski et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8691-8695 (1991)) se pueden usar para generar anticuerpos. Otras formas de ErbB2 útiles para generar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia.

25 **(i) Anticuerpos Policlonales**

Los anticuerpos policlonales aumentan preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que es inmunogénica en las especies a inmunizar, *por ejemplo*, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o de derivatización, por ejemplo, éster de maleimidobenzóil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en el que R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan frente al antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados por combinación, *por ejemplo*, de 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y la solución se inyecta por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde, se extrae sangre a los animales y el suero se somete al ensayo para título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta las mesetas del título. Preferentemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden preparar en cultivo celular recombinante en forma de fusiones de proteínas. Además, agentes de agregación tales como alum se usan adecuadamente para potenciar la respuesta inmune.

50 **(ii) Anticuerpos Monoclonales**

Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos básicamente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que no es una mezcla de anticuerpos distintos.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando el método del hibridoma que se describió primero en y Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975), o se puede preparar mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos N° 4816567).

En el método del hibridoma, un ratón otro modelo animal apropiado, tal como un hámster, se inmuniza tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento para hacer que los linfocitos que producen o que son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína se usen para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación, los linfocitos se funden con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de

mieloma precursoras, sin fundir. Por ejemplo, si las células de mieloma precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá por lo general hipoxantina, aminopterina, y timidinla (medio de HAT), cuyas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferentes son las que se funden de forma eficaz, mantienen un nivel alto estable de producción de anticuerpos mediante las células seleccionadas que producen anticuerpos, y son sensibles a un medio tal como medio de HAT. Entre éstas, las líneas celulares de mieloma preferentes son líneas de mieloma de murino, tales como las obtenidas a partir de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Mariland USA. Además, se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); y Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

Los medios de cultivo en los que se cultivan células de hibridoma se someten a ensayo para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal, por ejemplo, se puede determinar con el análisis Scatchard de Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad, y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar con métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.

Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido de ascitis, o suero con procedimientos convencionales de purificación de anticuerpos tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía por afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (*por ejemplo*, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de murino). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli* cells, células COS de simios, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otro modo proteínas de anticuerpos, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Artículos de revisión sobre expresión recombinantes en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256-262 (1993) y Plückthun, Immunol. Revs., 130: 151-188 (1992).

En una realización más, anticuerpos monoclonales o fragmento de anticuerpos se pueden aislar a partir de fagotecas de anticuerpos generadas usando las técnicas que se describen en McCafferty et al., Nature, 348: 552-554 (1990). Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos de murino y malos, respectivamente, usando fagotecas. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (de rango nM) human mediante redistribución de cadenas (Marks et al., Bio/technology, 10: 779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir fagotecas muy grandes (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21: 2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpo monoclonal para aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Además, el ADN puede modificar, por ejemplo, mediante sustitución de la secuencia de codificación para dominios constantes de cadena pesada y cadena ligera humanos en lugar de las secuencias de murino homólogas (Patente de Estados Unidos N° 4816567; y Morrison, et al. (1984) Proc. Natl Acad. Sci. USA 81:6851), o mediante unión covalente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido de no inmunoglobulina.

Por lo general, dichos polipéptidos de no inmunoglobulina se sustituyen para los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen para los dominios variables de un sitio de combinación con antígenos de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación con antígenos que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación con antígenos que tiene especificidad para un antígeno diferente.

(iii) Anticuerpos Humanizados

Un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácido no humano a menudo se denominan restos "de importación", que por lo general se toman de un dominio variable "de importación". La humanización se puede realizar básicamente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science* 239: 1534-1536 (1988)), mediante sustitución de secuencias de la región hipervariable las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567) en los que básicamente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son por lo general anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algún resto de FR están sustituidos con restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a usar en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se identifica sistemáticamente frente a toda la biblioteca de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana es la más cercana a la del roedor se acepta a continuación como la región marco humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chotia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método usa una región marco en particular obtenida a partir de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

En otra realización, los anticuerpos se pueden humanizar con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Los anticuerpos humanizados se pueden preparar mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursora y humanizada. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están disponibles habitualmente son familiares para los expertos en la materia. Están disponibles programas de ordenador que ilustran y presentan estructuras conformacionales en tres dimensiones probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias, receptora y de importación, de modo que se consigue la característica deseada del anticuerpo, tal como mayor afinidad por el antígeno o antígenos diana. En general, los restos de la región hipervariable están directamente y más básicamente implicados en la influenciación de la unión a antígenos.

Se contemplan diversas formas del anticuerpo 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 de IgG1 intacto.

Los Ejemplos describen la producción de un anticuerpo anti-ErbB2 humanizado a modo de ejemplo. El anticuerpo humanizado puede comprender, por ejemplo, restos de la región hipervariable no humana incorporados en un dominio pesado variable humano y puede comprender adicionalmente una sustitución de la región marco (FR) en una posición seleccionada entre el grupo que consiste en 69H, 71H y 73H usando el sistema de numeración del dominio variable se establece en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una realización, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones de FR endosó todas las posiciones de 69H, 71H y 73H. Otro Ejemplo describe la preparación de anticuerpo de trastuzumab unificado a partir de la formulación de HERCEPTIN®.

(iv) Anticuerpos Humanos

Como una alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, en la actualidad es posible producir animales transgénicos (*por ejemplo*, ratones) que son capaces, después de inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógenas. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigoto del gen de la región de unión de cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz del gen de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos después de la estimulación con antígenos. Véase, *por ejemplo*, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); y Patentes de Estados Unidos Nº 5.591.669, Nº 5.589.369 y Nº 5.545.807.

Como alternativa, se puede usar tecnología de presentación de fagos (McCafferty et al., *Nature* 348: 552-553 (1990)) para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos *in vitro*, a partir de repertorios genéticos dominio variable (V) de inmunoglobulina a partir de donantes sin inmunizar. De acuerdo con esta técnica, genes de dominio V de anticuerpos se clona en el marco en un gen de proteína de revestimiento principal o secundario de un

bacteriófago filamentosos, tal como M13 o fd, y se presenta como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosos contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basándose en las propiedades funcionales del anticuerpo también darán como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de los linfocitos B. La presentación de fagos se puede realizar en diversos formatos; para su revisión véanse, por *ejemplo*, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de gen V para presentación de fagos. Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) aislaron una matriz variada de anticuerpos de anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V obtenidos a partir de los bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de parlantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos para una matriz variada de antígenos (que incluye autoantígenos) básicamente siguiendo las técnicas que se describen en Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), o Griffith et al., *EMBO J.* 12: 725-734 (1993). Véanse, también, las Patentes de Estados Unidos N° 5565332 y N° 5573905. Tal como se ha analizado anteriormente, también se pueden generar anticuerpos humanos mediante linfocitos B activados *in vitro* (véanse las Patentes de Estados Unidos N° 5567610 y N° 5229275). Anticuerpos anti-CD30 humanos se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con N° de Serie 10/338.366.

(v) Fragmentos de anticuerpos

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían a través de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, *por ejemplo*, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992); y Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir en la actualidad directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar a partir de las fagotecas de anticuerpos que se han analizado anteriormente. Como alternativa, fragmentos de Fab'-SH pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos de F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, se pueden usar fragmentos de F(ab')₂ directamente de cultivos de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento de Fv de una sola cadena (scFv). Véanse el documento WO 93/16185; Patente de Estados Unidos N° 5.571.894; y Patente de Estados Unidos N° 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", *por ejemplo*, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.641.870 por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o específicos.

(vi) Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes de la proteína CD30. Como alternativa, una rama anti-CD30 se puede combinar con una rama que se une a receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD 16) para enfocar mecanismos de defensa celular a la célula que expresa CD30. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para localizar citotóxicos para células que expresan CD30.

La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud total se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein et al., *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas diferentes de anticuerpo, de las que solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza mediante etapas de cromatografía por afinidad, es bastante difícil de manejar, y los rendimientos del producto son bajos. Procedimientos similares se desvelan en el documento WO 93/08829, y en Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991). De acuerdo con un enfoque diferente, dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se condensan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones CH2, y CH3, bisagra. Es preferente que la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para unión a la cadena ligera, esté presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación para dos o todas las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado altos rendimientos cuando las relaciones no son particularmente significativas.

En una realización de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están formados por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama, y un par híbrido de cadena pesada-

cadena ligera de inmunoglobulina (que proporciona una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina solamente en una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo de separación fácil. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales para generar anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque que se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.731.168, la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpos que se pueden modificar genéticamente para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan a partir del cultivo celular recombinante. La superficie de contacto preferente comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (*por ejemplo*, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar al de la cadena o cadenas laterales grandes en la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácido grandes con otras más pequeñas (*por ejemplo*, alanina o treonina). Ésto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos secundarios no deseados tales como homodímeros.

También se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando unión química. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos de F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente arsenito sódico de formación de complejos de ditiol para estabilizar ditioles vecinales y prevenir la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos de Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se vuelve a convertir a continuación en el Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los avances recientes han facilitado la recuperación directa de fragmentos de Fab'-SH a partir de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo F(ab')₂ biespecífico totalmente humanizado. Cada fragmento de Fab' fue segregado separadamente de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico.

Además, se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148 (5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina a partir de las proteínas Fos y Jun se unieron con las porciones de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión genética. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación volver a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también se puede usar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" que se describe en Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de cadena ligera (V_L) con un conector que es demasiado corto, para permitir el emparejamiento en los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se ven forzados a emparejarse con los dominios complementarios de V_L y V_H de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. Además se ha indicado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de una sola cadena (sFv). Véase Gruber et al., *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

(vii) Otras modificaciones en la secuencia de aminoácidos

Se contemplan modificación o modificaciones en la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos que se describen en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de secuencias de aminoácidos mediante introducción de cambios apropiados de nucleótidos en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones a partir de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se prepara cualquier combinación de supresión, inserción, y sustitución para llegar al constructo final, con la condición de que el constructo final posea las características deseadas. Los cambios en aminoácidos también pueden alterar los procesos posteriores a la traducción del anticuerpo, tales como el cambio del número o la posición de sitios de glicosilación.

Un método útil para la identificación de determinados restos por regiones del anticuerpo que son ubicaciones favorecidas por la mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración con alanina" tal como se describe en Cunningham y Wells Science, 244: 1081-1085 (1989). Aquí, un resto o grupo de restos diana se identifican (*por ejemplo*, restos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se reemplazan con un aminoácido neutro o cargado negativamente (más preferentemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con antígenos. Esas ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones a continuación se refinan mediante introducción adicional o de otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, a pesar de que el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza exploración con ala o mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las variantes de anticuerpos expresados se identifican sistemáticamente para la actividad deseada.

Inserciones en secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxil-terminal que varían en su longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto de metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula anticuerpo incluyen la fusión con el extremo N o C del anticuerpo con una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado con un resto diferente. Los sitios con el mayor interés para mutagénesis sustitucional incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR.

Modificaciones básicas en las propiedades biológicas del anticuerpo se consiguen seleccionando sustituciones que difiere significativamente en su efecto mediante el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, tiene una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílicos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo particularmente preferente de variante por sustitución implica la sustitución de uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (*por ejemplo*, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo adicional tendrán mejores propiedades biológicas con respecto al anticuerpo precursor a partir del que se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes por sustitución implica maduración por afinidad usando presentación de fagos. En resumen, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las sustituciones posibles amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpos generadas de este modo se presentan de una manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones para el producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. A continuación, las variantes de presentación de fagos se identifican sistemáticamente para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se desvela en el presente documento. Para identificar sitios candidatos de la región hipervariable por modificación, se puede realizar mutagénesis de exploración con alanina para identificar restos de la región hipervariable que contribuye significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas que se elaboran en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado tal como se describen en el presente documento y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, *por ejemplo*, con el fin de mejorar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígenos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, resto o restos de cisteína se pueden introducir en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro entre cadenas de esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o mayor muerte celular mediada por complementos y citotoxicidad celular dependientes de anticuerpos (ADCC). Véase Caron et al. J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). También se pueden preparar anticuerpos homodiméricos con mayor actividad antitumoral usando agentes de reticulación

heterobifuncionales tal como se describe en Wolff et al. Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, un anticuerpo se puede modificar genéticamente para que tenga regiones Fc dobles y de ese modo pueda tener mejor lisis de complemento y capacidades de ADCC. Véase Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

Para aumentar la vida media en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión a receptores de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5739277, por ejemplo. Tal como se usa en el presente documento, el término "epítipo de unión a receptores de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (*por ejemplo*, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable del aumento de la vida media en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

(viii) Variantes de Glicosilación

Los anticuerpos en el ADC de la invención pueden estar glicosilados en posiciones conservadas de sus regiones constantes (Jefferis y Lund, (1997) Chem. Immunol. 65: 111-128; Wright y Morrison, (1997) TibTECH 15: 26-32). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan a la función de la proteína (Boyd et al., (1996) Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe y Howard, (1990) Biochem. 29: 4175-4180), y la interacción intramolecular entre porciones de la glicoproteína que puede afectar a la conformación y presentar superficie tridimensional de la proteína (Hefferis y Lund, *mencionado anteriormente*; Wyss y Wagner, (1996) Current Opin. Biotech. 7: 409-416). Los oligosacáridos también pueden servir para dirigir una glicoproteína dada a determinadas moléculas basándose en estructuras específicas de reconocimiento. Por ejemplo, se ha informado que en IgG agalactosilada, el resto de oligosacárido 'se voltea' fuera del espacio entre -CH₂ y restos de N-acetilglucosamina se hacen disponibles para unirse a la proteína de unión a manosa (Malhotra et al., (1995) Nature Med. 1: 237-243). La retirada mediante glicopeptidasa de los oligosacáridos de CAMPATH-1H (un anticuerpo IgG1 monoclonal de murino humanizado recombinante que reconoce el antígeno CDw52 de linfocitos humanos) producido en Células de Ovario de Hámster Chino (CHO) que como resultado una reducción completa en la lisis mediada por complementos (CMCL) (Boyd et al., (1996) Mol. Immunol. 32: 1311-1318), mientras que la retirada selectiva de restos de ácido siálico usando neuraminidasa dio como resultado ninguna pérdida de DMCL. También se ha informado glicosilación de anticuerpos que afecta a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, se informó que células CHO con expresión regulada por tetraciclina de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glicosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc de bisección, tienen mejor actividad de ADCC (Umana et al. (1999) Mature Biotech. 17: 176-180).

La glicosilación de anticuerpos por lo general está unida a N o unida a O. Unida 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 de asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimáticas del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. Glicosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más habitualmente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

Las variantes de glicosilación de anticuerpos son variantes en las que se altera el patrón de glicosilación de un anticuerpo. Por alteración se hace referencia a la supresión de uno o más restos de hidrato de carbono encontrados en el anticuerpo, añadiendo uno o más restos de hidrato de carbono al anticuerpo, cambiando la composición de la glicosilación (patrón de glicosilación), la extensión de la glicosilación, etc.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas que se han descrito anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración también se puede realizar mediante la adición de, o sustitución con, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O). De forma análoga, la retirada de sitios de glicosilación se puede realizar por alteración de aminoácidos dentro de los sitios de glicosilación nativos del anticuerpo.

La secuencia de aminoácidos normalmente se altera mediante la alteración de la secuencia de ácidos nucleicos subyacente. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio) mutagénesis, mutagénesis por PCR, y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

La glicosilación (incluyendo patrón de glicosilación) de los anticuerpos también se puede alterar sin alterar la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende en gran medida de la célula huésped usada para expresar el anticuerpo. Dado que el tipo celular usado para la expresión de glicoproteínas recombinantes, por ejemplo, anticuerpos, como agentes terapéuticos potenciales es en raras ocasiones la célula nativa, se pueden esperar variaciones significativas en el patrón de glicosilación de los anticuerpos. Véase, *por ejemplo*, Hse et al., (1997) J. Biol. Chem. 272: 9062-9070. Además de la elección de células

huésped, factores que afectan a la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen modo de crecimiento, formulación de medios, densidad de cultivos, oxigenación, pH, esquemas de purificación y similares. Se han propuesto diversos métodos para alterar el patrón de glicosilación conseguido en un organismo huésped en particular que incluyen la introducción o sobreexpresión de determinadas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (Patentes de Estados Unidos N° 5047335; N° 5510261; N° 5278299). La glicosilación, o determinados tipos de glicosilación, se pueden eliminar enzimáticamente de la glicoproteína, por ejemplo usando endoglicosidasa H (Endo H). Además, la célula huésped recombinante se puede modificar genéticamente, por ejemplo, hacerla defectuosa en el procesamiento de determinados tipos de polisacáridos. Estas técnicas y similares son bien conocidas en la técnica.

La estructura de glicosilación de anticuerpos se puede analizar fácilmente mediante técnicas convencionales de análisis de hidratos de carbono, que incluyen cromatografía de lectina, RMN, Espectrometría de masas, HPLC, GPC, análisis composicional de monosacáridos, digestión enzimática secuencial, y HPAEC-PAD, que usa cromatografía de intercambio aniónico a pH elevado para separar oligosacáridos basados en la carga. Además se conocen métodos para la liberación de oligosacáridos para fines analíticos, e incluyen, sin limitación, tratamiento enzimático (realizado normalmente usando péptido-N-glicosidasa F/endo-β-galactosidasa), eliminación usando entorno alcalino riguroso para liberar principalmente estructuras unidas a O, y métodos químicos que usan hidrazina anhidra para liberar oligosacáridos unidos tanto a N como a O.

4.5.2a CRIBADO PARA CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO (ADC)

Animales transgénicos y líneas celulares son particularmente útiles en el cribado de conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) que tienen potencial como tratamientos profilácticos o terapéuticos de enfermedades o trastornos que implican sobreexpresión de proteínas que incluyen Lewis Y, CD30, CD40, y CD70. Animales transgénicos y líneas celulares son particularmente útiles en el cribado de conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) que tienen potencial como tratamientos profilácticos o terapéuticos de enfermedades o trastornos implicados en la sobreexpresión de HER2 (documento US6632979). El cribado para un ADC útil puede implicar la administración de ADC candidato sobre un intervalo de dosis al animal transgénico, y someter a ensayo en diversos puntos temporales para el efecto o efectos del ADC en la enfermedad o trastorno que se está evaluando. Como alternativa, o adicionalmente, el fármaco se puede administrar antes de o simultáneamente con exposición a un inductor de la enfermedad, si fuera aplicable. El ADC candidato se puede identificar sistemáticamente de forma seriada e individualmente, o en paralelo el formato de cribado media o de alto rendimiento. La velocidad a la que se puede identificar sistemáticamente ADC para utilidad en tratamientos profilácticos o terapéuticos de enfermedades o trastornos está limitada solamente por la velocidad de síntesis o metodología de cribado, que incluye detección/medida/análisis de datos.

Una realización es un método de cribado que comprende (a) trasplantar células de una línea celular de cáncer de células renales estable en un animal no humano, (b) administrar un candidato de fármaco de ADC al animal no humano y (c) determinar la capacidad del candidato para inhibir la formación de tumores a partir de la línea celular trasplantada.

Otra realización es un método de cribado que comprende (a) poner en contacto células de una línea celular estable de enfermedad de Hodgkin con un candidato de fármaco de ADC y (b) evaluar la capacidad del candidato de ADC para bloquear la activación de ligandos de CD40.

Otra realización es un método de cribado que comprende (a) poner en contacto células de una línea celular estable de enfermedad de Hodgkin con un candidato de fármaco de ADC y (b) evaluar la capacidad del candidato de ADC para inducir muerte celular. En una realización, se evalúa la capacidad del candidato de ADC para inducir apoptosis.

Una realización es un método de cribado que comprende (a) trasplantar células de una línea celular de cáncer estable en un animal no humano, (b) administrar un candidato de fármaco de ADC al animal no humano y (c) determinar la capacidad del candidato para inhibir la formación de tumores a partir de la línea celular trasplantada. La invención también se refiere a un método para identificar sistemáticamente candidatos de ADC para el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la sobreexpresión HER2 que comprende (a) poner en contacto células de una línea celular de cáncer de mama estable con un candidato de fármaco y (b) evaluar la capacidad del candidato de para inhibir el crecimiento de la línea celular estable.

Otra realización es un método de cribado que comprende (a) poner en contacto células de una línea celular de cáncer estable con un candidato de fármaco de ADC y (b) evaluar la capacidad del candidato de ADC para bloquear la activación de ligandos de HER2. En una realización, se evalúa la capacidad del candidato de ADC para bloquear la unión de heregulina. En otra realización, se evalúa la capacidad del candidato de ADC para bloquear la fosforilación de tirosina estimulada con ligandos.

Otra realización es un método de cribado que comprende (a) poner en contacto células de una línea celular de cáncer estable con un candidato de fármaco de ADC y (b) evaluar la capacidad del candidato de ADC para inducir muerte celular. En una realización, se evalúa la capacidad del candidato de ADC para inducir apoptosis.

Otra realización es un método de cribado que comprende (a) administrar un candidato de fármaco de ADC a un mamífero no humano transgénico que sobreexpresa en sus células de las glándulas mamarias una proteína HER2 humana nativa o un fragmento de la misma, en el que dicho mamífero transgénico ha integrado de forma estable en su genoma una secuencia de ácidos nucleicos que codifican una proteína HER2 humana nativa o un fragmento de la misma que tiene la actividad biológica de la humana HER2, unida operativamente a secuencias reguladoras de la transcripción que dirige su expresión a la glándula mamaria, y desarrolla un tumor de mama que no responde por responde muy poco a tratamiento con anticuerpos anti-HER2, o a un mamífero no humano portador de un tumor trasplantado a partir de dicho mamífero no humano transgénico; y (b) evaluar el efecto del candidato de ADC en enfermedad o trastorno diana. Sin limitaciones, la enfermedad o trastorno puede ser un cáncer que sobreexpresa HER2, tal como cáncer de mama, ovarios, estómago, endometrio, glándulas salivales, pulmón, riñón, colon, tiroides, pancreático y vejiga. El cáncer es preferentemente cáncer de mama que expresó HER2 en al menos aproximadamente 500.000 copias por célula, más preferentemente al menos aproximadamente 2.000.000 copias por célula. Los candidatos de fármaco de ADC, por ejemplo, se pueden evaluar por su capacidad para inducir muerte celular y/o apoptosis, usando métodos de ensayo bien conocidos en la técnica y que se describen en lo sucesivo en el presente documento.

En una realización, el candidato de ADC se identifica sistemáticamente siendo administrado al animal transgénico en un intervalo de dosis, y evaluando la respuesta fisiológica del animal a los compuestos con el tiempo. La administración puede ser oral, o mediante inyección adecuada, dependiendo de la naturaleza química del compuesto que se está evaluando. En algunos casos, puede ser apropiado administrar el compuesto de manera conjunta con cofactores que potenciarían la eficacia del compuesto. Si se usan líneas celulares obtenidas a partir de los animales transgénicos objetivo para identificar sistemáticamente compuestos útiles en el tratamiento de diversos trastornos, los compuestos de ensayo se añaden al medio de cultivo celular en un momento apropiado, y la respuesta celular al compuesto se evalúa con el tiempo usando los ensayos bioquímicos y/o histológicos apropiados. En algunos casos, puede ser apropiado aplicar el compuesto de interés al medio de cultivo de manera conjunta con cofactores que potenciarían la eficacia del compuesto.

Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan ensayos para identificar ADC que se dirigen específicamente y se unen a una proteína diana, cuya presencia se correlaciona con la función celular anómala, y en la patogénesis de proliferación y/o diferenciación celular que se relaciona de forma causal con el desarrollo de tumores.

Para identificar un ADC que bloquea la activación de ligandos de un receptor ErbB (*por ejemplo*, ErbB2), se puede determinar la capacidad del compuesto para bloquear ligandos ErbB que se unen a células que expresan el receptor ErbB (ErbB2) (*por ejemplo*, en conjugación con otro receptor ErbB con el que el receptor ErbB de interés forma un ErbB heterooligómero). *Por ejemplo*, se pueden incubar células aisladas a partir del animal transgénico que sobreexpresa HER2 y transfectarlas para que expresen otro receptor ErbB (con el que HER2 forma heterooligómero), *es decir* cultivar, con el ADC y a continuación exponer a ligando de ErbB marcado. A continuación, se puede evaluar la capacidad del compuesto para bloquear la unión de ligandos al receptor ErbB en el heterooligómero de ErbB.

Por ejemplo, la inhibición de heregulina (HRG) que se une a líneas celulares de tumores de mama, que sobreexpresa HER2 y que se establece a partir de los mamíferos no humanos transgénicos (*por ejemplo*, ratones) en el presente documento, con el candidato de ADC se puede realizar usando cultivos en monocapa sobre hielo en un formato de placa de 24 pocillos. Se pueden añadir anticuerpos monoclonales Anti-ErbB2 a cada pocillo e incubar durante 30 minutos. A continuación se puede añadir rHRG $\beta_{1177-224}$ marcado con ^{125}I (25.000 cpm), y se puede continuar con la incubación durante 4 a 16 horas. Se pueden preparar las curvas de respuesta a la dosis y se puede calcular un valor de CI_{50} (actividad citotóxica) para el compuesto interés.

Como alternativa, o adicionalmente; se puede evaluar la capacidad de un ADC para bloquear la fosforilación de tirosina estimulada con ligandos de ErbB de un receptor ErbB presente en un heterooligómero de ErbB. *Por ejemplo*, las líneas celulares establecidas a partir de los animales transgénicos en el presente documento se pueden incubar con un ADC de ensayo y a continuación someter a ensayo para la actividad de fosforilación de tirosina dependiente de ligandos ErbB usando un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (que está conjugado opcionalmente con una marca detectable). La activación del receptor de quinasas que se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5766863 también está disponible para determinar la activación del receptor ErbB y el bloqueo de esa actividad con el compuesto.

En una realización, se puede identificar sistemáticamente el ADC que inhibe la estimulación de HRG de la fosforilación de p180 tirosina en células MCF7 básicamente tal como se describe a continuación. *Por ejemplo*, una línea celular establecida a partir del animal transgénico para HER2 se puede sembrar en placas de 24 pocillos y compuestos se puede añadir a cada pocillo e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente; a continuación, se puede añadir rHRG $\beta_{1177-244}$ a cada pocillo hasta una concentración final de 0,2 nM, y se puede continuar con la incubación durante aproximadamente 8 minutos. Los medios se pueden aspirar de cada pocillo, y las relaciones se pueden detener mediante la adición de 100 μl de tampón de muestra de SDS (SDS al 5 %, DTT 25 mM, y Tris-HCl

25 mM, pH 6.8). Cada muestra (25 µl) se puede someter a electroforesis en un gel con un gradiente de un 4-12 % de Novex) y a continuación transferir de forma electroforética a una membrana de difluoruro de polivinilideno. Se pueden desarrollar inmunotransferencias de antifosfotirosina (a 1 µg/ml), y la intensidad de la banda reactiva predominante a la M_r -180.000 se puede cuantificar mediante densitometría de reflectancia. Un método alternativo para evaluar la inhibición de la fosforilación del receptor es el ensayo KIRA (activación del receptor de quinasas) de Sadick et al. (1998) Jour. of Pharm. and Biomed. Anal. Algunos de los anticuerpos monoclonales bien establecidos frente a HER2 que se sabe que inhiben la estimulación de HRG de fosforilación de p180 tirosina se pueden usar como control positivo en este ensayo. Se puede preparar una curva de dosis-respuesta para la inhibición de la estimulación de HRG de fosforilación de p180 tirosina tal como se determina con densitometría de reflectancia y se puede calcular una CI_{50} para el compuesto interés.

Además, se puede evaluar los efectos inhibidores del crecimiento de un ADC de ensayo en líneas celulares obtenidas a partir de un animal transgénico para HER2, por ejemplo, básicamente tal como se describe en Schaefer et al. (1997) Oncogene 15: 1385-1394. De acuerdo con este ensayo, las células se pueden tratar con un compuesto de ensayo a diversas concentraciones durante 4 días y teñir con violeta de cristal o con el tinte redox Azul de Alamar. La incubación con el compuesto puede presentar un efecto inhibidor del crecimiento sobre esta línea celular similar al que se presenta con anticuerpo monoclonal 2C4 en células MDA-MB-175 (Schaefer *et al.*, mencionado anteriormente). En una realización más, HRG exógeno no invertirá significativamente esta inhibición.

Para identificar los compuestos inhibidores de crecimiento que se dirigen específicamente a un antígeno de interés, se pueden identificar sistemáticamente compuestos que inhiben el crecimiento de células cancerosas que sobreexpresan antígenos de interés obtenidos a partir de animales transgénicos, y se puede realizar el ensayo que se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5677171. De acuerdo con este ensayo, células cancerosas que sobreexpresan el antígeno de interés se cultivan en una mezcla 1:1 de F12 y medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10 %, glutamina y penicilina estreptomycin. Las células se siembran a 20.000 células en un disco de cultivo celular de 35 mm (2 ml/35 mm de disco) y el compuesto de ensayo se añade a diversas concentraciones. Después de seis días, se hace recuento del número de células, en comparación con células sin tratar usando un contador celular electrónico COULTER™. Los compuestos que inhiben el crecimiento celular en aproximadamente un 20-100 % o aproximadamente un 50-100 % se pueden seleccionar como compuestos inhibidores del crecimiento.

Para seleccionar compuestos que inducen la muerte celular, la pérdida de la integridad de la membrana tal como se indica, *por ejemplo*, con PI, azul de tripano o absorción de 7AAD se puede evaluar con respecto al control. El ensayo de absorción de PI usa células aisladas a partir del tejido tumoral de interés de un animal transgénico. De acuerdo con este ensayo, las células se cultivan en Medio de Eagle Modificado con Dulbecco (D-MEM):F-12 de Ham (50:50) complementado con FBS inactivado con calor al 10 % (Hyclone) y L-glutamina 2 mM. Por lo tanto, el ensayo se realiza en ausencia de células de complemento y efectoras inmunes. Las células se siembran con una densidad de 3×10^6 por disco en discos de 100 x 20 mm y se permite que se unan durante una noche. A continuación el medio se retira y se reemplaza con medio recién preparado solo o con medio que contiene diversas concentraciones del compuesto. Las células se incubaron durante un periodo de tiempo de 3 días. Después de cada tratamiento, las monocapas se lavan con PBS y se separan mediante tripsinización. Las células se centrifugan a continuación a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C, el sedimento se vuelve a suspender en 3 ml de tampón de unión de Ca^{2+} frío (Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM) y se toman alícuotas en tubos de 12 x 75 mm cerrados con tamiz de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para retirada de grupos de células. Los tubos reciben a continuación PI (10 µg/ml). Las muestras se pueden analizar usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y el software de CellQuest FACSCONVERT™ (Becton Dickinson). Los compuestos que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular tal como se determina mediante absorción de PI se pueden seleccionar como compuestos que inducen la muerte celular.

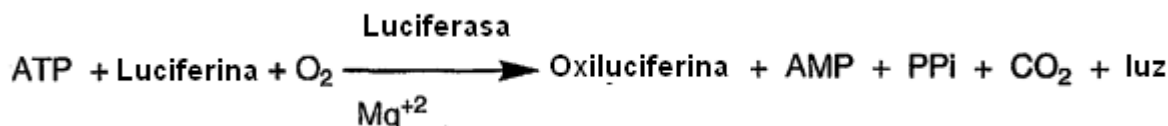
Para seleccionar compuestos que inducen la apoptosis, se realiza un ensayo de unión de anexina que usa células establecidas a partir del tejido tumoral de interés del animal transgénico. Las células se cultivan y se siembran en discos tal como se ha analizado en el párrafo precedente. El medio se retira a continuación y se reemplaza con medio recién preparado solo o medio que contiene 10 µg/ml del conjugado de anticuerpo fármaco (ADC). Después de un periodo de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se separan mediante tripsinización. Las células se centrifugan a continuación, se vuelven a suspender en tampón de unión de Ca^{2+} y se toman alícuotas en tubos tal como se ha analizado anteriormente para el ensayo de muerte celular. Los tubos reciben a continuación anexina (*por ejemplo*, anexina V-FITC) (1 µg/ ml). Las muestras se pueden analizar usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y el software de CellQuest FACSCONVERT™ (Becton Dickinson). Los compuestos que inducen niveles estadísticamente significativos de unión a anexina con respecto al control se seleccionan como compuestos que inducen la apoptosis.

4.5.3 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR *IN VITRO*

Generalmente, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado de anticuerpo fármaco (ADC) se mide mediante: exposición de células mamíferos que tienen proteínas receptoras al anticuerpo del ADC en un medio de cultivo

celular; cultivar las células durante un periodo de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 5 días; y medir la viabilidad celular. Se usaron ensayos *in vitro* basados en células para medir viabilidad (proliferación), citotoxicidad, e inducción de apoptosis (activación de caspasas) del ADC de la invención.

- 5 La potencia *in vitro* de conjugados de anticuerpo y fármaco se midió con un ensayo de proliferación celular (Ejemplo 18, Figuras 7-10). El Ensayo de Viabilidad Celular Luminescente CellTiter-Glo® es un método de ensayo homogéneo disponible en el mercado (Promega Corp., Madison, WI), basado en la expresión recombinante de luciferasa de *Coleópteros* (Patentes de Estados Unidos N° 5583024; N° 5674713 y N° 5700670). Este ensayo de proliferación celular determina el número de células viables en cultivo basándose en la cuantificación del ATP presente, un
- 10 indicador de células metabólicamente activas (Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160: 81-88, Patente de Estados Unidos N° 6602677). El Ensayo CellTiter-Glo® se realizó en formato de 96 pocillos, lo que lo hace susceptible el cribado de alto rendimiento automatizada (HTS) (Cree et al. (1995) AntiCancer Drugs 6: 398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica la adición del reactivo individual (Reactivo CellTiter-Glo®) directamente a las células cultivadas en medio complementado con suero. No son necesarios lavado celular, retirada del medio y
- 15 etapas múltiples de pipeteo. El sistema detecta una cantidad tan pequeña como 15 células/pocillo en un formato de 384 pocillos a los 10 minutos después de la dicción del reactivo y mezcla. Las células se pueden tratar continuamente con ADC, o se pueden tratar y separar de ADC. Generalmente, las células tratadas brevemente, es decir 3 horas, mostraron los mismos efectos de potencia que las células tratadas continuamente.
- 20 El formato homogéneo de "añadir-mezclar-medir" da como resultado lisis celular y generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. La cantidad de ATP es directamente proporcional al número de células presentes en el cultivo. El Ensayo CellTiter-Glo® genera una señal luminiscente "de tipo brillo", producida por la reacción de la luciferasa, que tiene una vida media generalmente mayor que cinco horas, dependiendo del tipo de célula y medio usados. Las células viables se reflejan en unidades de luminiscencia relativa
- 25 (RLU). El sustrato, Luciferina de Escarabajo, se descarboxilasa oxidada activamente mediante luciferasa de luciérnaga recombinante con conversión simultánea de ATP en AMP y generación de fotones. La vida media extendida elimina la necesidad del uso de inyectores de reactivo y proporciona flexibilidad para procesamiento en modo continuo o discontinuo de múltiples placas. Este ensayo de proliferación celular se puede usar con diversos formatos de múltiples pocillos, *por ejemplo*, formato de 96 o 384 pocillos. Los datos se pueden registrar con luminómetro o un
- 30 dispositivo de formación de imágenes con cámara CCD. La producción de luminiscencia se presenta como unidades de luz relativa (RLU), medidas en el tiempo.



- 35 Los efectos antiproliferativos de conjugados de anticuerpo y fármaco se midieron con el ensayo de muerte celular *in vitro*, proliferación celular mencionado anteriormente frente a cuatro líneas celulares diferentes de tumor de mama (Figuras 7-10). Los valores de CI_{50} se establecieron para SK-BR-3 y BT-474 que se sabe que sobreexpresan la proteína receptora HER2. La Tabla 2a muestra las medidas de la potencia (CI_{50}) de conjugados de anticuerpo y fármaco a modo de ejemplo en el ensayo de proliferación celular frente a células SK-BR-3. La Tabla 2b muestra las
- 40 medidas de la potencia (CI_{50}) de conjugados de anticuerpo y fármaco a modo de ejemplo en el ensayo de proliferación celular frente a células BT-474.

Conjugados de anticuerpo y fármaco: Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3.8 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3.9 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-MMAF, 4.1 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 4.1

45 MMAE/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 3.3 MMAE/Ab; y Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3.7 MMAF/Ab no inhibieron la proliferación de células MCF-7 (Figura 9).

Conjugados de anticuerpos y fármaco: Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 4.1 MMAE/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 3.3 MMAE/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3.7 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3.8

50 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3.9 MMAF/Ab; y Trastuzumab-MC-MMAF, 4.1 MMAF/Ab no inhibieron la proliferación de células MDA-MB-468 (Figura 10).

Las células MCF-7 y MDA-MB-468 no sobreexpresan en la proteína receptora HER2. Los conjugados de anticuerpo y fármaco anti-HER2 de la invención muestran por lo tanto selectividad para la inhibición de células que expresan

55 HER2.

Tabla 2a células SK-BR-3

Conjugado de Anticuerpo Fármaco H = trastuzumab unido a través de una cisteína [cys] excepto cuando se indica	Cl ₅₀ (µg de ADC/ml)
H-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab	0,008
H-MC-MMAF, 4.8 MMAF/Ab	0,002
H-MC-vc-PAB-MMAE, (Ejemplo de referencia)	0,007
H-MC-vc-PAB-MMAE (Ejemplo de referencia)	0,015
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3.8 MMAF/Ab	0,0035 - 0,01
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4.4 MMAF/Ab	0,006 - 0,007
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4.8 MMAF/Ab	0,006
H-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3,9 MMAF/Ab	0,0035
H-MC-MMAF, 4.1 MMAF/Ab	0,0035
H-MC-vc-PAB-MMAE, 4.1 MMAE/Ab (Ejemplo de referencia)	0,010
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3.8 MMAF/Ab	0,007
H-MC-vc-PAB-MMAE 4.1 MMAE/Ab (Ejemplo de referencia)	0,015
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3.7 MMAF/Ab.	0,010
H-MC-vc-PAB-MMAE, 7.5 MMAE/Ab (Ejemplo de referencia)	0,0025
H-MC-MMAE, 8.8 MMAE/Ab (Ejemplo de referencia)	0,018
H-MC- MMAE, 4.6 MMAE/Ab (Ejemplo de referencia)	0,05
H-MC-(L)val-(L)cit-PAB-MMAE, 8.7 MMAE/Ab (Ejemplo de referencia)	0,0003
H-MC-(D)val-(D)cit-PAB-MMAE, 8.2 MMAE/Ab (Ejemplo de referencia)	0,02
H-MC-(D)val-(L)cit-PAB-MMAE, 8.4 MMAE/Ab (Ejemplo de referencia)	0,0015
H-MC-(D)val-(L)cit-PAB-MMAE, 3.2 MMAE/Ab (Ejemplo de referencia)	0,003
H-Trastuzumab	0,083
H-vc-MMAE, unido a través de una lisina [lys] (Ejemplo de referencia)	0,002
H-phe-lys-MMAE, unido a través de una lisina [lys] (Ejemplo de referencia)	0,0015
4D5-Fc8-MC-vc-PAB-MMAF, 4.4 MMAF/Ab	0,004
Hg-MC-vc-PAB-MMAF, 4.1 MMAF/Ab	0,01
7C2-MC-vc-PAB-MMAF, 4.0 MMAF/Ab	0,01
4D5 Fab-MC-vc-PAB-MMAF, 1.5 MMAF/Ab	0,02
Anti-TF Fab-MC-vc-PAB-MMAE* (Ejemplo de referencia)	-

Tabla 2b células BT474

Conjugado de Anticuerpo Fármaco H = trastuzumab unido a través de una cisteína [cys]	Cl ₅₀ (µg de ADC/ml)
H-MC-MMAF, 4.1 MMAF/Ab	0,008
H-MC-MMAF, 4.8 MMAF/Ab	0,002
H-MC-vc-PAB-MMAE, 4.1 MMAE/Ab (Ejemplo de referencia)	0,015
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3.8 MMAF/Ab	0,02 - 0,05
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4.4 MMAF/Ab	0,01
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4.8 MMAF/Ab	0,01
H-MC-vc-PAB-MMAE 3.3 MMAE/Ab (Ejemplo de referencia)	0,02

Conjugado de Anticuerpo Fármaco H = trastuzumab unido a través de una cisteína [cys]	Cl ₅₀ (µg de ADC/ml)
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3.7 MMAF/Ab,	0,02
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab	0,015
H-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3.9 MMAF/Ab	0,010
H-MC-MMAF, 4.1 MMAF/Ab	0,00015
H-MC-vc-PAB-MMAE, 7,5 MMAE/Ab (Ejemplo de referencia)	0.0025
H-MC-MMAE, 8.8 MMAE/Ab (Ejemplo de referencia)	0,04
H-MC- MMAE, 4.6 MMAE/Ab (Ejemplo de referencia)	0,07
4D5-Fc8-MC-vc-PAB-MMAF, 4.4 MMAF/Ab	0,008
Hg-MC-vc-PAB-MMAF, 4.1 MMAF/Ab	0,01
7C2-MC-vc-PAB-MMAF, 4.0 MMAF/Ab	0,015
4D5 Fab-MC-vc-PAB-MMAF, 1.5 MMAF/Ab	0,04
Anti-TF Fab-MC-vc-PAB-MMAE* (Ejemplo de referencia)	-
H = trastuzumab 7C2 = anticuerpo de murino anti-HER2 que se unen a un epítipo diferente que el trastuzumab. Fc8 = mutante que no se une a FcRn Hg = 4D5 humanizado de longitud total "sin bisagra", con cisteínas bisagra de cadena pesada mutadas a serinas. Expresado en <i>E. coli</i> (por lo tanto no glicosilado). Anti-TF Fab = fragmento de anticuerpo de factor anti-tejido * actividad frente a células MDA-MB-468	

En un descubrimiento sorprendente e inesperado, los resultados de la actividad de proliferación celular *in vitro* del ADC en las Tablas 2a y 2b muestran por lo general que ADC con un número medio bajo de restos de fármaco por anticuerpo mostró eficacia, *por ejemplo*, Cl₅₀ < 0,1 µg de ADC/ml. Los resultados sugieren que al menos para ADC de trastuzumab, la relación óptima de restos de fármaco por anticuerpo puede ser menor que 8, y puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 5.

4.5.4 ACLARAMIENTO Y ESTABILIDAD DE PLASMA *IN VIVO*

El aclaramiento y la estabilidad de plasma farmacocinético de ADC se investigaron en ratas y monos cynomolgus. La concentración de plasma se midió con el tiempo. La Tabla 2c muestra datos farmacocinéticos de conjugados de anticuerpo y fármaco y otras muestras dosificadas en ratas. Las ratas son un modelo no específico para anticuerpos receptores de ErbB, debido a que, no se sabe que la rata exprese proteínas receptoras de HER2.

Tabla 2c Farmacocinética en Ratas

H = trastuzumab unido a través de una cisteína [cys] excepto cuando se indica 2 mg/kg de dosis excepto cuando se indica					
Dosis de la muestra en mg/kg	AUCinf día* µg/ml	CL ml/día/kg	Cmáx µg/ml	T _{1/2} Term. días	% Conj.
H-MC-vc-PAB-MMAE (Ab Total)	78,6	26,3	39,5	5,80	40,6
H-MC-vc-PAB-MMAE (Conj.) (Ejemplo de referencia)	31,1	64,4	33,2	3,00	
H-MC-vc-PAB-MMAF (Total Ab)	170	12,0	47,9	8,4	50,0
H-MC-vc-PAB-MMAF (Conj.)	83,9	24,0	44,7	4,01	

H = trastuzumab unido a través de una cisteína [cys] excepto cuando se indica 2 mg/kg de dosis excepto cuando se indica					
Dosis de la muestra en mg/kg	AUCinf día* µg/ml	CL ml/día/kg	Cmáx µg/ml	T½ Term. días	% Conj.
H-MC-MMAE (Total Ab)	279	18,9	79,6	7,65	33
H-MC-MMAE (Conj.)	90,6	62,9	62,9	4,46	
5 mg/kg (Ejemplo de referencia)					
H-MC-MMAF (Total Ab)	299	6,74	49,1	11,6	37
H-MC-MMAF (Conj.)	110	18,26	50,2	4,54	
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (Total Ab)	306	6,6	78,7	11,9	19,6
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (Conj.)	59,9	33,4	82,8	2,1	
H-Me-vc-PAB-MMAF (Total Ab)	186	10,8	46,9	8,3	45,3
H-Me-vc-PAB-MMAF (Conj.)	84,0	23,8	49,6	4,3	
H-Me-vc-PAB-MMAE (Total Ab)	135	15,0	44,9	11,2	23,8
H-Me-vc-PAB-MMAE (Conj.) (Ejemplo de referencia)	31,9	63,8	45,2	3,0	
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (Total Ab)	306	6,6	78,7	11,9	19,6
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (Conj.)	59,9	33,4	82,8	2,1	
H-MC-(D)val-(L)cit-PAB-MMAE (Total Ab)	107	19,2	30,6	9,6	38,1
H-MC-(D)val-(L)cit-PAB-MMAE (Conj.) (Ejemplo de referencia)	40	50,4	33,7	3,98	
H-MC-(Me)-vc-PAB-MMAE, Total Ab	135,1	15,0	44,9	11,2	23,8
H-MC-(Me)-vc-PAB-MMAE, Conj. (Ejemplo de referencia)	31,9	63,8	45,2	2,96	
H-MC-(D)val-(D)cit-PAB-MMAE, Total Ab	88,2	22,8	33,8	10,5	38,3
H-MC-(D)val-(D)cit-PAB-MMAE, Conj. (Ejemplo de referencia)	33,6	59,8	36,0	4,43	

H = trastuzumab unido a través de una cisteína [cys] excepto cuando se indica 2 mg/kg de dosis excepto cuando se indica					
Dosis de la muestra en mg/kg	AUCinf día* µg/ml	CL ml/día/kg	Cmáx µg/ml	T½ Term. días	% Conj.
H-MC-vc-PAB-MMAE, Total Ab	78,6	26,3	39,5	5,8	40,6
H-MC-vc-PAB-MMAE, Conj. H unido a MC mediante lisina [lys]	31,1	64,4	33,2	3,00	
(Ejemplo de referencia)					
MMAF 200 µg/kg	0,99	204	280	0,224	-
MMAE 206 µg/kg ejemplo) (Ejemplo de referencia)	3,71	62,6	649	0,743	-
HER F(ab') ₂ -MC-vc- MMAE, Total Ab	9,3	217	34,4	0,35	95
HER F(ab') ₂ -MC-vc- MMAE, Conj. (Ejemplo de referencia)	8,8	227	36,9	0,29	
4D5-H-Fab-MC-vc-MMAF, Total Ab	43,8	46,2	38,5	1,49	68
4D5-H-Fab-MC-vc-MMAF, Conj.,	29,9	68,1	34,1	1,12	
4D5-H-Fab-MC-vc- MMAE,	71,5	70,3	108	1,18	59
Total Ab 4D5-H-Fab-MC-vc- MMAE, Conj. (Ejemplo de referencia)	42,2	118,9	114	0,74	
4D5-H-Fab	93,4	53,9	133	1,08	-
H-MC-vc-PAB-MMAF, Total Ab	170	12,03	47,9	8,44	49,5
H-MC-vc-PAB-MMAF, Conj.	83,9	23,96	44,7	4,01	
H-MC-vc-PAB-MMAF- DMAEA, Total Ab	211	9,8	39,8	8,53	34,3
H-MC-vc-PAB-MMAF- DMAEA, Conj.	71,5	28,2	38,8	3,64	
H-MC-vc-PAB-MMAF- TEG, Total Ab	209	9,75	53,2	8,32	29,7
H-MC-vc-PAB-MMAF- TEG, Conj.	63,4	31,8	34,9	4,36	

El AUC inf es el área bajo la curva de concentración de plasma-tiempo desde el momento de la dosificación hasta el infinito y es una medida de la exposición total a la entidad medida (fármaco, ADC). CL se define como el volumen de plasma aclarado de la entidad medida en unidades de tiempo y se expresa mediante normalización a peso corporal. El término T1/2 es la mitad del fármaco en el organismo medido durante su fase de eliminación. La expresión % Conj. es la cantidad relativa de ADC en comparación con el anticuerpo total detectado, mediante ensayos separados de inmunofluorescencia de ELISA ("Analytical Methods for Biotechnology Products", Ferraiolo et al, páginas 85-98 en Pharmacokinetics of Drugs (1994) P.G. Welling y L.P. Balant, Eds., Handbook of Experimental Pharmacology, Vol.

110, Springer-Verlag. El cálculo del % Conj. es simplemente el AUCinf de ADC $\div$ AUCinf total de Ab, y es un indicador general de la estabilidad del conector, aunque pueden tener efecto otros factores y mecanismos.

La Figura 11 muestra un gráfico de un estudio de aclaramiento de la concentración de plasma después de la administración de los conjugados de anticuerpo fármaco: H-MC-vc-PAB-MMAF-TEG y H-MC-vc-PAB-MMAF a ratas Sprague-Dawley. Las concentraciones de anticuerpo total y ADC se midieron en el tiempo.

La Figura 12 muestra un gráfico de un estudio de aclaramiento de la concentración de plasma en dos etapas en el que ADC se administró a dosificaciones diferentes y las concentraciones del anticuerpo total y ADC se midieron en el tiempo.

EFICACIA IN VIVO

La eficacia *in vivo* del ADC de la invención se midió con un modelo de ratón de explante transgénico de HER2 de alta expresión. Se propagó un aloinjerto desde el ratón transgénico Fo5 mmtv que no responde a, o responde muy poco a, la terapia con HERCEPTIN®. Los sujetos se trataron una vez con ADC y se controlaron durante 3-6 semanas para medir el tiempo de duplicación tumoral, log de muerte celular, y disminución tumoral. Se realizaron experimentos de seguimiento de respuesta a dosis y dosis múltiples.

Los tumores aparecen fácilmente en ratones transgénicos que expresan una forma activada de forma mutacional de neu, el homólogo de rata de HER2, pero el HER2 que se sobreexpresa en cánceres de mama no muta y la formación de tumor es mucho menos robusta en ratones transgénicos que sobreexpresa en HER2 sin mutar (Webster et al. (1994) Semin. Cancer Biol. 5: 69-76).

Para mejorar la formación de tumores con HER2 sin mutar, se produjeron ratones transgénicos usando un plásmido de cADN de HER2 en el que un ATG secuencia arriba se suprimió para prevenir el comienzo de la traducción en dichos codones de ATG secuencia arriba, que de otro modo reducirían la frecuencia del comienzo de la traducción desde el codón de iniciación auténtico secuencia debajo de HER2 (por ejemplo, véase Child et al. (1999) J. Biol. Chem. 274: 24335-24341). Además, se añadió un intrón quimérico en el extremo 5', que también potenciaría el nivel de expresión tal como se ha indicado anteriormente (Neuberger y Williams (1988) Nucleic Acids Res. 16: 6713; Buchman y Berg (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 4395; Brinster et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 836). El intrón quimérico se obtuvo a partir de un vector de Promega, vector de expresión de mamífero pCI-neo (bp 890-1022). En extremo 3' del cADN está flanqueado por los exones 4 y 5 de la hormona de crecimiento humano, y secuencias de poliadenilación. Además, se usaron ratones FVB por qué esta cepa es más susceptible al desarrollo tumoral. Se usó el promotor de MMTV-LTR para asegurar la expresión de HER2 específica de tejidos en la glándula mamaria. Los animales alimentaron con la dieta AIN 76A para aumentar la susceptibilidad a la formación de tumores (Rao et al. (1997) Breast Cancer Res. and Treatment 45: 149-158).

Tabla 2d Medidas de tumor en modelo de aloinjerto de ratón - Tumor de mama MMTV-HER2 Fo5, ratones atímicos desnudos

Una sola dosis el día 1 (T = 0) excepto cuando se indica H = trastuzumab unido a través de una cisteína [cys] excepto cuando se indica						
Fármacos de Muestra por anticuerpo	Dosis	Ti	PR	CR	Tiempo de duplicación tumoral (días)	log medio de muerte celular
Vehículo					2-5	0
H-MC-vc-PAB-MMAE 8.7 MMAE/Ab (Ejemplo Ref.)	1250 µg/m ²	5/5	4/7	0/7	18	1,5
H-MC-vc-PAB-MMAF 3.8 MMAF/Ab	555 µg/m ²	2/5	2/7	5/7	69	6,6
H-MC(Me)-vc-PAB-MMAF					> 50	6,4
H-MC-MMAF 4.8 MMAF/Ab	9.2 mg/kg Ab 550 µg/m ² a 0, 7, 14 y 21 días	7/7	6/7	0/7	63	9
H-MC-MMAF 4.8 MMAF/Ab	14 mg/kg Ab 840 µg/m ² a 0,	5/5	5/7	2/7	> 63	

Una sola dosis el día 1 (T = 0) excepto cuando se indica H = trastuzumab unido a través de una cisteína [cys] excepto cuando se indica						
Fármacos de Muestra por anticuerpo	Dosis	Ti	PR	CR	Tiempo de duplicación tumoral (días)	log medio de muerte celular
	7, 14 y 21 días					
H-MC-vc-PAB-MMAF 5.9 MMAF/Ab	3,5 mg/kg Ab 300 µg/m ² a 0, 21, y 42 días	5/6	1/7	3/7	> 36	
H-MC-vc-PAB-MMAF 5.9 MMAF/Ab	4,9 mg/kg Ab 425 µg/m ² a 0, 21, y 42 días	4/7	2/7	5/7	> 90	
H-MC-vc-PAB-MMAF 5.9 MMAF/Ab	6,4 mg/kg Ab 550 µg/m ² a 0, 21, y 42 días	3/6	1/7	6/7	> 90	
H-(L)val-(L)cit-MMAE 8.7 MMAE/Ab (Ejemplo Ref.)	10 mg/kg	7/7	1/7	0/7	15,2	1,1
H-MC-MMAE 4.6 MMAE/Ab (Ejemplo Ref.)	10 mg/kg	7/7	0/7	0/7	4	0,1
H-(D)val-(D)cit-MMAE 4.2 MMAE/Ab (Ejemplo Ref.)	10 mg/kg	7/7	0/7	0/7	3	
H-(D)val-(L)cit-MMAE 3.2 MMAE/Ab Ejemplo de referencia	13 mg/kg	7/7	0/7	0/7	9	0,6
H-MC(Me)-vc-MMAE 3.0 MMAE/Ab Ejemplo de referencia	13 mg/kg	7/7	3/7	0/7	17	1,2
H-(L)val-(D)cit-MMAE 3.5 MMAE/Ab Ejemplo de referencia	12 mg/kg	7/7	0/7	0/7	5	0,2
H-vc-MMAE 8.7 MMAE/Ab Ejemplo de referencia	10 mg/kg	7/7			17	
H-cys-vc-MMAF 3.8 MMAF/Ab	1 mg/kg	7/7			3	
H-cys-vc-MMAF 3.8 MMAF/Ab	3 mg/kg	7/7			> 17	
H-cys-vc-MMAF 3.8 MMAF/Ab	10 mg/kg	4/7	4/7	3/7	> 17	
H-MC-vc-MMAF-TEG 4 MMAF/Ab	10 mg/kg	3/6	1/7	6/7	81	7,8

Una sola dosis el día 1 (T = 0) excepto cuando se indica H = trastuzumab unido a través de una cisteína [cys] excepto cuando se indica						
Fármacos de Muestra por anticuerpo	Dosis	Ti	PR	CR	Tiempo de duplicación tumoral (días)	log medio de muerte celular
H-MC-vc- MMAF-TEG 4 MMAF/Ab	10 mg/kg q3wk x 3	0/5	0/7	7/7	81	7,9
H-vc-MMAF (lote 1)	10 mg/kg	4/6	2/8	5/8		
H-vc-MMAF (lote 2)	10 mg/kg	7/8	1/8	1/8		
H-MC-MMAF	10 mg/kg 550 µg/m ²	8/8	1/8	0/8	18	
H-(Me)-vc- MMAF	10 mg/kg	3/7	2/8	5/8		
H-vc-MMAE 7.5 MMAE/Ab Ejemplo de referencia	3,7 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	6/6	0/7	1/7	17	2,3
H-vc-MMAE 7.5 MMAE/Ab Ejemplo de referencia	7.5 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	5/7	3/7	3/7	69	10
anti IL8-vc- MMAE 7.5 MMAE/Ab Ejemplo de referencia	7.5 mg/kg a 0,7,14,21, 28 días	7/7	0/7	0/7	5	0,5
anti IL8-vc- MMAE 7.5 MMAE/Ab Ejemplo de referencia	3.7 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	6/6	0/7	0/7	3	0,2
H-fk-MMA 7.5 MMAE/Ab Ejemplo de referencia	7.5 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	7/7	1/7	0/7	31	4,4
H-fk-MMAE 7.5 MMAE/Ab Ejemplo de referencia	3.7 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	7/7	0/7	0/7	8,3	0,9
anti IL8-fk- MMAE 7.5 MMAE/Ab Ejemplo de referencia	7.5 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	7/7	0/7	0/7	6	0,5
anti IL8-fk- MMAE 7.5 MMAE/Ab Ejemplo de referencia	3,7 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	7/7	0/7	0/7	3	0,1
Trastuzumab	7,5 mg/kg a	7/7	0/7	0/7	5	0,4
	0, 7, 14, 21, 28 días					

Una sola dosis el día 1 (T = 0) excepto cuando se indica H = trastuzumab unido a través de una cisteína [cys] excepto cuando se indica						
Fármacos de Muestra por anticuerpo	Dosis	Ti	PR	CR	Tiempo de duplicación tumoral (días)	log medio de muerte celular
H-vc-MMAE 8.7 MMAE/Ab Ejemplo de referencia	10 mg/kg 1250 mg/m ²	6/6	3/6	0/6	15	1,3
H-vc-MMAE Ejemplo Referencia	10 mg/kg 1250 µg/m ² a 0, 7, y 14 días	7/7	5/7		> 19	
H-vc-MMAE Ejemplo Referencia	3 mg/kg a 0, 7, y 14 días	7/7			8	
H-vc-MMAE Ejemplo Referencia	1 mg/kg a 0, 7, y 14 días	7/7			7	
H-vc-MMAF	10 mg/kg	8/8	5/8		> 21	
H-vc-MMAF	10 mg/kg a 0, 7, y 14 días	4/7	4/7	3/7	> 21	
H-vc-MMAF	3 mg/kg a 0, 7, y 14 días	7/7			6	
H-vc-MMAF	1 mg/kg a 0, 7, y 14 días	8/8			4	
Trastuzumab	10 mg/kg a 0 y 7 días	8/8			3	
Hg-MC-vc-PAB- MMAF 4.1 MMAF/Ab	10 mg/kg a 0 días	6/7	3/8	5/8	56	5,1
Fc8-MC-vc- PAB-MMAF 4.4 MMAF/Ab	10 mg/kg a 0 días	7/7	6/8	0/8	25	2,1
7C2-MC-vc- PAB-MMAF 4 MMAF/Ab	10 mg/kg a 0 días	5/6	6/8	1/8	41	3,7
H-MC-vc-PAB- MMAF 5.9 MMAF/Ab	10 mg/kg a 0 días	3/8	3/8	5/8	62	5,7
2H9-MC-vc- PAB-MMAE Ejemplo de referencia		9/9			> 14 días	
2H9-MC-vc- PAB-MMAF		9/9			> 14 días	
11D10-vc-PAB- MMAE Ejemplo de referencia		9/9			> 14 días	
11D10-vc- PAB-MMAF		9/9			11 días	

Una sola dosis el día 1 (T = 0) excepto cuando se indica H = trastuzumab unido a través de una cisteína [cys] excepto cuando se indica						
Fármacos de Muestra por anticuerpo	Dosis	Ti	PR	CR	Tiempo de duplicación tumoral (días)	log medio de muerte celular
7C2 = anticuerpo de murino anti-HER2 que se une a un epítipo diferente a trastuzumab. Fc8 = mutante que no se une a la FcRn Hg = 4D5 humanizado de longitud total "sin bisagra", con cisteínas bisagra de cadena pesada mutadas a serinas. Expresado en <i>E. coli</i> (por lo tanto no glicosilado). 2H9 = Anti-EphB2R 11D10 = Anti-0772P						

El término Ti es el número de animales en el grupo de estudio con tumor a T = 0 ÷ animales totales en el grupo. El término PR es el número de animales que alcanzan la remisión parcial del tumor ÷ animales con tumor a T = 0 en el grupo. El término CR es el número de animales que alcanzan la remisión completa del tumor ÷ animales con tumor a T = 0 en el grupo. El término Log de muerte celular es el tiempo en días para que el volumen del tumor se duplique – el tiempo en días para que el volumen del tumor de control se duplique dividido por 3,32 X tiempo para que el volumen tumoral se duplique en animales de control (dosificados con Vehículo). El cálculo del log de muerte celular tiene en cuenta el retraso del crecimiento del tumor que resulta del tratamiento y el tiempo de duplicación del volumen del tumor en el grupo de control. La actividad antitumoral de ADC se clasifica con valores de log de muerte celular de:

++++	≥ 3,4	(muy activo)
+++	= 2,5-3,4	
++	= 1,7-2,4	
+	= 1,0-1,6	
inactivo	= 0	

La Figura 13 muestra el cambio del volumen tumoral medio con el tiempo en ratones atímicos desnudos con Aloinjertos de tumor de mama MMTV-HER2 Fo5 dosificados el Día 0 con: Vehículo, Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE (1250 µg/m²) y Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF (555 µg/m²). (H = Trastuzumab). El crecimiento de los tumores se retrasó por tratamiento con ADC en comparación con el nivel de crecimiento de control (Vehículo). La Figura 14 muestra el cambio del volumen tumoral medio con el tiempo en ratones atímicos desnudos con Aloinjertos de tumor de mama MMTV-HER2 Fo5 dosificados el Día 0 con 10 mg/kg (660 µg/m²) de Trastuzumab-MC-MMAE y 1250 µg/m² de Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE. La Figura 15 muestra el cambio del volumen tumoral medio con el tiempo en ratones atímicos desnudos con Aloinjertos de tumor de mama MMTV-HER2 Fo5 dosificados con 650 µg/m² de Trastuzumab-MC-MMAF. La Tabla 2d y las Figuras 13-15 muestran que el ADC tiene fuerte actividad antitumoral en el aloinjerto de un tumor positivo para HER2 (Fo5) que originalmente en un ratón transgénico MMTV-HER2. el anticuerpo solo (*por ejemplo*, Trastuzumab) no tiene actividad antitumoral significativa en este modelo (Erickson et al. Patente de Estados Unidos Nº 6632979). Tal como se ilustra en las Figuras 13-15, el crecimiento de los tumores se retrasó con el tratamiento con ADC en comparación con el nivel de crecimiento de control (Vehículo).

En un descubrimiento sorprendente e inesperado, los resultados de la actividad antitumoral *in vivo* del ADC en la Tabla 2d muestran generalmente que ADC con un número medio más bajo de restos de fármacos por anticuerpo mostraron eficacia, *por ejemplo*, tiempo de duplicación del tumor > 15 días y log medio de muerte celular > 1,0. La Figura 16 muestra que para el conjugado de anticuerpo fármaco, trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, el volumen tumoral medio disminuyó y no progresó cuando la relación MMAF:trastuzumab era 2 y 4, mientras que el tumor progresaba con una relación de 5,9 y 6, pero una velocidad menor que con el Vehículo (tampón). La velocidad de la progresión tumoral en este modelo de xenoinjerto de ratón fue aproximadamente la misma, *es decir* 3 días, para Vehículo y trastuzumab. Los resultados sugieren que al menos para el ADC de trastuzumab, la relación óptima de restos de fármacos con anticuerpo puede ser menor que aproximadamente 8, y puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 4.

4.5.5 TOXICIDAD EN ROEDORES

Los conjugados de anticuerpo y fármaco y un control menos ADC, "Vehículo", se evaluaron en un modelo de rata de toxicidad aguda. La toxicidad del ADC se investigó por tratamiento de ratas Sprague-Dawley macho y hembra con el ADC y posterior inspección y análisis de los efectos sobre diversos órganos. Las observaciones macroscópicas incluyeron cambios en los pesos corporales y signos de lesiones y sangrado. Se realizaron parámetros de patología clínica (química y hematología en suero), histopatología, y necropsia en animales dosificados.

Se considera que la pérdida de peso, o el cambio de peso con respecto animales dosificados solamente con Vehículo, en animales después de la dosificación con ADC son un indicador macroscópico y general de toxicidad sistémica o localizada. La Figuras 17-19 muestran los efectos de diversos ADC y control (Vehículo) después de la dosificación en el peso corporal de las ratas.

Se midió la hepatotoxicidad mediante enzimas hepáticas elevadas, mayores números de figuras mitóticas y apoptóticas y necrosis de hepatocitos. Se observó toxicidad hematolinfóide por supresión de leucocitos, principalmente granulocitos (neutrófilos), y/o plaquetas, e implicación orgánica linfóide, *es decir* atrofia o actividad apoptótica. También se observó toxicidad por lesiones en el tracto gastrointestinal tales como números aumentados de figuras mitóticas y apoptóticas y enterocolitis degenerativa.

Las enzimas indicativas de lesión hepática que se estudiaron incluyen:

AST (aspartato aminotransferasa)

- Localización: citoplasmática; hígado, corazón, músculo esquelético, riñón
- Relación Hígado:Plasma de 7000:1
- T1/2: 17 horas

ALT (alanina aminotransferasa)

- Localización: citoplasmática; hígado, riñón, corazón, músculo esquelético
- Relación Hígado:Plasma de 3000:1
- T1/2: 42 horas; variación diurna
- GGT (g-glutamyl transferasa)
- Localización: membrana plasmática de células con alta capacidad secretora o de absorción; hígado, riñón, intestino
- Mal indicador de lesión hepática; normalmente elevada en trastornos de conductos biliares.

Los perfiles de toxicidad de trastuzumab-MC-val-cit-MMAF, trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF, trastuzumab-MC-MMAF and trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF se estudiaron en ratas Sprague-Dawley hembra (Ejemplo 19). El anticuerpo de trastuzumab humanizado no se une de forma apreciable al tejido de rata, y cualquier toxicidad se consideraría no específica. Las variantes a niveles de dosis de 840 y 2105 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de MMAF se compararon con trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF a 2105 $\mu\text{g}/\text{m}^2$.

Los animales en los grupos 1, 2, 3, 4, 6, y 7 (Vehículo, 9,94 y 24,90 mg/kg de trastuzumab-MC-val-cit-MMAF, 10,69 mg/kg de trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF, y 10,17 y 25,50 mg/kg de trastuzumab-MC-MMAF, respectivamente) ganaron peso durante el estudio. Los animales a los grupos 5 y 8 (26,78 mg/kg de trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF y 21,85 mg/kg de trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF, respectivamente) perdieron peso durante el estudio. En el Día del Estudio 5, el cambio en los pesos corporales de animales en los grupos 2, 6 y 7 no fueron significativamente diferentes de los animales del grupo 1. The cambio de pesos corporales de los animales en los grupos 3, 4, 5 y 8 fueron de los de los animales del grupo 1 (Ejemplo 19).

Las ratas tratadas con trastuzumab-MC-MMAF (grupos 6 que 7) eran indistinguible es de los animales de control tratados con vehículo a ambos niveles de dosis; *es decir* este conjugado mostró un perfil de seguridad superior en este modelo. Las ratas tratadas con trastuzumab-MC-val-cit-MMAF (sin del resto de PAB autoinmunitivo; grupos 2 ir 3) mostraron cambios dependientes de la dosis habituales para conjugados de MMAF; del alcance de los cambios fue menor en comparación con un conjugado de MC-val-cit-PAB-MMAF de longitud total (grupo 8). Los recuentos de plaquetas el Día 5 fueron de aproximadamente un 30 % de los valores de la medida inicial en animales del grupo 3 (trastuzumab-MC-val-cit-MMAF a dosis elevada) en comparación con un 15 % en animales del grupo 8 (trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF a dosis elevada). El aumento de enzimas hepáticas AST que ALT, de bilirrubina del alcance de trombocitopenia temas evidentes en animales tratados con trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF (grupos 4 Inc. 5) de una manera dependiente de la dosis; animales del grupo 5 (grupo de dosis elevadas) mostraron el día 5 niveles de ALT de aproximadamente 10x el valor de la medida inicial y las plaquetas se redujeron en aproximadamente un 90 % en el momento de la necropsia.

Ratas Sprague Dawley Hembra también se dosificaron con niveles elevados (Ejemplo 19, estudio de Dosis Elevada: Grupos 2, 3, 4) con trastuzumab-MC-MMAF, y control de Vehículo (Grupo 1). Se observaron ligeras señales de toxicidad, incluyendo elevación de enzimas hepáticas dependientes de la dosis ALT, AST y GGT. El Día 5, animales en el grupo de dosis más elevadas mostraron un aumento de 2 veces de ALT y un aumento de 5 veces de AST; GGT también está elevada (6 U/l). los niveles enzimáticos muestran una tendencia hacia la normalización el Día 12. hubo una granulocitosis moderada en todos los tres grupos de dosis el Día 5, el recuento de plaquetas permanece básicamente sin cambios en todos los animales. Los cambios morfológicos fueron los suaves; animales tratados con un nivel de dosis de 4210 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (Grupo 2) mostró histología sin complicaciones de hígado, bazo, timo, intestinos y médula ósea. Se observó un leve aumento de la actividad apoptótica y mitótica en timo e hígado, respectivamente

en animales tratados con el nivel de dosis de 5500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (Grupo 3). La medular ósea era normocelular, pero mostró evidencias de hiperplasia granulocítica, que es coherente con la granulocitosis absoluta observada en los recuentos de sangre periférica en estos animales. Los animales con la dosis más elevada en el grupo 4 mostraron cualitativamente las mismas características; la actividad mitótica en el hígado parece en cierto modo mayor en comparación con animales en el Grupo 3. Además, se observó hematopoyesis extramedular en bazo e hígado.

EphB2R es un receptor de tirosina quinasa TM de tipo 1 con una homología próxima entre ratón y ser humano, y se sobreexpresa en células de cáncer colorrectal. 2H9 es un anticuerpo frente a EphB2R. El anticuerpo desnudo no tienen efecto en el crecimiento tumoral, pero 2H9-val-cit-MMAE eliminó células que expresan EphB2R demostró eficacia en un modelo de xenoinjerto de ratón que usa tumores de colon humano CXF1103 (Mao et al. (2004) Cancer Res. 64: 781-788). Tanto 2H9 como 7C2 son anticuerpos anti-HER2 de IgG1 de ratón. Se compararon los perfiles de toxicidad de 2H9-MC-val-cit-PAB-MMAF (3.7 MMAF/Ab), 7C2-MC-val-cit-PAB-MMAF (4 MMAF/Ab), que trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF (5.9 MMAF/Ab). Las diferencias en la estructura de cada inmunconjugado o porción de fármaco del inmunconjugado pueden afectar a la farmacocinética y por último al perfil de seguridad. El anticuerpo de trastuzumab humanizado no se une de forma apreciable al tejido de rata, y cualquier toxicidad se consideraría no específica.

TOXICIDAD/SEGURIDAD EN MONO CYNOMOLGUS

Del mismo modo que el estudio de toxicidad la seguridad en ratas, monos cynomolgus se trataron con ADC seguido de medidas de enzimas hepáticas, e inspección y análisis de los efectos sobre diversos órganos. Las observaciones macroscópicas incluyeron cambios en los pesos corporales y signos de lesiones y sangrado. Se realizaron parámetros de patología clínica (química y hematología en suero), histopatología, y necropsia en animales dosificados (Ejemplo 19).

El conjugado de anticuerpo y fármaco, H-MC-vc-PAB-MMAE (H = trastuzumab unido a través de cisteína) no mostró evidencia de toxicidad hepática a ninguno de los niveles de dosis sometidos a ensayo. Los granulocitos de sangre periférica mostraron reducción después de una sola dosis de 1100 mg/m^2 con recuperación completa 14 días después de la dosis. El conjugado de anticuerpo y fármaco H-MC-vc-PAB-MMAF mostró aumento de enzimas hepáticas a 550 (transitorio) y 880 mg/m^2 de nivel de dosis, ninguna evidencia de granulocitopenia, y una disminución de plaquetas dependiente de la dosis, transitoria (grupos 2 y 3).

4.6 SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS DE LA INVENCION

Los Compuestos a modo de Ejemplo y los Conjugados a modo de Ejemplo se pueden preparar usando los procedimientos sintéticos que se describen a continuación en los Esquemas 5-16. Tal como se describe con más detalle a continuación, los Compuestos a modo de Ejemplo o los Conjugados a modo de Ejemplo se pueden preparar convenientemente usando un Conector que tiene un sitio reactivo para la unión al Fármaco y Ligando. En un aspecto, un Conector tiene un sitio reactivo que tiene un grupo electrófilo que es reactivo a un grupo nucleófilo presente en un Ligando, tal como, pero no limitado a un anticuerpo. Grupos nucleófilos útiles en un anticuerpo incluyen pero no se limitan a, grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleófilo de un anticuerpo es reactivo a un grupo electrófilo de un Conector y forma un enlace covalentes con una unidad de Conector. Grupos electrófilos útiles incluyen, pero no se limitan a, grupos maleimida y haloacetamida. El grupo electrófilo proporciona un sitio conveniente para unión a anticuerpos.

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

Además, grupos funcionales de ácido carboxílico y grupos funcionales de cloroformiato son sitios reactivos útiles para un Conector porque pueden reaccionar con grupos amino secundario de un Fármaco para formar una unión amida. además es útil como un sitio reactivo un grupo funcional carbonato en un Conector, tal como pero no limitado a p-nitrofenil carbonato, que puede reaccionar con un grupo amino de un Fármaco, tal como pero no limitado a N-metil valina, para formar una unión carbamato. Por lo general, los Fármacos basados en péptidos se preparan mediante la formación de un enlace peptídico entre dos o más fragmentos de aminoácido y/o péptido. Dichos enlaces peptídico 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, páginas 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos.

La síntesis de un Bastidor ilustrativo que tiene un grupo electrófilo de maleimida se ilustra continuación en los Esquemas 8-9. En el Esquema 10 se describen métodos sintéticos generales útiles para la síntesis de un Conector. El Esquema 11 muestra la construcción de una unidad de Conector que tiene un grupo val-cit, un grupo electrófilo de

maleimida y un grupo Espaciador autoinmolativo PAB. El Esquema 12 representa la síntesis de un Conector que tiene un grupo phe-lys, un grupo electrófilo de maleimida, con y sin el grupo Espaciador autoinmolativo PAB. El Esquema 13 presenta una descripción general para la síntesis de un Compuesto de Fármaco-Conector, mientras que el Esquema 14 presenta una ruta alternativa para preparar un Compuesto de Fármaco-Conector. El Esquema 15 representa la síntesis de un conector ramificado que contiene un grupo BHMS. El Esquema 16 describe la unión de un anticuerpo a un Compuesto de Fármaco-Conector para formar un Conjugado de Fármaco-Conector-Anticuerpo, y el Esquema 14 ilustra la síntesis de Conjugados de Fármaco-Conector-Anticuerpo que tienen, por ejemplo pero no se limitan a, 2 o 4 fármacos por Anticuerpo.

Tal como se describe con más detalle a continuación, los Conjugados a modo de Ejemplo se preparan convenientemente usando un Conector que tiene dos o más Sitios Reactivos para la unión al y a un Ligando. En un aspecto, un Conector tiene un sitio Reactivo que tiene un grupo electrófilo que es reactivo a un grupo nucleófilo presente en un Ligando, tal como un anticuerpo. Grupos nucleófilos útiles en un anticuerpo incluyen pero no se limitan a, grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleófilo de un anticuerpo es reactivo a un grupo electrófilo en un Conector y forma un enlace covalente con una unidad de Conector. Grupos electrófilos útiles incluyen, pero no se limitan a, grupos maleimida y haloacetamida. El grupo electrófilo proporciona un sitio conveniente para unión a anticuerpos.

En otra realización, un Conector tiene un sitio Reactivo que tiene un grupo nucleófilo que es reactivo a un grupo electrófilo presente en un Ligando, tal como un anticuerpo. Grupos electrófilos útiles en un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, grupos aldehído y cetona carbonilo. El heteroátomo de un grupo nucleófilo de un Conector puede reaccionar con un grupo electrófilo en un anticuerpo y formaron el tráfico Valente con una unidad de anticuerpo. Grupos nucleófilos útiles en un Conector incluyen, pero no se limitan a, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato, y arilhidrazida. El grupo electrófilo en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para unión a un Conector.

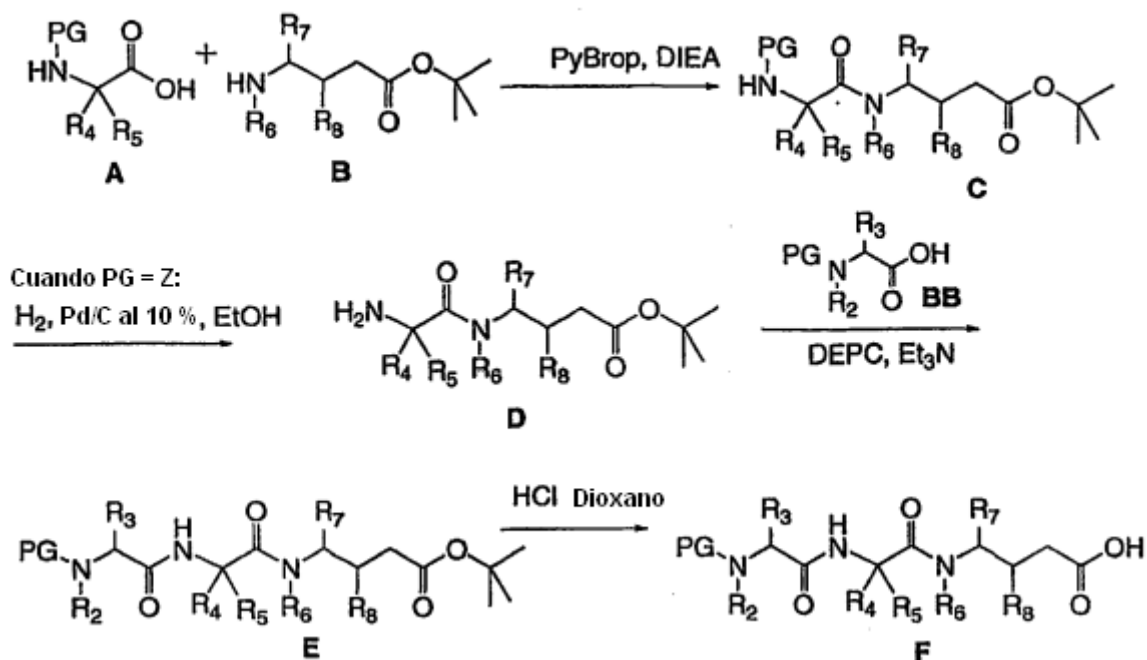
4.6.1 SÍNTESIS DE RESTOS DE FÁRMACO

Por lo general, los Fármacos basados en péptido se pueden preparar formando un enlace peptídico entre dos o más fragmentos de aminoácido y/o péptido. 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, páginas 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos.

Los restos de fármacos de auristatina/dolastatina se pueden preparar de acuerdo con los métodos generales de: Patente de Estados Unidos Nº 5635483; Patente de Estados Unidos Nº 5780588; Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465; Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13: 243-277; y Pettit et al. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863.

En una realización, un Fármaco se prepara por combinación de aproximadamente un equivalente estequiométrico de un dipéptido y un tripéptido, preferentemente en una reacción en una etapa en condiciones de condensación adecuadas. Este enfoque se ilustra en los Esquemas 5-7, que siguen a continuación.

El Esquema 5 ilustra la síntesis de una unidad F de tripéptido N-terminal que es un compuesto intermedio útil para la síntesis de los compuestos de fármaco de Fórmula Ib.

Esquema 5

Tal como se ilustra en el Esquema 5, un aminoácido protegido A (en el que PG representa un grupo de protección de amina, R^4 se selecciona entre hidrógeno, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -arilo, alquil-arilo, alquil-(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 , alquil-(heterociclo C_3-C_8) en el que R^5 se selecciona entre H y metilo; o R^4 y R^5 se unen, tiene la fórmula $-(CR^aR^b)_n-$ en la que R^a y R^b se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C_1-C_8 y carbociclo C_3-C_8 y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6, y forman un anillo con el átomo de carbono al que están unidos), se acopla con el éster *t*-butílico B (en el que R^6 se selecciona entre -H y -alquilo C_1-C_8 ; y R^7 se selecciona entre hidrógeno, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -arilo, alquil-arilo, alquil-(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 y alquil-(heterociclo C_3-C_8)) en condiciones adecuadas de acoplamiento, por ejemplo, en presencia de PyBrop y diisopropiletilamina, o usando DCC (véase, por ejemplo, Miyazaki, K. et. al. Chem. Pharm. Bull. 1995, 43 (10), 1706-1718).

Grupos protectores PG adecuados, y métodos sintéticos adecuados para proteger un grupo amino con un grupo protector son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Greene, T.W. y Wuts, P.G.M., Protective Groups in Organic Synthesis, 2ª Edición, 1991, John Wiley & Sons. Los aminoácidos A protegidos a modo de ejemplo son PG-Ile y, particularmente, PG-Val, mientras que otros aminoácidos protegidos adecuados incluyen, sin limitación: PG-ciclohexilglicina, PG-ciclohexilalanina, ácido PG-aminociclopropano-1-carboxílico, ácido PG-aminoisobutírico, PG-fenilalanina, PG-fenilglicina, y PG-*tert*-butilglicina. Z es un grupo protector a modo de ejemplo. Fmoc es otro grupo protector a modo de ejemplo. Un a modo de ejemplo éster *t*-butílico B es éster *t*-butílico de dolaisoleucina.

El dipéptido C se puede purificar, por ejemplo, usando cromatografía, y posteriormente desproteger, por ejemplo, usando H_2 y Pd al 10 %-C en etanol cuando PG es benciloxicarbonilo, o usando dietilamina para la retirada de un grupo protector Fmoc. La amina D resultante forma rápidamente un enlace peptídico con un aminoácido BB (en el que R^1 se selecciona entre -H, -alquilo C_1-C_8 y -carbociclo C_3-C_8 ; y R^2 se selecciona entre -H y -alquilo C_1-C_8 ; o R^1 y R^2 se unen, tiene la fórmula $-(CR^aR^b)_n-$ en la que R^a y R^b se seleccionan independientemente entre -H, -alquilo C_1-C_8 y -carbociclo C_3-C_8 y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6, y forman un anillo con el átomo de nitrógeno al que están unidos; y R^3 se selecciona entre hidrógeno, -alquilo C_1-C_8 , -carbociclo C_3-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -arilo, alquil-arilo, alquil-(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 y alquil-(heterociclo C_3-C_8)). *N,N*-Dialquil aminoácidos son aminoácidos a modo de ejemplo para BB, tal como las *N,N*-dimetil valina disponible en el mercado. Se pueden preparar otros *N,N*-dialquil aminoácidos por bis -alquilación reductora usando procedimientos conocidos (véase, por ejemplo, Bowman, R.E, Stroud, H.H J. Chem. Soc., 1950, 1342-1340). Fmoc-Me-L-Val y Fmoc-Me-L-glicina son dos aminoácidos BB a modo de ejemplo útiles para la síntesis de derivados de *N*-monoalquilo. La amina D y el aminoácido BB reaccionan para proporcionar el tripéptido E usando reactivo de acoplamiento DEPC con trietilamina como la base. El grupo protector de E con el extremo C se desprotege posteriormente usando HCl para proporcionar el compuesto tripeptídico de fórmula F.

La metodología de acoplamiento a DEPC ilustrativa y la metodología de acoplamiento a PyBrop mostrada en el Esquema 5 se resumen a continuación en el Procedimiento General A y en el Procedimiento General B, respectivamente. La metodología ilustrativa para la desprotección de una amina protegida con Z a través de

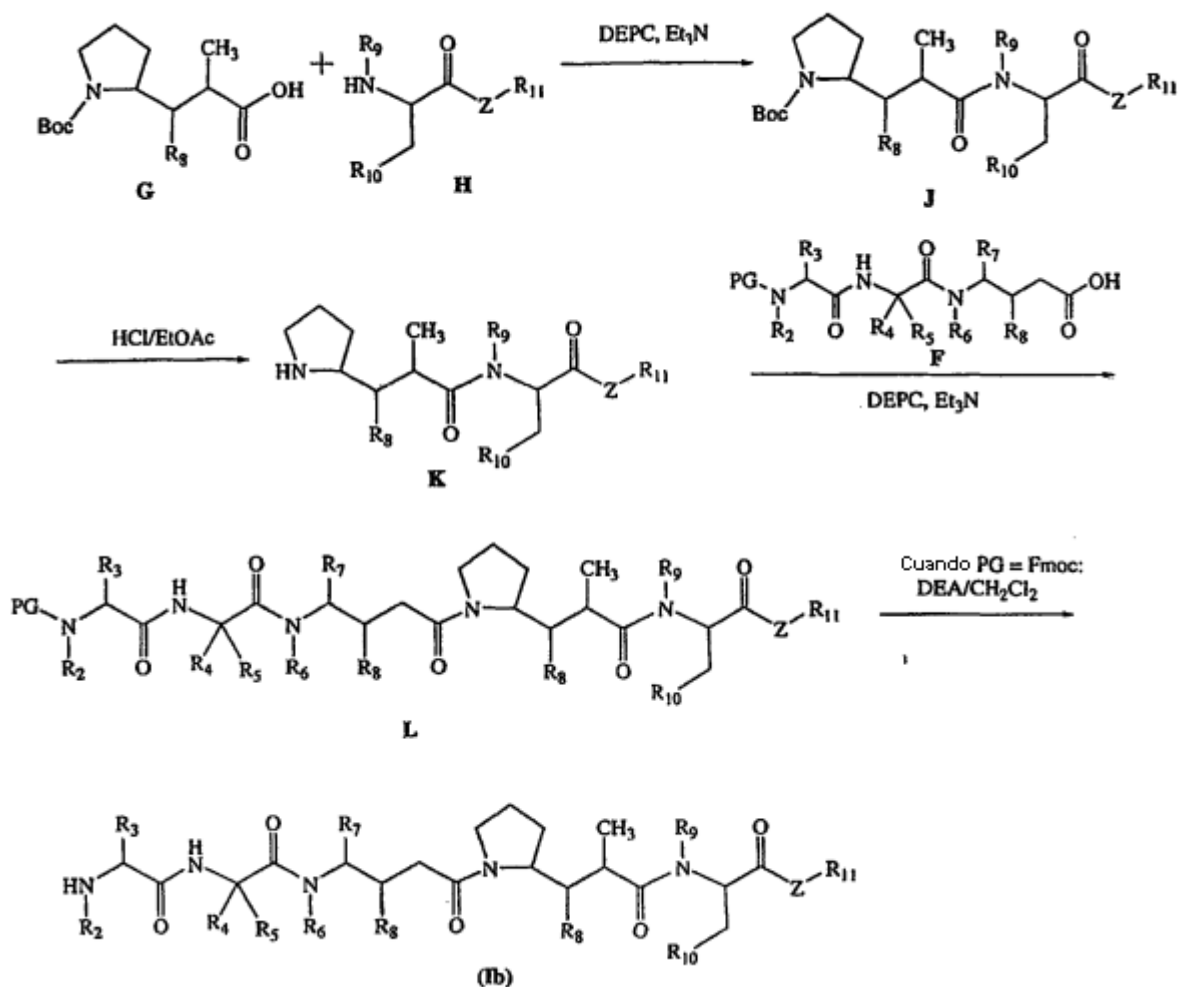
hidrogenación catalítica se resume a continuación en el Procedimiento General C.

Procedimiento General A: Síntesis de péptidos usando DEPC. El aminoácido o péptido *N*-protegido o *N,N*-disustituido **D** (1,0 equiv.) y una amina **BB** (1,1 equiv.) se diluyen con un disolvente orgánico aprótico, tal como diclorometano (de 0,1 a 0,5 M). Una base orgánica tal como trietilamina o diisopropiletilamina (1,5 equiv.) se añade a continuación, seguido de DEPC (1,1 equiv.). La solución resultante se agita, preferentemente en atmósfera de argón, durante hasta 12 horas a la vez que se va controlando por HPLC o TLC. El disolvente se retira al vacío a temperatura ambiente, y el producto en bruto se purifica usando, por ejemplo, HPLC o cromatografía en columna ultrarrápida (columna en gel de sílice). Las fracciones relevantes se combinan y se concentran al vacío para proporcionar el tripéptido **E** que se seca al vacío durante una noche.

Procedimiento general B: Síntesis de péptidos usando PyBrop. El aminoácido **B** (1,0 equiv.), opcionalmente que tiene un grupo protector carboxilo, se diluye con un disolvente orgánico aprótico tal como diclorometano o DME para proporcionar una solución de una concentración entre 0,5 y 1,0 mM, a continuación se añade diisopropiletilamina (1,5 equiv.). El aminoácido Fmoc-, o *Z*-protegido **A** (1,1 equiv.) se añade en forma de un sólido en una porción, a continuación se añade PyBrop (1,2 equiv.) a la mezcla resultante. La reacción se controla por TLC o HPLC, seguido de un procedimiento de tratamiento similar al que se ha descrito en el Procedimiento General A.

Procedimiento general C: Retirada de *Z* a través de hidrogenación catalítica. El aminoácido o péptido **C** *Z*-protegido se diluye con etanol para proporcionar una solución de una concentración entre 0,5 y 1,0 mM en un recipiente adecuado, tal como un matraz de fondo redondo de paredes gruesas. Se añade paladio al 10 % sobre carbono (5-10 % en p/p) y la mezcla de reacción se coloca en una atmósfera de hidrógeno. La evolución de la reacción se controla usando HPLC y generalmente está completa en 1-2 h. La mezcla de reacción se filtra a través de un lecho de celite lavado previamente y el celite se lava de nuevo con un disolvente orgánico polar, tal como metanol después de filtración. La solución de eluyente se concentra al vacío para proporcionar un resto que se diluye con un disolvente orgánico, preferentemente tolueno. El disolvente orgánico se retira a continuación al vacío para proporcionar la amina **C** desprotegida.

El Esquema 6 muestra un método útil para preparar un dipéptido C-terminal de fórmula **K** y un método para acoplamiento del dipéptido de fórmula **K** con el tripéptido de fórmula **F** para preparar compuestos de fármaco de Fórmula **1b**.

Esquema 6

El dipéptido **K** se puede preparar fácilmente por condensación del aminoácido modificado Boc-Dolaproína **G** (véase, por ejemplo, Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725), con una amina de fórmula **H** usando agentes de condensación bien conocidos en la química de péptidos, tales como, por ejemplo, DEPC en presencia de trietilamina, tal como se muestra en el Esquema 5.

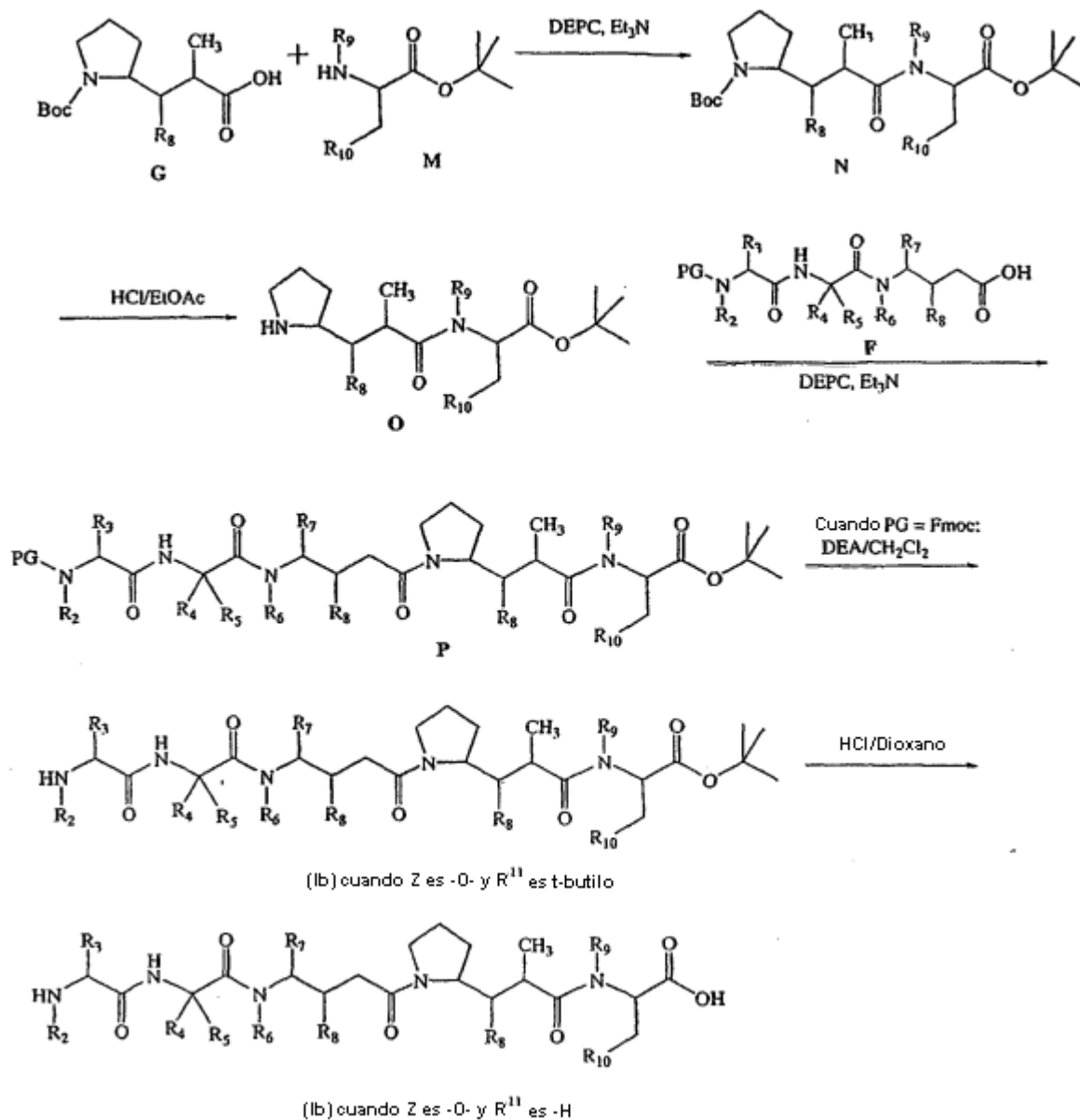
El dipéptido de fórmula **K** se puede acoplar a continuación con un tripéptido de fórmula **F** usando el Procedimiento General D para preparar los compuestos de fármaco protegidos con Fmoc de fórmula **L** que se pueden desproteger posteriormente usando el Procedimiento General E para proporcionar los compuestos de fármaco de fórmula **(Ib)**.

Procedimiento general D: Síntesis de Fármacos. Una mezcla de dipéptido **K** (1,0 equiv.) y tripéptido **F** (1 equiv.) se diluye con un disolvente orgánico aprótico, tal como diclorometano, para formar una solución 0,1 M, a continuación se añade un ácido fuerte, tal como ácido trifluoroacético (1/2 en v/v) se añade y la mezcla resultante se agita en una atmósfera de nitrógeno durante dos horas a 0 °C. La reacción se puede controlar usando TLC o, preferentemente, HPLC. El disolvente se retira al vacío y el resto resultante se seca de forma azeotrópica dos veces, preferentemente usando tolueno. El resto resultante se seca a alto vacío durante 12 h y después se diluye con un disolvente orgánico aprótico, tal como diclorometano. A continuación se añade una base orgánica tal como trietilamina o diisopropiletilamina (1,5 equiv.), seguido de PyBrop (1,2 equiv.) o DEPC (1,2 equiv.) dependiendo de la funcionalidad química en el resto. La mezcla de reacción se controla por TLC o HPLC y después de la finalización, la reacción se somete a un procedimiento de tratamiento similar o idéntico al que se ha descrito en el Procedimiento General A.

Procedimiento general E: Retirada de Fmoc usando dietilamina. Un Fármaco **L** protegido con Fmoc se diluye con un disolvente orgánico aprótico tal como diclorometano y a la solución resultante se le añade dietilamina (1/2 en v/v). La evolución de la reacción se controla por TLC o HPLC y por lo general se completa en 2 h. La mezcla de reacción se concentra al vacío y el resto resultante se seca de forma azeotrópica, preferentemente usando tolueno, después se seca a alto vacío para proporcionar el Fármaco **Ib** que tiene un grupo amino desprotegido.

El Esquema 7 nuestro método útil para preparar derivados de MMAF.

Esquema 7



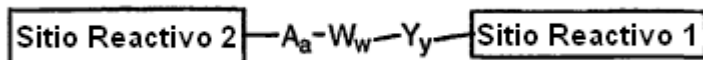
El dipéptido **O** se puede preparar fácilmente por condensación del aminoácido modificado Boc-Dolaproína **G** (véase, por ejemplo, Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725), con un aminoácido protegido de fórmula **M** usando agentes de condensación bien conocidos en la química de péptidos, tales como, por ejemplo, DEPC en presencia de trietilamina, tal como se muestra en los Esquemas 5 y 6.

El dipéptido de fórmula **O** se puede acoplar a continuación con un tripéptido de fórmula **F** usando el Procedimiento General D para preparar los compuestos de MMAF protegidos con Fmoc de fórmula **P** que se pueden desproteger posteriormente usando el Procedimiento General E para proporcionar los compuestos de fármaco de MMAF.

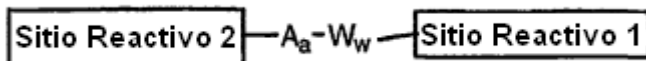
Por lo tanto, los métodos anteriores son útiles para preparar Fármacos que se pueden usar en la presente invención.

4.6.2 SÍNTESIS DE CONECTOR DE FÁRMACO

Para preparar un Compuesto de Fármaco-Conector de la presente invención, el Fármaco se hace reaccionar con un sitio reactivo en el Conector. En general, el Conector puede tener la estructura:

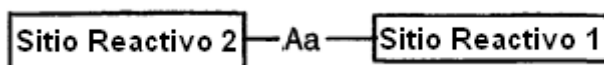


cuando están presentes tanto una unidad Espaciadora (-Y-) como una unidad Bastidor (-A-). Como alternativa, el Conector puede tener la estructura:



cuando están ausentes tanto la unidad Bastidor (-A-) como la unidad Espaciadora (-Y-).

El Conector también puede tener la estructura:

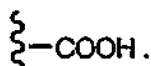


cuando están ausentes tanto la unidad de Aminoácido (W) como la Unidad Espaciadora (Y).

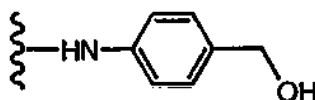
En general, un Conector adecuado tiene una unidad de Aminoácido unida a una Unidad Bastidor opcional y a una Unidad Espaciadora opcional. El Sitio Reactivo 1 está presente en el extremo de la unidad Espaciadora y el sitio Reactivo 2 está presente en el extremo del Bastidor. Si no está presente una unidad Espaciadora, entonces el sitio Reactivo 1 está presente en el extremo C de la unidad de Aminoácido.

En una realización a modo de ejemplo de la invención, el Sitio Reactivo N° 1 es reactivo a un átomo de nitrógeno del Fármaco, y el Sitio Reactivo N° 2 es reactivo a un grupo sulfhidrilo en el Ligando. Los Sitios Reactivos 1 y 2 pueden ser reactivos a diferentes grupos funcionales.

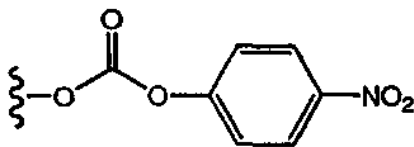
En un aspecto de la invención, el Sitio Reactivo N° 1 es



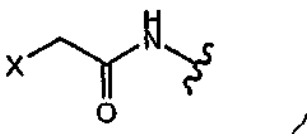
En otro aspecto de la invención, el Sitio Reactivo N° 1 es



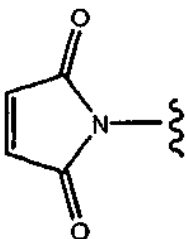
Además, en otro aspecto de la invención, el Sitio Reactivo N° 1 es un p-nitrofenil carbonato de que tiene la fórmula



En un aspecto de la invención, el Sitio Reactivo N° 2 es un grupo aceptor de tiol. Grupos aceptores de tiol adecuados incluyen grupos haloacetamida que tienen la fórmula

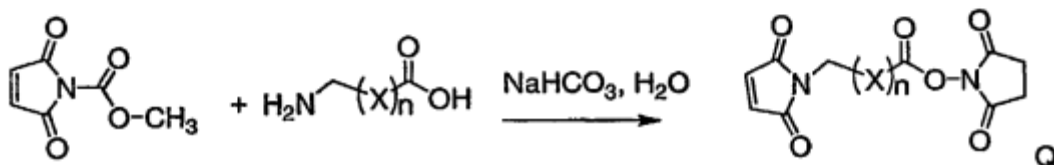
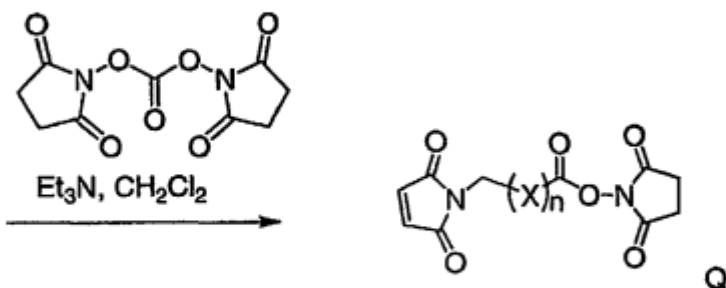
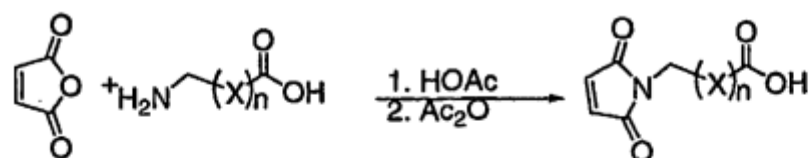


en la que X representa un grupo saliente, preferentemente O-mesilo, O-tosilo, -Cl, -Br, o -I; o un grupo maleimida que tiene la fórmula



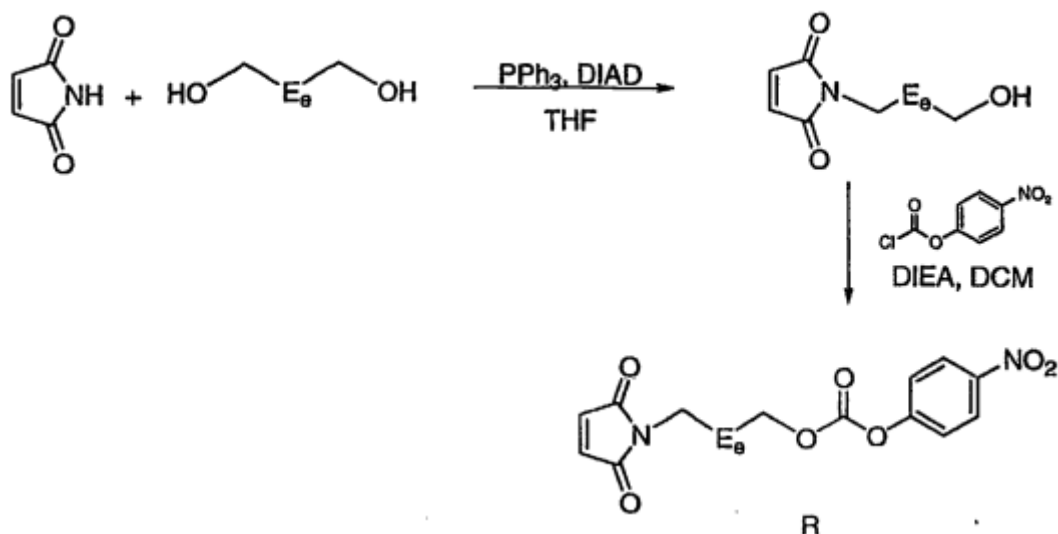
- 5 Los Conectores útiles se pueden obtener a través de agentes comerciales, tales como Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), o preparar tal como se resume en los Esquemas 8-10 que siguen a continuación.

Esquema 8



- 10 en el que X es -CH₂- o -CH₂OCH₂-; y n es un número entero que varía de 0-10 cuando X es -CH₂- ; o 1-10 cuando X es -CH₂OCH₂-.

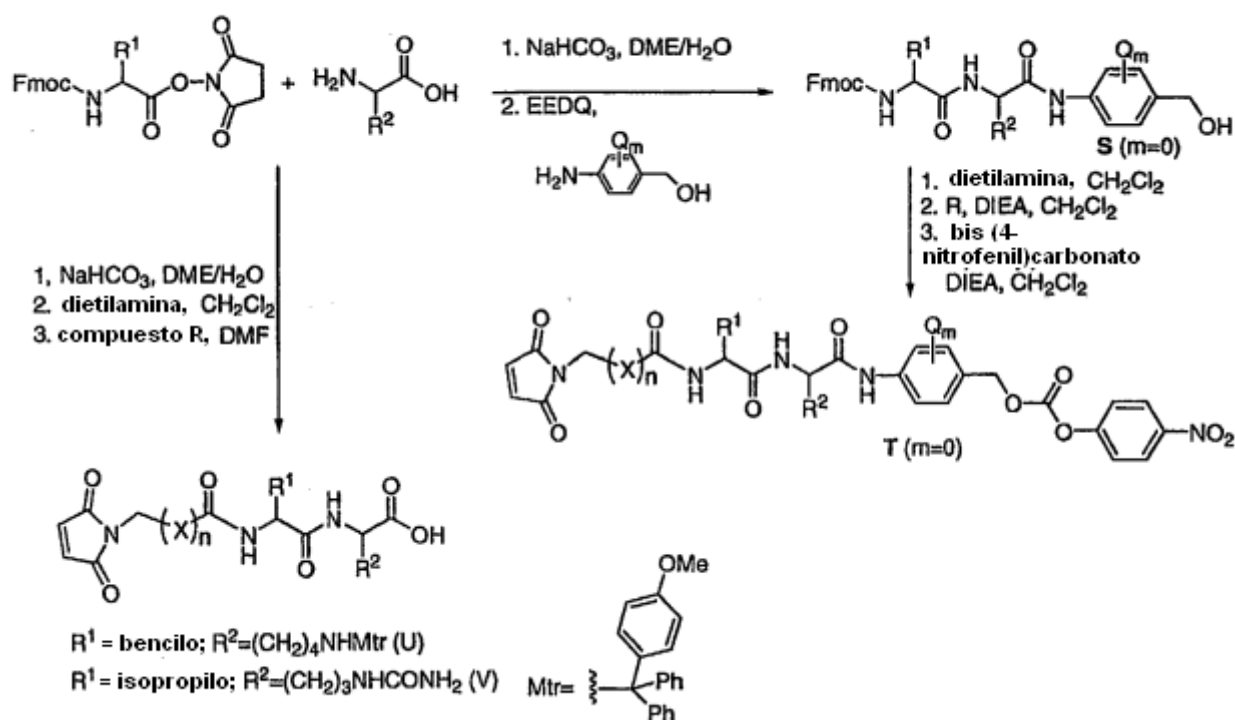
- 15 El método que se muestra en el Esquema 9 combina maleimida con un glicol en condiciones de Mitsunobu para preparar un Bastidor de polietilenglicol maleimida (véase por ejemplo, Walker, M.A. J. Org. Chem. 1995, 60, 5352-5), seguido de instalación de un grupo de Sitio Reactivo de p-nitrofenil carbonato.

Esquema 9

en el que E es $-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$; y e es un número entero que varía de 0-8.

- 5 Como alternativa, los bastidores de PEG-maleimida y PEG-haloacetamida se pueden preparar tal como se describe en Frisch, et al., Bioconjugate Chem. 1996, 7, 180-186.

El Esquema 10 ilustra una síntesis general de una unidad de Conector ilustrativa que contiene un grupo Bastidor de maleimida y opcionalmente una unidad Espaciadora autoinmolativa de éter p-aminobencílico.

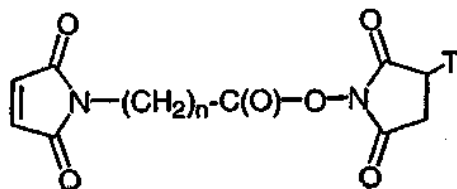
Esquema 10

en el que Q es -alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$, -O-(alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0-4; y n es un número entero que varía de 0-10.

- 15 Los Bastidores útiles se pueden incorporar en un Conector usando los compuestos intermedios disponibles en el mercado en Molecular Biosciences (Boulder, CO) que se describen a continuación mediante el uso de técnicas

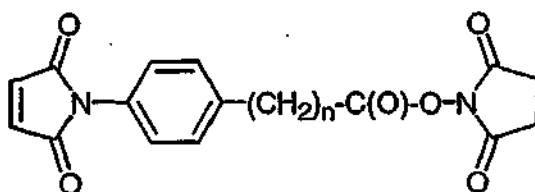
conocidas de síntesis orgánica.

Los Bastidores de fórmula (IIIa) se pueden introducir en un Conector haciendo reaccionar los siguientes compuestos intermedios con el extremo N de una unidad de Aminoácido tal como se representa en los Esquemas 11 y 12:



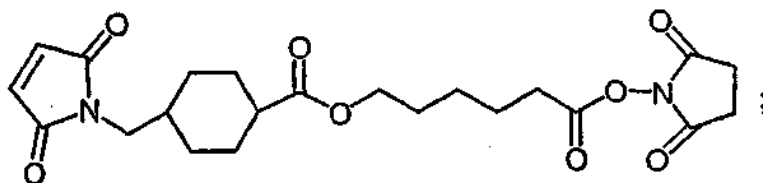
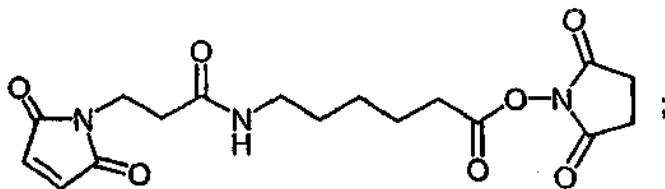
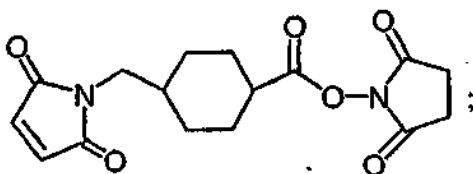
5

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

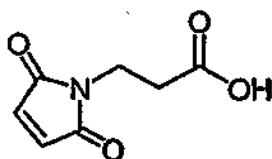


10

en el que n es un número entero que varía de 0-3;

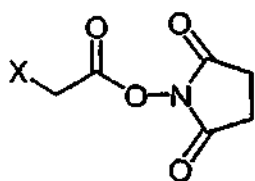
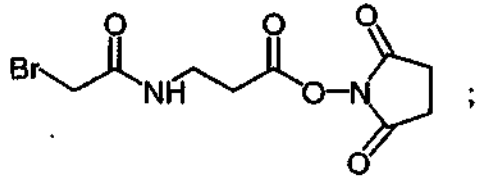
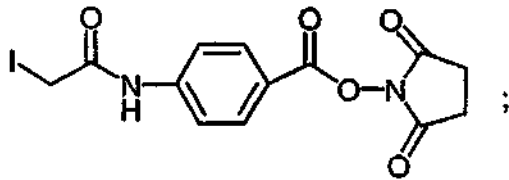
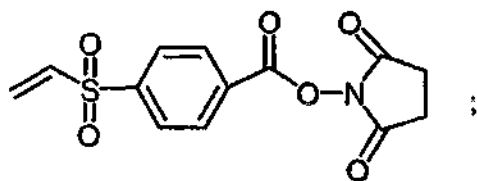


15 y

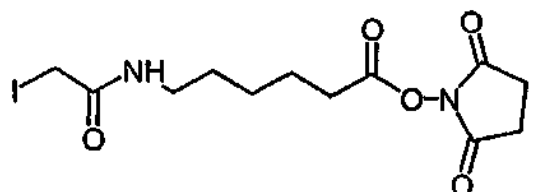


20

Las unidades Bastidor de fórmula (IIIb) se pueden introducir en un Conector haciendo reaccionar los siguientes compuestos intermedios con el extremo N de una unidad de Aminoácido:

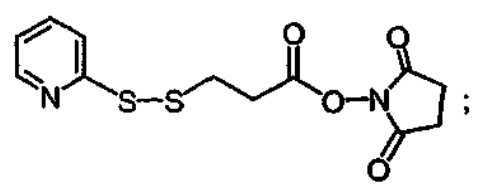


en el que X es -Br o -I; y



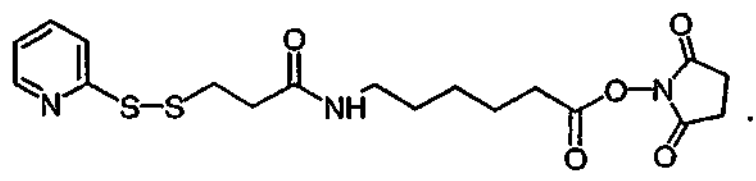
5

Las unidades Bastidor de fórmula (IV) se pueden introducir en un Conector haciendo reaccionar los siguientes compuestos intermedios con el extremo N de una unidad de Aminoácido:



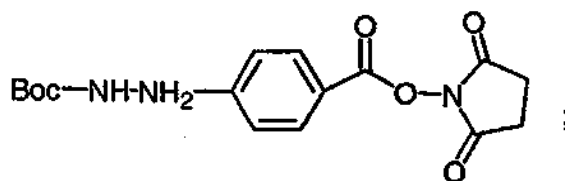
10

y

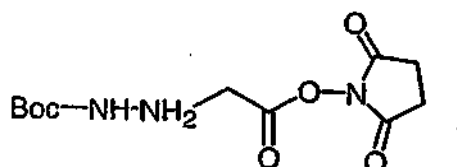


15

Las unidades Bastidor de fórmula (Va) se pueden introducir en un Conector haciendo reaccionar los siguientes compuestos intermedios con el extremo N de una unidad de Aminoácido:



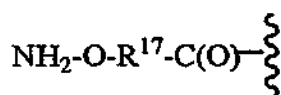
y



5

Otros Bastidores útiles se pueden sintetizar de acuerdo con procedimientos conocidos. Los Bastidores de aminooxi de la fórmula que se muestra a continuación se pueden preparar por tratamiento de haluros de alquilo con N-Boc-hidroxilamina de acuerdo con procedimientos que se describen en Jones, D.S. et al., Tetrahedron Letters, 2000, 41 (10), 1531-1533; y Gilon, C. et al., Tetrahedron, 1967, 23(11), 4441-4447.

10

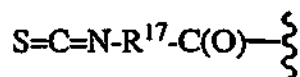


15

en la que -R^{17} se selecciona entre -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -, -O-(alquil $\text{C}_1\text{-C}_8$)-, -arileno-, -alquilen $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -arileno-, -arilen-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -alquilen $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-, -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -, -alquilen $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-, -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, $\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_r\text{-}$, $\text{(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_r\text{-CH}_2\text{-}$; y r es un número entero que varía de 1-10;

Los Bastidores de isotiocianato de la fórmula que se muestra a continuación se pueden preparar a partir de cloruros de ácido isotiocianatocarboxílico tal como se describe en Angew. Chem., 1975, 87 (14): 517.

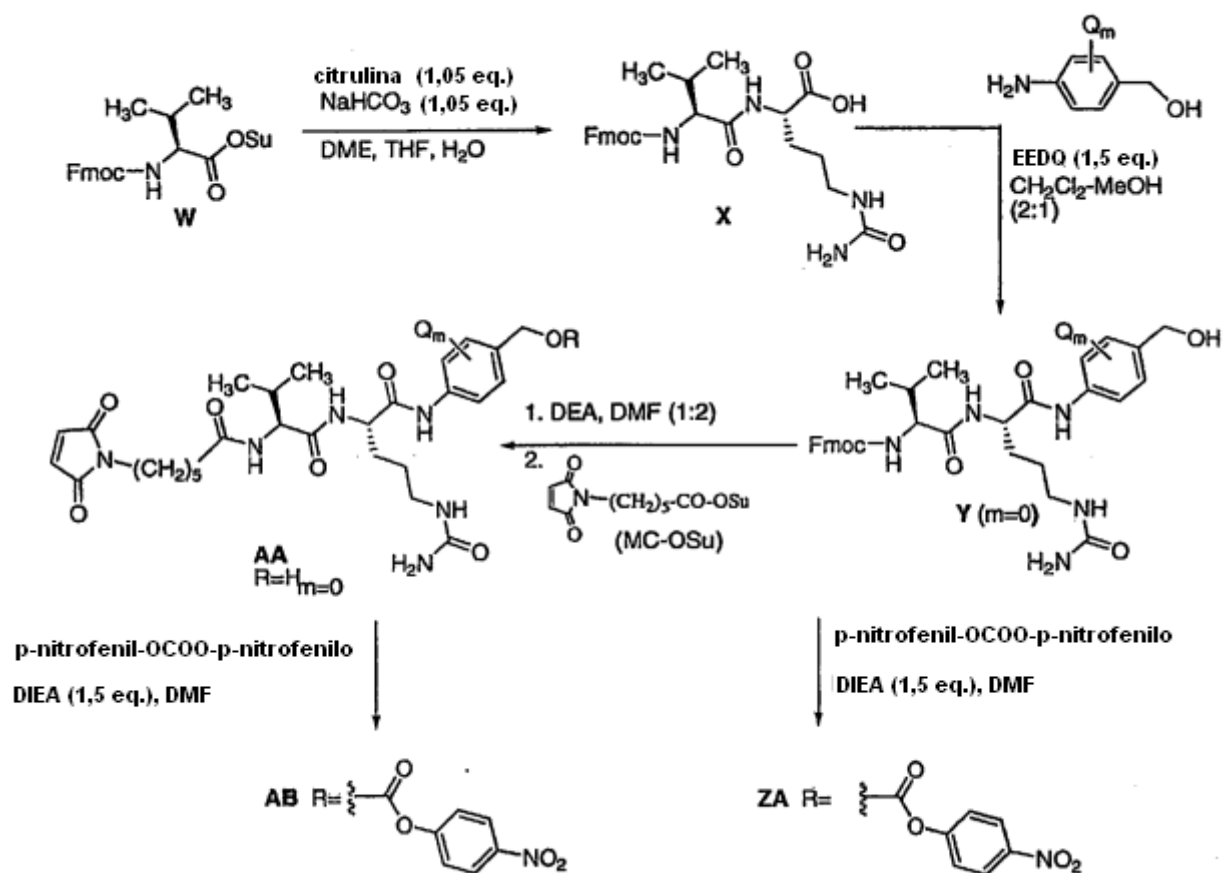
20



en la que -R^{17} es tal como se describe en el presente documento.

25

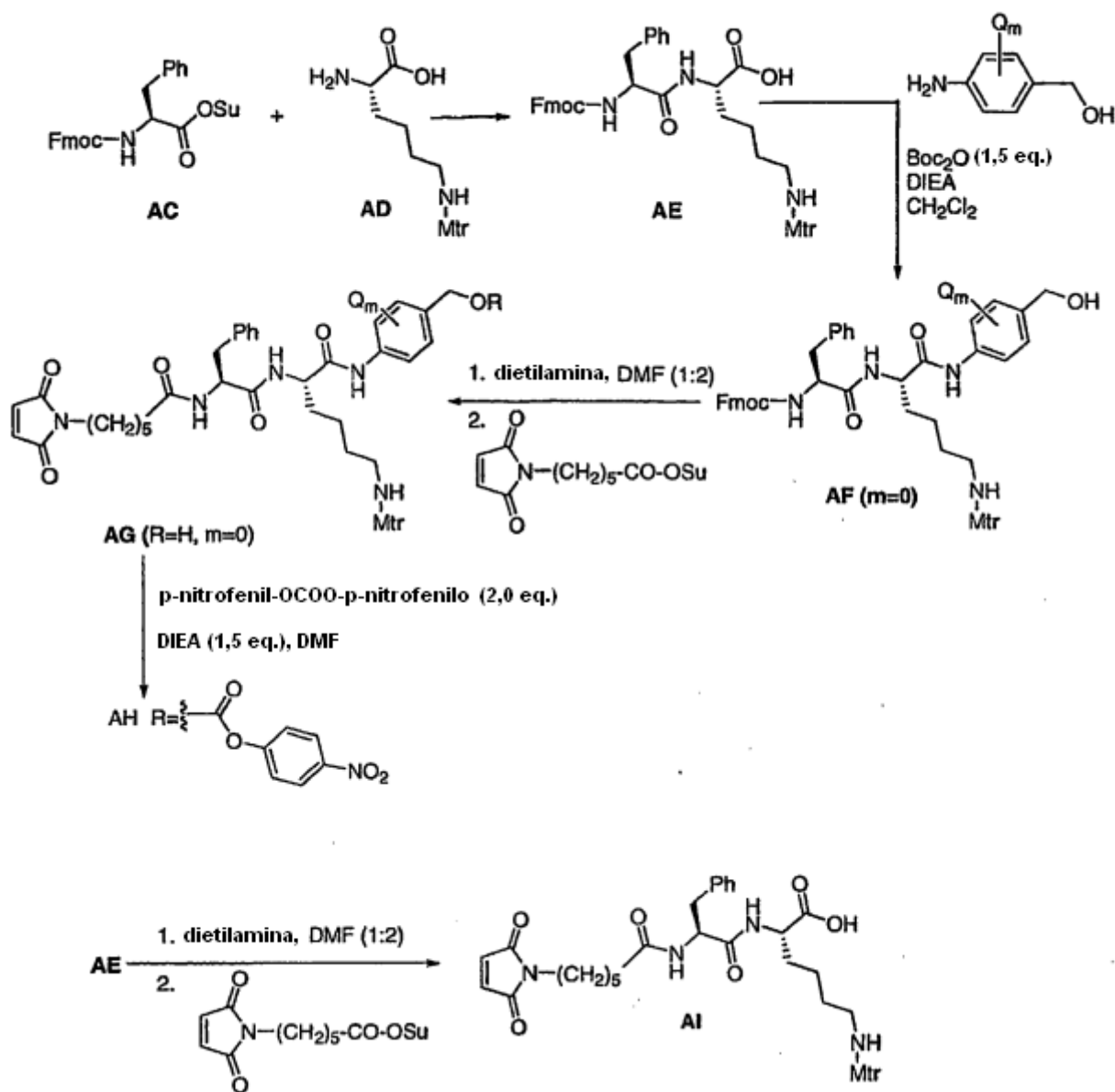
El Esquema 11 nuestro método para obtener un Conector dipeptídico de val-cit que tiene un Bastidor de maleimida y opcionalmente un Espaciador autoinmolativo de p-aminobencilo.

Esquema 11

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 0-4.

5

El Esquema 12 ilustra la síntesis de una unidad de Conector dipeptídica de phe-lys(Mtr) que tiene una unidad Bastidor de maleimida y una unidad Espaciadora autoinmolativa de p-aminobencilo. El material de partida de AD (lys(Mtr)) está disponible en el mercado (Bachem, Torrance, CA) o se puede preparar de acuerdo con Dubowchik, et al. Tetrahedron Letters (1997) 38: 5257-60.

Esquema 12

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 0-4.

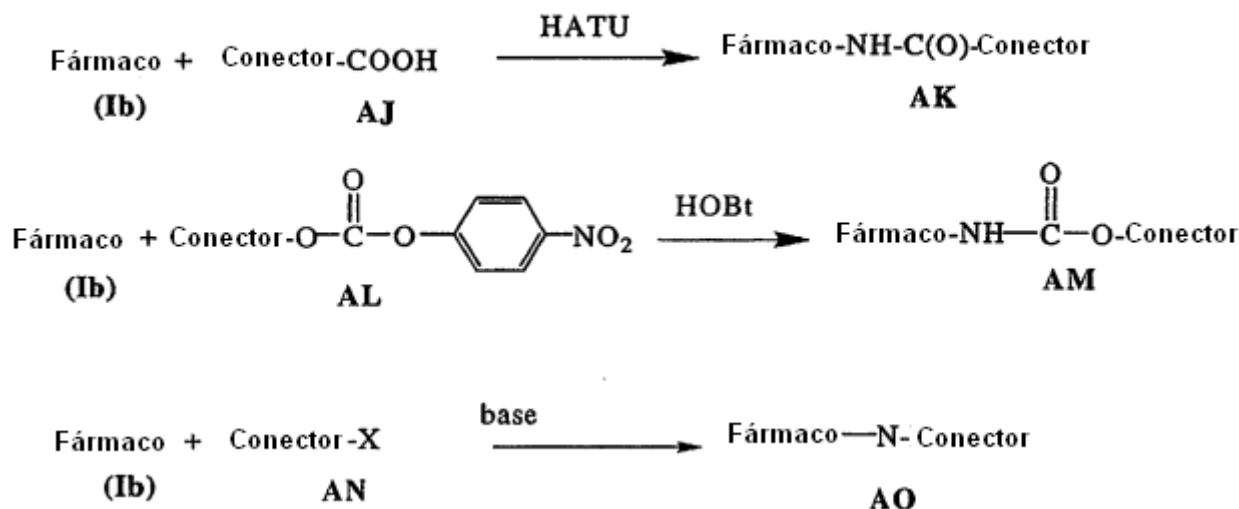
Tal como se muestra en el Esquema 13, un Conector se puede hacer reaccionar con un grupo amino de un Compuesto de Fármaco de Fórmula (Ib) para formar un Compuesto de Fármaco-Conector que contiene un grupo amida o carbamato, que une la unidad de Fármaco con la unidad de Conector. Cuando el Sitio Reactivo N° 1 es un grupo ácido carboxílico, tal como en el Conector **AJ**, la reacción de acoplamiento se puede realizar usando HATU o PyBrop y una base de amina apropiada, dando como resultado un Compuesto de Fármaco-Conector **AK**, que contiene un enlace amida bond entre la unidad de Fármaco y la unidad de Conector. Cuando el Sitio Reactivo N° 1 es un carbonato, tal como en el Conector **AL**, el Conector se puede acoplar con el Fármaco usando HOBt en una mezcla de DMF/piridina para proporcionar un Compuesto de Fármaco-Conector **AM**, que contiene un enlace de carbamato entre la unidad de Fármaco y la unidad de Conector

Como alternativa, cuando el Sitio Reactivo N° 1 es un buen grupo saliente, tal como en el Conector **AN**, el Conector se puede acoplar con un grupo amina de un Fármaco a través de un proceso de sustitución nucleófila para proporcionar un Compuesto de Fármaco-Conector que tiene una unión de amina (**AO**) entre la unidad de Fármaco y la unidad de Conector.

Los métodos ilustrativos útiles para unir un Fármaco a un Ligando para formar un Compuesto de Fármaco-Conector

se representan en el Esquema 13 y se resumen en los Procedimientos Generales G-H.

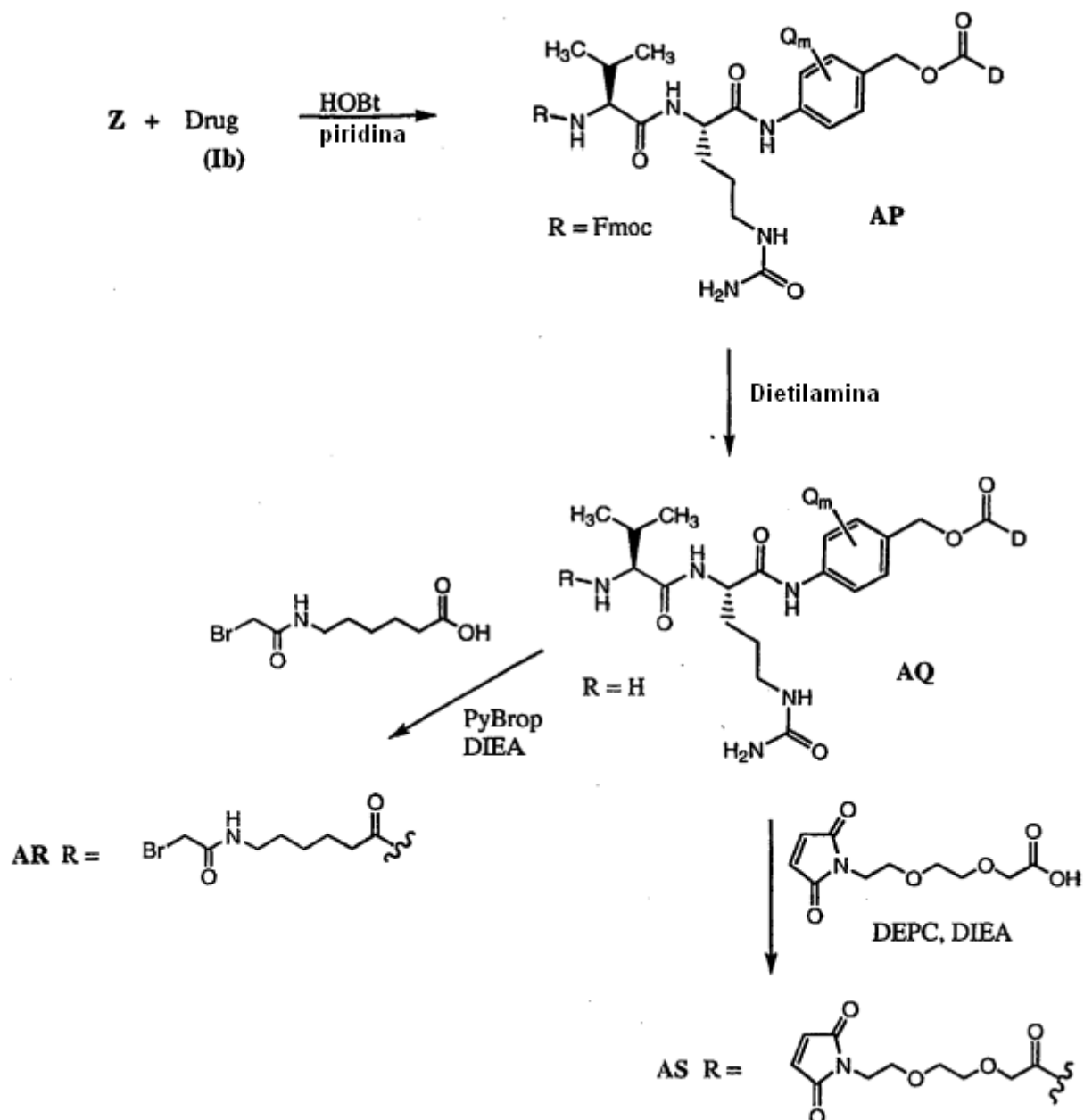
Esquema 13



- 5 **Procedimiento General G: Formación de amida usando HATU.** Un Fármaco **(Ib)** (1,0 equiv.) y un Conector N-
 protegido que contiene un sitio Reactivo de ácido carboxílico (1,0 equiv.) se diluyen con un disolvente orgánico
 adecuado, tal como diclorometano, y la solución resultante se trata con HATU (1,5 equiv.) y una base orgánica,
 preferentemente piridina (1,5 equiv.). La mezcla de reacción se deja en agitación en una atmósfera inerte,
 preferentemente argón, durante 6 h, tiempo durante el cual la mezcla de reacción se controla usando HPLC. La
 10 mezcla de reacción se concentra y el resto resultante se purifica usando HPLC para producir la amida de fórmula
AK.

- Procedimiento H: Formación de carbamato usando HOBt.** Una mezcla de un Conector **AL** que tiene un sitio
 Reactivo de p-nitrofenil carbonato (1,1 equiv.) y Fármaco **(Ib)** (1,0 equiv.) se diluyen con un disolvente orgánico
 15 aprótico, tal como DMF, para proporcionar una solución que tienen una concentración de 50-100 mM, y la solución
 resultante se trata con HOBt (2,0 equiv.) y se coloca en una atmósfera inerte, preferentemente argón. La mezcla de
 reacción se deja en agitación durante 15 min, a continuación se añade una base orgánica, tal como piridina (1/4 en
 v/v), y la evolución de la reacción se controla usando HPLC. El Conector por lo general se consume en 16 h.
 20 Después, la mezcla de reacción se concentra al vacío y el resto resultante se purifica usando, por ejemplo, HPLC
 para producir el carbamato **AM**.

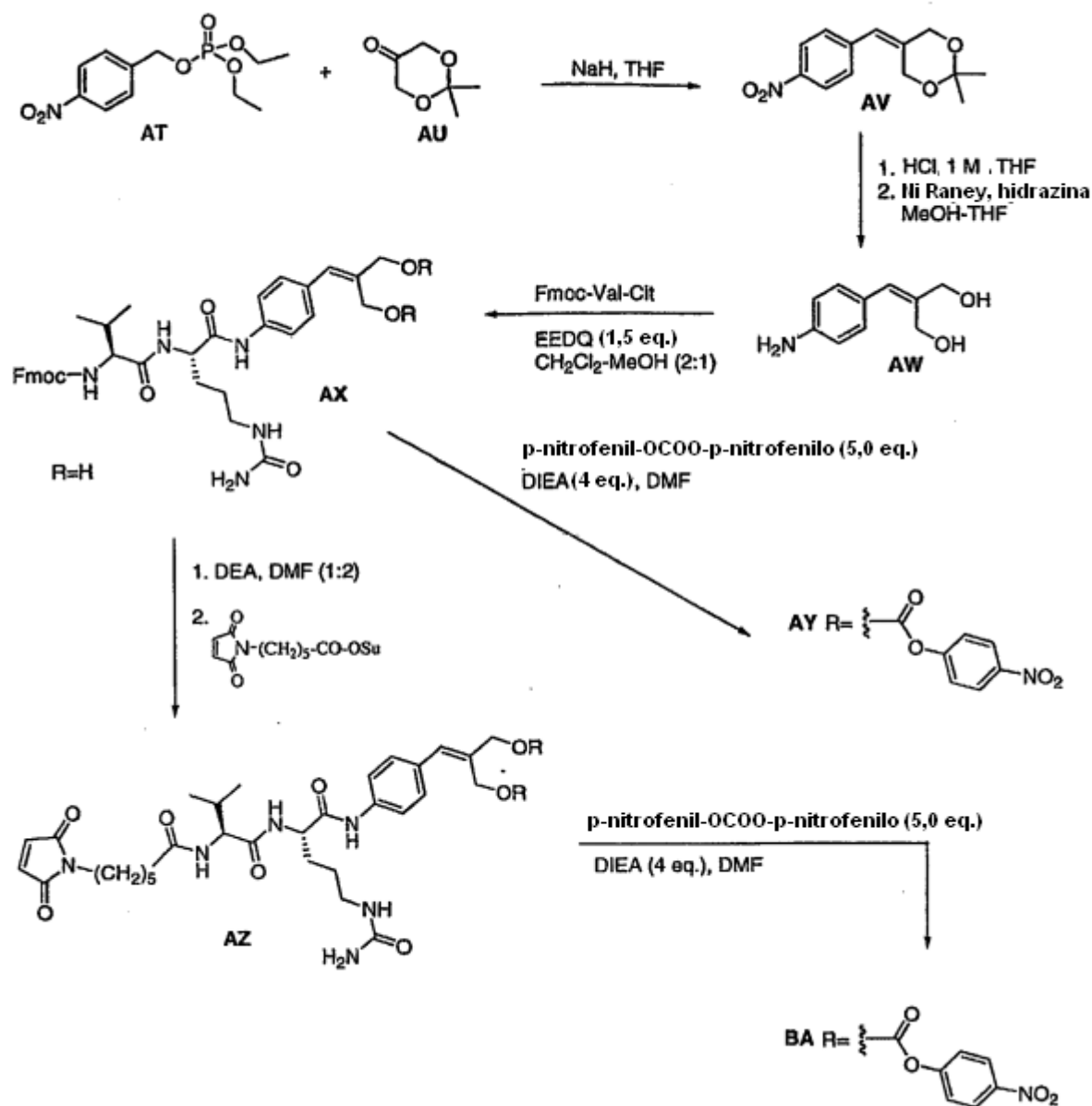
- Un método alternativo para preparar Compuestos de Fármaco-Conector se resume en el Esquema 14. Usando el
 método del Esquema 14, el Fármaco se une a una unidad de Conector parcial (**ZA**, por ejemplo), que no tiene unida
 una unidad Bastidor. Ésto proporciona el compuesto intermedio **AP**, que tiene una unidad de Aminoácido que tiene
 25 un extremo N protegido con Fmoc. El grupo Fmoc se retira a continuación y el compuesto intermedio de amina **AQ**
 resultante se une a continuación a una unidad Bastidor a través de la reacción de acoplamiento catalizada usando
 PyBrop o DEPC. La preparación de Compuestos de Fármaco-Conector que contienen un Bastidor **AR** de
 bromoacetamida o un Bastidor **AS** de PEG maleimida se ilustra en el Esquema 14.

Esquema 14

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 0-4.

5

La metodología útil para la preparación de una unidad de Conector que contiene un espaciador ramificado se muestra en el Esquema 15.

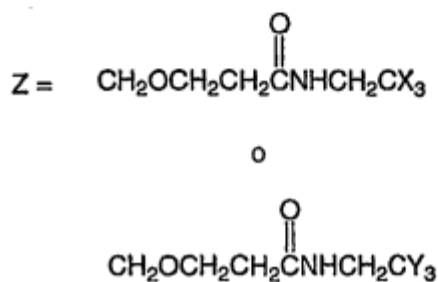
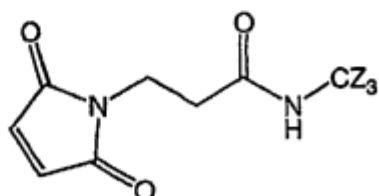
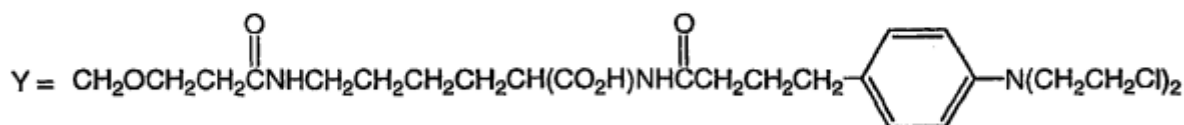
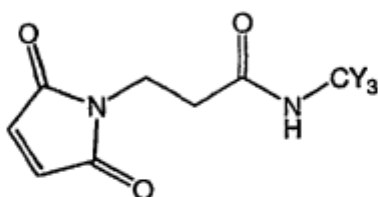
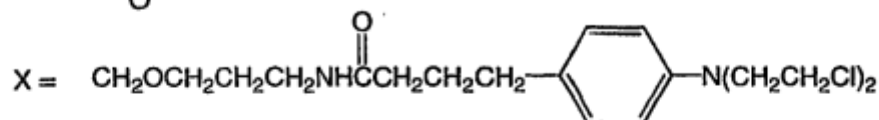
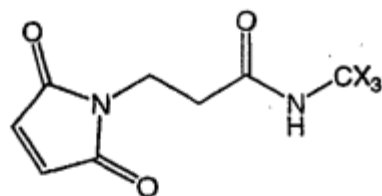
Esquema 15

El Esquema 15 ilustra la síntesis de un conector dipeptídico deval-cit que tiene una unidad Bastidor de maleimida y una unidad de bis(4-hidroximetil)estireno (BHMS). La síntesis del compuesto intermedio de BHMS (**AW**) se ha mejorado a partir de procedimientos anteriores de bibliografía (véase la Publicación Internacional N° WO 9813059 de Firestone et al., y Crozet, M.P.; Archaimbault, G.; Vanelle, P.; Nouguier, R. Tetrahedron Lett. (1985) 26: 5133-5134) y usa como materiales de partida, (4-nitrobencil)fosfonato de dietilo (**AT**) disponible en el mercado y 2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-ona (**AU**) disponible en el mercado. Los conectores **AY** y **BA** se pueden preparar a partir del compuesto **AW** usando la metodología que se describe en el Esquema 9.

4.6.3 CONECTORES DENDRÍTICOS

El conector puede ser un conector de tipo dendrítico para unión covalente de más de un resto de fármaco a través de un resto conector multifuncional, de ramificación con un Ligando, tal como pero no limitado 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 conectores dendríticos pueden aumentar la relación molar de fármaco a anticuerpo, es decir la carga, que está relacionada con la potencia del Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando. Por lo tanto, cuando un anticuerpo modificado genéticamente con cisteína lleva solamente un grupo reactivo tiol de cisteína, una multitud de restos de fármaco se pueden unir a través de un conector dendrítico.

Las siguientes realizaciones a modo de ejemplo de reactivos de conector dendrítico permiten que se conjuguen hasta nueve reactivos de resto de fármaco nucleófilo por reacción con los grupos funcionales cloroetilo de la mostaza de nitrógeno



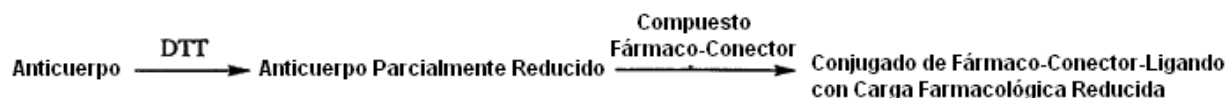
5

4.6.4 CONJUGACIÓN DE RESTOS DE FÁRMACOS A ANTICUERPOS

El Esquema 16 ilustra metodología útil para preparar conjugados de Fármaco-Conector-Ligando que tienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 fármacos por anticuerpo. Un anticuerpo se trata con un agente reductor, tal como ditioneitol (DTT) para reducir alguno o todos los restos disulfuro de la cisteína para formar grupos tiol de cisteína nucleófilos (-CH₂SH). El anticuerpo parcialmente reducido reacciona de este modo con compuestos de fármaco-conector, o reactivos de conector, 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.

15

Esquema 16



20

Por ejemplo, un anticuerpo, *por ejemplo*, AC10, disuelto en borato sódico 500 mM y cloruro sódico 500 mM a pH 8,0 se trata con un exceso de ditioneitol 100 mM (DTT). Después de incubación a 37 °C durante aproximadamente 30

minutos, el tampón se intercambia mediante elución sobre resina Sephadex G25 y elución con PBS con DTPA 1 mM. El valor de tior/Ab se comprueba por determinación de la concentración de anticuerpos reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tior por reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido disuelto en PBS se enfría con hielo. El conector de fármaco, *por ejemplo*, MC-val-cit-PAB-MMAE en DMSO, disuelto en acetonitrilo y agua en una concentración conocida, se añade al anticuerpo reducido enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para inactivar la reacción se protege cualquier grupo tior de anticuerpos sin reaccionar. La mezcla de reacción se concentra por ultrafiltración centrífuga y el ADC, *por ejemplo*, AC10-MC-vc-PAB-MMAE, se purifica y se desala por 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.

Se prepararon diversos conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC), con diversos conectores, y los restos de fármaco, MMAE y MMAF. La siguiente tabla es un grupo a modo de ejemplo de ADC que se prepararon siguiendo el protocolo del Ejemplo 27, y se caracterizaron por HPLC y ensayo de carga de fármaco.

Diana (antígeno)	ADC	cantidad aislada (mg)	relación fármaco/Ab
0772P	16E12-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	1,75	4
0772P	11D10-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	46,8	4,4
0772P	11D10-MC-vc-PAB-MMAF	54,5	3,8
Brevican	Brevican-MC-MMAF	2	6
Brevican	Brevican-MC-vc-MMAF	2	6
Brevican	Brevican-MC-vc-PAB-MMAF	1,4	6
CD21	CD21-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	38,1	4,3
CD21	CD21-MC-vc-PAB-MMAF	43	4,1
CRIPTO	11F4-MC-vc-PAB-MMAF	6	4,8
CRIPTO	25G8-MC-vc-PAB-MMAF	7,4	4,7
E16	12G12-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	2,3	4,6
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	2,9	4,6
E16	12B9-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	1,4	3,8
E16	12B9-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	5,1	4
E16	12G12-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	3	4,6
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	4,8	4,1
E16	385-MC-vc-PAB-MMAF	24,7	4,4
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	29,9	7,1
EphB2R	2H9-MC-fk-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	25	7,5
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	175	4,1
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAF	150	3,8
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAF	120	3,7
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	10,7	4,4
IL-20Ra	IL20Ra-fk-MMAE Ejemplo de referencia	26	6,7
IL-20Ra	IL20Ra-vc-MMAE Ejemplo de referencia	27	7,3
EphB2	IL8-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	251	3,7
MDP	MDP-vc-MMAE Ejemplo de referencia	32	
MPF	19C3-vc-MMAE Ejemplo de referencia	1,44	6,5
MPF	7D9-vc-MMAE Ejemplo de referencia	4,3	3,8
MPF	19C3-vc-MMAE Ejemplo de referencia	7,9	3
MPF	7D9-MC-vc-PAB-MMAF	5	4,3
Napi3b	10H1-vc-MMAE Ejemplo de referencia	4,5	4,6

Diana (antígeno)	ADC	cantidad aislada (mg)	relación fármaco/Ab
Napi3b	4C9-vc-MMAE Ejemplo de referencia	3,0	5,4
Napi3b	10H1-vc-MMAE Ejemplo de referencia	4,5	4,8
Napi3b	10H1-vc-MMAF	6,5	4
NCA	3E6-MC-fk-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	49,6	5,4
NCA	3E6-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	56,2	6,4
PSCA	PSCA-fk-MMAE Ejemplo de referencia	51,7	8,9
PSCA	PSCA-vc-MMAE Ejemplo de referencia	61,1	8,6
Napi3b	10H1-MC-vc-PAB-MMAE	75	4,2
Napi3b	10H1-MC-vc-PAB-MMAF	95	4,4
Napi3b	10H1-MC-MMAF	92	4
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	79	5
EphB2R	2H9-MC-MMAF	92	4,9
0772P	11D10(Fc quimera)-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	79	4,3
0772P	11D10(Fc quimera)-MC-vc-PAB-MMAF	70	4,5
0772P	11D10(Fc quimera)-MC-MMAF	23	4,5
Brevican	6D2-MC-vc-PAB-MMAF	0,3	4,5
Brevican	6D2-MC-MMAF	0,36	4,5
EphB2R	2H9(Fc quimera)-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	1983	4,3
E16	12B9-MC-vc-PAB-MMAE	14,1	4,6
E16	12B9-MC-vc-PAB-MMAF	16,4	4,5
E16	12G12-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	10,5	4,1
E16	12G12-MC-vc-PAB-MMAF	10,2	3,8
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	58,6	3,8
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAF	8	3,1
0772P	11D10(Fc quimera)-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	340	3,9
Steap1	(Steap1-92)-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	3,5	4
Steap1	(Steap1-92)-MC-vc-PAB-MMAF	4,7	4
Steap1	(Steap1-120)-MC-vc-PAB-MMAE Ejemplo de referencia	2	4
Steap1	(Steap1-120)-MC-vc-PAB-MMAF	2,3	4
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAF	52,2	4,5

4.7 COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

5 En otras realizaciones, se describe una composición que incluye una cantidad eficaz de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Por conveniencia, las unidades de Fármacos y Compuestos de Fármaco-Conector se pueden mencionar como Compuestos a modo de Ejemplo, mientras que Conjugados Fármaco-Ligando y Conjugados Fármaco-Conector-Ligando se pueden mencionar como Conjugados a modo de Ejemplo. Las composiciones son adecuadas para administración veterinaria o en seres humanos.

10 Las presentes composiciones pueden estar en cualquier forma que permita que la composición se administre a un paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un sólido, líquido o gas (aerosol). Las vías de administración habituales incluyen, sin limitación, oral, tópica, parenteral, sublingual, rectal, vaginal, ocular,

intratumoral, e intranasal. La administración parenteral incluye inyecciones subcutánea, intravenosa, intramuscular, inyección intraesternal o técnicas de infusión. En un aspecto, las composiciones se administran por vía parenteral. En otro aspecto más, los Compuestos a modo de Ejemplo y/o los Conjugados a modo de Ejemplo o composiciones se administran por vía intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular con el fin de que permitan que un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo esté biodisponible tras la administración de la composición un paciente. Las composiciones pueden tomar la forma de una o más unidades de dosificación, en las que por ejemplo, un comprimido puede ser una sola unidad de dosificación, y un envase de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo en forma de aerosol pueda contener una pluralidad de unidades de dosificación.

Los materiales usados en la preparación de las composiciones farmacéuticas pueden ser no tóxicos en las cantidades usadas. Será evidente para los expertos en la materia que la dosificación óptima del ingrediente o ingredientes activos en la composición farmacéutica dependerá de diversos factores. Factores relevantes incluyen, sin limitación, el tipo de animal (por ejemplo, ser humano), la forma en particular del Compuesto a modo de Ejemplo o Conjugado a modo de Ejemplo, la forma de administración, y la composición usada.

El vehículo o excipiente farmacéuticamente activo puede ser de partículas, de modo que las composiciones, por ejemplo, estén en forma de comprimido o de polvo. El vehículo o vehículos pueden ser líquidos, siendo las composiciones, por ejemplo, un jarabe oral o un líquido inyectable. Además, el vehículo o vehículos pueden ser gaseosos o con partículas, con el fin de proporcionar una composición de aerosol útil, *por ejemplo*, en administración por inhalación.

Cuando está destinada a la administración oral, la composición está preferentemente en forma sólida o líquida, en la que las formas semisólida, semilíquida, suspensión y gel están incluidas dentro de las formas que se consideran en el presente documento como sólidas o líquidas.

Como una composición sólida para administración oral, la composición se prevé formular en una forma de polvo, gránulo, comprimido fabricado por compresión, píldora, cápsula, goma de mascar, oblea o similares. Dicha composición sólida contiene por lo general uno o más diluyentes inertes. Además, pueden estar presentes uno o más de los siguientes: aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, etil celulosa, celulosa microcristalina, o gelatina; excipientes tales como almidón, lactosa o dextrinas, agentes disgregantes tales como ácido algínico, alginato sódico, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio o Sterotex; agentes deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina, un agente saborizante tales como menta, salicilato de metilo por sabor a naranja, y un agente colorante.

Cuando la composición está en forma de una cápsula, *por ejemplo*, una cápsula de gelatina, ésta puede contener, además de materiales del tipo que se han mencionado anteriormente, un vehículo líquido tal como polietilenglicol, ciclodextrina o un aceite graso.

La composición puede estar en forma de un líquido, *por ejemplo*, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser útil para administración oral o para administración por inyección. Cuando está destinado para administración oral, una composición que de comprender uno o más de un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y potenciador del sabor. En una composición para administración por inyección, también se puede incluir uno o más tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizante el agente isotónico.

Las composiciones líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, también pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro sódico isotónico, aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como medio disolvente o de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, ciclodextrina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes de quelación tales como ácido etilendiamintetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para la justa de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. Una composición parenteral puede estar incluida en ampolla, una jeringa desechable o un vial de dosis múltiples fabricado de vidrio, plástico u otro material. La solución salina fisiológica es un adyuvante a modo de ejemplo. Una composición inyectable es preferentemente estéril.

La cantidad del Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo que es eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección en particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Además, se pueden usar opcionalmente ensayo *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos óptimos de dosificación. La dosis precisa a usar en las composiciones dependerá también de la vía de administración, y de la gravedad de la enfermedad o el trastorno, y se debería decidir de acuerdo con el criterio del médico en cada una de las circunstancias del paciente.

Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo

de Ejemplo de modo que se obtendrá una dosificación adecuada. Por lo general, esta cantidad es de al menos aproximadamente un 0,01 % de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo en peso de la composición. Cuando se pretende que sea para administración oral, esta cantidad se puede variar para que oscile de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 80 % en peso de la composición. En un aspecto, las composiciones orales pueden comprender de aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 50 % del Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo el peso de la composición. En otro aspecto más, las composiciones presentes se preparan de modo que una unidad de dosificación parenteral contenga de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 2 % el peso del Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo.

A la administración intravenosa, la composición de comprender de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo por kg de peso corporal del animal. En un aspecto, la composición puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo por kg de peso corporal del animal. En otro aspecto, la cantidad administrada estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal del Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo.

Generalmente, la dosificación de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo administrada a un paciente es por lo general de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 2000 mg/kg del peso corporal del animal. En un aspecto, la dosificación administrada aún pacientes entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del animal, en otro aspecto, la dosificación administrada a un pacientes es entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 250 mg/kg del peso corporal del animal, además, en otro aspecto, la dosificación administrada a un paciente es entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del animal, en otro aspecto más, la dosificación administrada es entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del animal, y además en otro aspecto, la dosificación administrada es entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del animal.

Los Compuestos a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo o composiciones se pueden administrar mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (*por ejemplo*, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.). La administración puede ser sistémica o local. Se conocen diversos sistemas de administración, *por ejemplo*, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., y se pueden usar para administrar un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo o composición. En determinadas realizaciones, se administra más de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo o composición a un paciente.

En realizaciones específicas, puede ser deseable administrar uno o más Compuestos a modo de Ejemplo y/o Conjugados a modo de Ejemplo o composiciones localmente en el área con necesidad de tratamiento. Esto se puede conseguir, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante la cirugía; aplicación tópica, *por ejemplo*, de manera conjunta con un apósito para heridas después de la cirugía; por inyección; por medio de un catéter; por medio de un supositorio; o por medio de un implante, siendo el implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. En una realización, la administración puede ser por inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de un cáncer, tumor o tejido neoplásico o pre-neoplásico. En otra realización, la administración puede ser por inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de una manifestación de una enfermedad autoinmune.

En determinadas realizaciones, puede ser deseable introducir uno o más Compuestos a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo o composiciones en el sistema nervioso central mediante cualquier vía adecuada, que incluye inyección intraventricular e intratecal. La inyección intraventricular se puede facilitar a través de un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tales como un depósito de Ommaya.

Además, se puede usar administración pulmonar, *por ejemplo*, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulaciones con un agente de aerosol, o a través de perfusión en un tensioactivo pulmonar de fluorocarbono o sintético.

En otra realización más, los Compuestos a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo o composiciones se pueden administrar en un sistema de liberación controlada, tales como pero no se limitan a, una bomba o se pueden usar diversos materiales poliméricos. En otra realización más, un sistema de liberación controlada se puede colocar en proximidad a la diana de los Compuestos a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo o composiciones, *por ejemplo*, el cerebro, necesitando de este modo solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, *por ejemplo*, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, mencionado anteriormente, vol. 2, páginas 115-138 (1984)). Se pueden usar otros sistemas de liberación controlada que se analizan en la revisión de Langer (Science 249: 1527-1533 (1990)).

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente, con el que se administra un Compuesto a

modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, que incluyen los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos pueden ser solución salina, goma de acacia, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea, y similares. Además, se pueden usar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. En una realización, cuando se administran a un paciente, el Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo o composiciones y vehículos farmacéuticamente aceptables son estériles. El agua es un vehículo a modo de ejemplo cuando los Compuestos a modo de Ejemplo y/o los Conjugados a modo de Ejemplo se administran por vía intravenosa. Las soluciones salinas y soluciones de dextrosa acuosa y glicerol solutions también se pueden usar como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, quizá, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Las presentes composiciones, si se desea, también pueden contener cantidades menores de agentes humectantes o de emulsificación, o agentes de tamponamiento del pH.

Las presentes composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, gránulos, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, supositorios, emulsiones, aerosoles, pulverizaciones, suspensiones, o cualquier otra forma adecuada para su uso. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.

En una realización, los Compuestos a modo de Ejemplo y/o los Conjugados a modo de Ejemplo se formulan de acuerdo con procedimientos de rutina en forma de una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa en animales, particularmente seres humanos. Por lo general, los vehículos su excipientes para la administración intravenosa son soluciones tampón acuosas isotónicas estériles. Cuando sea necesario, las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Las composiciones para administración intravenosa pueden comprender opcionalmente un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan de manera conjunta en forma de dosificación individual, por ejemplo, en forma de un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un envase cerrado herméticamente tal como una ampolla o un sobrecito que indique la cantidad del agente activo. Cuando se va a administrar un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo por infusión, se puede dosificar, por ejemplo, con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando el Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración.

Las composiciones para administración oral pueden estar en forma de comprimidos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos, polvos, emulsiones, cápsulas, jarabes o elixires, por ejemplo. Las composiciones administradas por vía oral pueden contener uno o más agentes opcionales opcionalmente, por ejemplo, agentes edulcorantes tales como fructosa, aspartamo o sacarina; agentes saborizantes tales como menta, aceite de gaulteria, o cereza; agentes colorantes; y agentes conservantes, para proporcionar una preparación farmacéuticamente agradable al paladar. Además, cuando están en forma de comprimido o píldora, las composiciones se pueden revestir para retrasar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal proporcionando una acción sostenida durante un período de tiempo prolongado. Las membranas selectivamente permeables que rodean un compuesto de dirección osmóticamente activo también son adecuadas para compuestos administrados por vía oral. En estas últimas plataformas, el fluido del entorno que rodea a la cápsula es embestido por el compuesto de dirección, que se hincha para desplazar el agente o composición de agente a través de una apertura. Estas plataformas de administración pueden proporcionar un perfil de liberación básicamente de orden cero en oposición a los perfiles con adiciones de formulaciones de liberación inmediata. También se puede usar un material de retardo con el tiempo tal como monoestearato de glicerol o estearato de glicerol.

Las composiciones pueden estar destinadas a la administración tópica, en cuyo caso el vehículo puede estar en forma de una solución, emulsión, pomada o base de gel. Si están destinadas a la administración transdérmica, la composición puede estar en la forma de un parche transdérmico o un dispositivo de iontoforesis. Las formulaciones tópicas pueden comprender una concentración de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo de aproximadamente un 0,05 % a aproximadamente un 50 % en p/v (peso por volumen unitario de la composición), en otro aspecto, de un 0,1 % a un 10 % en p/v.

La composición puede estar destinada a la administración rectal, en la forma, *por ejemplo*, de un supositorio que se fundirá en el recto y liberará el Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo.

La composición puede incluir diversos materiales que modifican la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que forman una cubierta de revestimiento alrededor de los principios activos. Los materiales que forman la cubierta de revestimiento por lo general son inertes, y se pueden seleccionar entre, por ejemplo, azúcar, goma laca, y otros agentes de revestimiento entérico. Como alternativa, los principios activos se pueden encerrar en una cápsula de gelatina.

Las composiciones pueden consistir en unidades de dosificación gaseosa, por ejemplo, pueden estar en forma de un aerosol. El término aerosol se usa para indicar diversos sistemas que varían de los de naturaleza coloidal a sistemas que consisten en envases presurizados. Administración puede ser mediante un gas licuado o comprimido o mediante un sistema de bombeo adecuado que dosifica los principios activos.

Ya sea en forma sólida, líquida o gaseosa, las presentes composiciones pueden incluir un agente farmacológico usado en el tratamiento de cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa.

4.8 USOS TERAPÉUTICOS DE LOS CONJUGADOS A MODO DE EJEMPLO

Los Compuestos a modo de Ejemplo y/o los Conjugados a modo de Ejemplo son útiles para tratar cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa en un paciente.

4.8.1 TRATAMIENTO DE CÁNCER

Los Compuestos a modo de Ejemplo y/o los Conjugados a modo de Ejemplo son útiles para inhibir la multiplicación de una célula tumoral o de una célula cancerosa, causando apoptosis en una célula tumoral o cancerosa, o para tratar el cáncer en un paciente. Los Compuestos a modo de Ejemplo y/o los Conjugados a modo de Ejemplo se pueden usar en consecuencia de acuerdo con diversos entornos para el tratamiento de cánceres en animales. Los Conjugados Fármaco-Conector-Ligando se pueden usar para administrar un Fármaco o unidad de Fármaco a una célula tumoral o célula cancerosa. Sin quedar ligado a teoría alguna, en una realización, la unidad de Ligando de un Conjugado a modo de Ejemplo se une a o se asocia con un antígeno asociado a célula cancerosa asociado una célula tumoral, y el Conjugado a modo de Ejemplo se puede recoger dentro de una célula tumoral o célula cancerosa a través de endocitosis mediada por receptores. El antígeno se puede unir a una célula tumoral o célula cancerosa o puede ser una proteína de matriz extracelular asociada con la célula tumoral o célula cancerosa. Una vez dentro de la célula, una o más secuencias peptídicas específicas dentro de la unidad de Conector se extienden hidrolíticamente con una o más proteasas asociadas a células tumorales o a células cancerosas, dando como resultado la liberación de un Fármaco o un Compuesto de Fármaco-Conector. A continuación, el Fármaco liberado o Compuesto de Fármaco-Conector es libre paramilitar dentro de la célula e inducir actividades citotóxicas citostáticas. En una realización alternativa, el Fármaco o unidad de Fármaco se escinde del Conjugado a modo de Ejemplo fuera de la célula tumoral o célula cancerosa, y el Fármaco o Compuesto de Fármaco-Conector penetra posteriormente en la célula.

En una realización, la unidad de Ligando se une a la célula tumoral o célula cancerosa.

En otra realización, la unidad de Ligando se une a una célula tumoral o antígeno de célula cancerosa que está en la superficie de la célula tumoral o célula cancerosa.

En otra realización, la unidad de Ligando se une a una célula tumoral o antígeno de célula cancerosa que está en una proteína de matriz extracelular asociada con la célula tumoral o célula cancerosa.

La especificidad de la unidad de Ligando para una célula tumoral o célula cancerosa en particular puede ser importante para determinar los tumores o cánceres que se tratan de forma más eficaz. Por ejemplo, los Conjugados a modo de Ejemplo que tienen una unidad de Ligando BR96 pueden ser útiles para tratar carcinomas positivos a antígenos que incluyen los de pulmón, mama, colon, ovarios, y páncreas. Los Conjugados a modo de Ejemplo que tienen una unidad de Ligando Anti-CD30 o una anti-CD40 pueden ser útiles para tratar neoplasias hematológicas.

Otros tipos de cánceres en particular que se pueden tratar con los Conjugados a modo de Ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los que se desvelan en la Tabla 3.

TABLA 3

Tumores sólidos, que incluyen pero no se limitan a:

fibrosarcoma

mixosarcoma

liposarcoma

condrosarcoma

sarcoma osteogénico

cordoma

angiosarcoma

endoteliosarcoma

Tumores sólidos, que incluyen pero no se limitan a:

linfangiosarcoma
linfangioendoteliosarcoma
sinovioma
mesotelioma
tumor de Ewing
leiomiosarcoma
rabdomiosarcoma
cáncer de colon
cáncer colorrectal
cáncer de riñón
cáncer pancreático
cáncer óseo
cáncer de mama
cáncer de ovarios
cáncer de próstata
cáncer de esófago
cáncer de estómago
cáncer oral
cáncer nasal
cáncer de garganta
carcinoma de células escamosas
carcinoma de células basales
adenocarcinoma
carcinoma de glándulas utópicas
carcinoma de glándulas sebáceas
carcinoma papilar
adenocarcinomas papilares
cistadenocarcinoma
carcinoma medular
carcinoma broncogénico
carcinoma de células renales
hepatoma
carcinoma de conductos biliares
coriocarcinoma
seminoma
carcinoma embrionario
tumor de Wilms
cancer cervical
cancer uterino
cancer testicular
carcinoma de pulmón de células pequeñas

Tumores sólidos, que incluyen pero no se limitan a:

- carcinoma de vejiga
- cáncer de pulmón
- carcinoma epitelial
- glioma
- glioblastoma multiforme
- astrocitoma
- meduloblastoma
- craneofaringioma
- ependimoma
- pinealoma
- hemangioblastoma
- neurinoma del acústico
- oligodendroglioma
- meningioma
- cáncer de piel
- melanoma
- neuroblastoma
- retinoblastoma

cánceres de transmisión sanguínea, que incluyen pero no se limitan a

- leucemia linfoblástica aguda "ALL"
- leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B
- leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T
- leucemia mieloblástica aguda "AML"
- leucemia promielocítica aguda "APL"
- leucemia monoblástica aguda
- leucemia eritroleucémica aguda
- leucemia megacarioblástica aguda
- leucemia mielomonocítica aguda
- leucemia no linfocítica aguda
- leucemia sin diferenciar aguda
- leucemia mielocítica crónica "CML"
- leucemia linfocítica crónica "CLL"
- leucemia de células pilosas
- mieloma múltiple

leucemias aguda y crónica:

- linfoblástica
- mielogénica

leucemias aguda y crónica:

linfocítica

leucemias mielocíticas

Linfomas:

enfermedad de Hodgkin

Linfoma no Hodgkin

Mieloma múltiple

macroglobulinemia de Waldenström

Enfermedad de cadena pesada

Policitemia vera

5 Los Conjugados a modo de Ejemplo proporcionan una dirección al tumor o cáncer específica de conjugación, reduciendo de este modo la toxicidad general de estos compuestos. Las unidades Conectores estabilizan los Conjugados a modo de Ejemplo en sangre, sin embargo se pueden escindir con proteasas específicas de tumores dentro de la célula, liberando un Fármaco.

4.8.2 TERAPIA DE MODALIDAD MÚLTIPLE PARA CÁNCER

10 Los cánceres, que incluyen, pero no se limitan a, un tumor, metástasis, u otra enfermedad o trastorno caracterizado por crecimiento celular descontrolado, se pueden tratar o prevenir mediante administración de un Conjugado a modo de Ejemplo y/o un Compuesto a modo de Ejemplo.

15 Métodos para tratar o prevenir el cáncer son los que se describen en el presente documento, que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado a modo de Ejemplo y un agente quimioterapéutico. En un método, el agente quimioterapéutico es uno con el que no se ha encontrado que el tratamiento del cáncer sea resistente. En otro método, el agente quimioterapéutico es uno con el que se ha encontrado que el tratamiento del cáncer es resistente. Los Conjugados a modo de Ejemplo se pueden administrar a un paciente que también ha experimentado cirugía como tratamiento para el cáncer.

20 En un método, el método adicional de tratamiento es la terapia de radiación.

25 En un método específico, el Conjugado a modo de Ejemplo se administró simultáneamente con el agente quimioterapéutico o con terapia de radiación. En otro método específico, el agente quimioterapéutico o terapia de radiación se administra antes su después de la administración de un Conjugado a modo de Ejemplo, en un aspecto al menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes, en aspectos adicionales varios meses (*por ejemplo*, hasta tres meses), antes o después de la administración de un Conjugado a modo de Ejemplo.

30 Un agente quimioterapéutico se puede administrar durante una serie de sesiones. Se puede administrar uno cualquiera o una combinación de los agentes quimioterapéuticos que se enumeran en la Tabla 4. Con respecto a la radiación, se puede usar cualquier protocolo de terapia de radiación dependiendo del tipo de cáncer a tratar. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, se puede administrar radiación de rayos X; en particular, se puede usar megavoltaje de alta energía (radiación mayor que 1 MeV de energía) para tumores profundos, y se pueden usar radiación de haz de electrones rayos X de ortovoltaje para cánceres de piel. Además, se pueden administrar radioisótopos que emiten rayos gamma, tales como isótopos radiactivos de radio, cobalto y otros elementos.

35 Además, se describen métodos tratamiento del cáncer con un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo como una alternativa a la quimioterapia o a la terapia de radiación cuando se ha demostrado, o se puede demostrar, que la quimioterapia o la terapia de radiación puede ser demasiado tóxica, *por ejemplo*, da como resultado efectos secundarios inaceptables o insoportables, para el sujeto que se está tratando. El animal que se está tratando, opcionalmente, se puede tratar con otro tratamiento de cáncer tal como cirugía, terapia de radiación o quimioterapia, dependiendo del tratamiento que se encuentre aceptable o soportable.

Los Compuestos a modo de Ejemplo y/o los Conjugados a modo de Ejemplo también se pueden usar de forma *in*

vitro o *ex vivo*, de modo que para el tratamiento de determinados cánceres, que incluyen, pero no se limitan a leucemias y linfomas, dicho tratamiento implica trasplantes de células madre autólogas. Esto puede implicar un proceso en etapas múltiples en el que las células madre hematopoyéticas autólogas del animal se cosechan y se purgan de todas las células cancerosas, a continuación se erradica la población de células de médula ósea restantes del animal mediante la administración de una dosis elevada de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo con o sin terapia de radiación de dosis elevada adjunta, y el injerto de células madre se infunde de nuevo en el animal. A continuación, se proporciona cuidados de apoyo mientras que la función de la médula ósea se restablece y el animal se recupera.

4.8.3 TERAPIA CON MÚLTIPLES FÁRMACOS PARA CÁNCER

Se desvelan métodos para tratar el cáncer que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado a modo de Ejemplo y otro agente terapéutico que es un agente anticáncer. Agentes anticáncer adecuados incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, taxol, L-asparaginasa, mercaptopurina, tioguanina, hidroxiurea, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, cisplatino, carboplatino, mitomicina, dacarbazina, procarbazona, topotecán, mostazas de nitrógeno, cytoxan, etopósido, 5-fluorouracilo, BCNU, irinotecán, camptotecinas, bleomicina, doxorubicina, idarrubicina, daunorrubicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, asparaginasa, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel, and docetaxel. En un aspecto, el agente anticáncer incluye, pero no se limitan a, un fármaco que se enumera en la Tabla 4.

TABLA 4

Agentes de alquilación	
Mostazas de nitrógeno:	ciclofosfamida ifosfamida trofosfamida clorambucilo melfalano
Nitrosoureas:	carmustina (BCNU) lomustina (CCNU)
Alquilsulfonatos	busulfán
	treosulfán
Triazenos:	decarbazona
Compuestos que contienen platino:	cisplatino carboplatino
Alcaloides Vegetales	
Alcaloides de la vinca:	vincristina vinblastina vindesina vinorelbina
Taxoides:	paclitaxel docetaxol
Inhibidores de la ADN Topoisomerasa	
Epipodofilinas:	etopósido tenipósido topotecán 9-aminocamptotecina camptotecina crisnatol
mitomicinas:	mitomicina C
Anti-metabolitos	
Anti-folatos:	
Inhibidores de DHFR:	metotrexato trimetrexato

Anti-metabolitos	
Inhibidores de la IMP deshidrogenasa:	ácido micofenólico tiazofurina ribavirina EICAR
Inhibidores de la ribonucleótido reductasa:	hidroxiurea deferoxamina
Análogos de pirimidina:	
Análogos de un acilo	5-Fluorouracilo
	floxuridina doxifluridina ratitrexed
Análogos de citosinas	citarabina (ara C) arabinósido de citosina fludarabina
Análogos de purina:	mercaptopurina tioguanina
Terapias hormonales:	
Antagonistas de receptores:	
Antiestrógenos	tamoxifeno raloxifeno megestrol
Agonistas de LHRH:	goserilina acetato de leuprolida
Antiandrógenos:	flutamida bicalutamida
Retinoides/Deltoides	
Análogos de vitamina D3:	EB 1089 CB 1093 KH 1060
Terapias fotodinámicas:	vertoporfina (BPD-MA) ftalocianina fotosensibilizador Pc4 demetoxi-hipocrelina A (2BA-2-DMHA)
Citoquinas:	Interferón- α Interferón- γ factor de necrosis tumoral
Otros:	Gemcitabina Velcade Revamid Talamid
Inhibidores de isoprenilación:	Lovastatina
Neurotoxinas dopaminérgicas:	ión de 1-metil-4-fenilpiridinio
Inhibidores del ciclo celular	estaurosporina
Actinomicinas:	Actinomicina D
	dactinomicina
Bleomicinas:	bleomicina A2 bleomicina B2 peplomicina

Antraciclinas:	daunorrubicina Doxorrubicina (adriamicina) idarrubicina epirubicina
Retinoides/Deltoides	
	pirarubicina zorubicina mtoxantrona
Inhibidores de MDR:	verapamilo
Inhibidores de ATPasa Ca^{2+} :	tapsigargina

4.8.4 TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES

- 5 Los Conjugados a modo de Ejemplo son útiles para eliminar o inhibir la replicación de una célula que produce una enfermedad autoinmune o para tratar una enfermedad autoinmune. Los Conjugados a modo de Ejemplo se pueden usar en consecuencia en diversos entornos para el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un paciente. Los Conjugados Fármaco-Conector-Ligando se pueden usar para administrar un Fármaco a una célula diana. Sin quedar ligado a teoría alguna, en una realización, el Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando se asocia con un antígeno en la superficie de una célula diana, y el Conjugado a modo de Ejemplo se recoge a continuación dentro de una célula
- 10 diana a través de endocitosis mediada por receptores. Una vez dentro de la célula, una, secuencias peptídicas específicas dentro de la unidad de Conector se escinden enzimáticamente o hidrolíticamente, dando como resultado la liberación de un Fármaco. A continuación, el Fármaco liberado es libre para migrar en el citosol e inducir actividades citotóxicas o citostáticas. En una realización alternativa, el Fármaco se escinde del Conjugado a modo de Ejemplo fuera de la célula diana, y el Fármaco penetra posteriormente en la célula.
- 15 En una realización, la unidad de Ligando se une a un antígeno autoinmune. En un aspecto, el antígeno está en la superficie de una célula implicada en una afección autoinmune.
- 20 En otra realización, la unidad de Ligando se une a un antígeno autoinmune que está en la superficie de una célula.
- En una realización, el Ligando se une a linfocitos activados que están asociados con el estado de enfermedad autoinmune.
- 25 En una realización más, los Conjugados a modo de Ejemplo eliminan o inhiben la multiplicación de células que producen un anticuerpo autoinmune asociado con una enfermedad autoinmune en particular.
- Los tipos de enfermedades autoinmunes en particular que se pueden tratar con los Conjugados a modo de Ejemplo incluyen, pero no se limitan a, trastornos relacionados con linfocitos Th2 (*por ejemplo*, dermatitis atópica, asma atópica, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica, y enfermedad de injerto frente a huésped); trastornos relacionados con linfocitos Th1 (*por ejemplo*, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjorgren, tiroiditis de Hashimoto, Enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, y tuberculosis); trastornos relacionados con linfocitos B activados (*por ejemplo*, lupus sistémico eritematoso, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide, y diabetes de tipo I); y las que se desvelan en la Tabla 5.

TABLA 5

Hepatitis Activa Crónica
Enfermedad de Addison
Alveolitis Alérgica
Reacción Alérgica
Rinitis Alérgica
Síndrome de Alport
Anafilaxis
Espondilitis Anquilosante
Síndrome antifosfolípido
Artritis
Ascariasis

Aspergilosis
Alergia Atópica
Dermatitis Atrópica
Rinitis Atrópica
Enfermedad de Behcet
Pulmón de Bird-Fancier
Asma Bronquial
Síndrome de Caplan
Cardiomiopatía
Enfermedad Celíaca
Enfermedad de Chagas
Glomerulonefritis Crónica
Síndrome de Cogan
Enfermedad de Aglutinina Fría
Infección por Rubéola Congénita
Síndrome de CREST
Enfermedad de Crohn
Crioglobulinemia
Síndrome de Cushing
Dermatomiositis
Lupus Discoide
Síndrome de Dressler
Síndrome de Eaton-Lambert
Infección por Ecovirus
Encefalomielitis
Oftalmopatía Endocrina
Infección por Virus Epstein-Barr
Vómitos Equinos
Eritematosi
Síndrome de Evan
Síndrome de Felty
Fibromialgia
Ciclitis de Fuch
Atrofia Gástrica
Alergia Gastrointestinal
Arteritis de Células Gigantes
Glomerulonefritis
Síndrome de Goodpasture
Enfermedad de Injerto frente a Huésped
Enfermedad de Graves
Enfermedad de Guillain-Barre
Tiroiditis de Hashimoto

Anemia Hemolítica
Púrpura de Henoch-Schonlein
Atrofia Adrenal Idiopática
Fibritis Pulmonar Idiopática
Nefropatía de IgA
Enfermedades Intestinales Inflamatorias
Diabetes Mellitus dependiente de Insulina
Artritis Juvenil
Diabetes Mellitus Juvenil (Tipo I)
Síndrome de Lambert-Eaton
Laminitis
Liquen Plano
Hepatitis Lupoides
Lupus
Linfopenia
Enfermedad de Meniere
Enfermedad de Tejido Conectivo Mixto
Esclerosis Múltiple
Miastenia Gravis
Anemia Perniciosa
Síndromes Poliglandulares
Demencia Presenil
Agammaglobulinemia Primaria
Cirrosis Biliar Primaria
Psoriasis
Artritis Psoriática
Fenómeno de Raynauds
Aborto Recurrente
Síndrome de Reiter
Fiebre Reumática
Artritis Reumatoide
Síndrome de Sampter
esquistosomiasis
Síndrome de Schmidt
Esclerodermia
Síndrome de Shulman
Síndrome de Sjorgen
Síndrome de Stiff-Man
Oftalmia Simpática
Lupus Sistémico Eritematoso
Arteritis de Takayasu
Arteritis Temporal

Tiroiditis
 Trombocitopenia
 Tirototoxicosis
 Necrólisis Epidérmica Tóxica
 Resistencia a Insulina de Tipo B
 Diabetes Mellitus de Tipo I
 Colitis Ulcerosa
 Uveítis
 Vitíligo
 Macroglobulemia de Waldenstrom
 Granulomatosis de Wegener

4.8.5 TERAPIA CON MÚLTIPLES FÁRMACOS DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES

- 5 Además, se desvelan métodos para tratar una enfermedad autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado a modo de Ejemplo y otro agente terapéutico conocido para el tratamiento de una enfermedad autoinmune. En una realización, the anti-enfermedad autoinmune incluye, pero no se limita a, los agentes que se enumeran en la Tabla 6.

Tabla 6

ciclosporina
 ciclosporina A
 micofenilato mofetilo
 sirolimus
 tacrolimus
 enanercept
 prednisona
 azatioprina
 metotrexato ciclofosfamida
 prednisona
 ácido aminocaproico
 cloroquina
 hidroxiclороquina
 hidro cortisona
 dexametasona
 clorambucilo
 DHEA
 danazol
 bromocriptina
 meloxicam
 infliximab

10 4.8.6 TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Los Conjugados a modo de Ejemplo son útiles para eliminar o inhibir la multiplicación de una célula que produce una enfermedad infecciosa o para tratar una enfermedad infecciosa. Los Conjugados a modo de Ejemplo se pueden usar en consecuencia en diversos entornos para el tratamiento de una enfermedad infecciosa en un paciente. Los

Conjugados Fármaco-Conector-Ligando se pueden usar para administrar un Fármaco a una célula diana. En una realización, la unidad de Ligando se une a la célula de la enfermedad infecciosa.

5 En una realización, los Conjugados eliminan o inhiben la multiplicación de células que producen una enfermedad infecciosa en particular.

Los tipos de enfermedades infecciosas en particular que se pueden tratar con los Conjugados a modo de Ejemplo incluyen, pero no se limitan a, las que se desvelan en la Tabla 7.

10

TABLA 7

Enfermedades Bacterianas:

Difteria
 Pertussis
 Bacteremia Oculta
 Infección del Tracto Urinario
 Gastroenteritis
 Celulitis
 Epiglotitis
 Traqueitis
 Hipertrofia Adenoide
 Absceso Retrofaríngeo
 Impétigo
 Ectima
 Neumonía
 Endocarditis
 Artritis Séptica
 Pneumococos
 Peritonitis
 Bacteremia
 Meningitis
 Meningitis Purulenta Aguda
 Uretritis
 Cervicitis
 Proctitis
 Faringitis
 Salpingitis
 Epididimitis
 Gonorrea
 Sífilis
 Listeriosis
 Ántrax
 Nocardiosis
 Salmonella
 Fiebre tifoidea
 Disentería
 Conjuntivitis

Enfermedades Bacterianas:

- Sinusitis
- Brucelosis
- Tularemia
- Cólera
- Plaga Bubónica
- Tétano
- Enteritis Necrotizante
- Actinomicosis
- Infecciones Anaerobias Mixtas
- Sífilis
- Fiebre Recurrente
- Leptospirosis
- Enfermedad de Lyme
- Fiebre por Mordedura de Rata
- Tuberculosis
- Linfadenitis
- Lepra
- Clamidia
- Neumonía por Clamidia
- Tracoma
- Conjuntivitis por Inclusión

Enfermedades Fúngicas Sistémicas:

- Histoplasmosis
- Coccidioidomicosis
- Blastomicosis
- Esporotricosis
- Criptococosis
- Candidiasis Sistémica
- Aspergilosis
- Mucormicosis
- Micetoma
- Cromomicosis

Enfermedades por Rickettsia:

- Tifus
- Fiebre Maculada de las Montañas Rocosas
- Ehrlichiosis
- Rickettsiosis Oriental Transmitida por Garrapatas
- Rickettsiosis pustulosa

Enfermedades por Rickettsia:

Fiebre Q
Bartonelosis

Enfermedades Parasitarias:

Malaria
Babesiosis
Tripanosomiasis Africana
Enfermedad de Chagas
Leishmaniasis
Fiebre Dum-Dum
Toxoplasmosis
Meningoencefalitis
Queratitis
Entamebiasis
Giardiasis
Criptosporidiasis
Isosporiasis
Ciclosporiasis
Microsporidiosis
Ascariasis
Infección por Tricocéfalos
Infección por Anquilostomas
Infección por Lombrices
Larva Migrans Ocular
Triquinosis
Enfermedad del Gusano de Guinea
Filariasis Linfática
Loiasis
Oncocercosis
Infección Canina del Gusano del corazón
Esquistosomiasis
Urticaria del Nadador
Trematodo Oriental de Pulmón
Trematodo Oriental de Hígado
Fascioliasis
Fasciolopsiasis
Opistorquiasis
Infecciones por Tenia
Enfermedad Hidatídica
Enfermedad Hidatídica Alveolar

Enfermedades Víricas:

Sarampión
Panencefalitis esclerosante subaguda
Resfriado Común
Paperas
Rubeola
Roseola
Quinta Enfermedad
Varicela
Infección por el virus sincitial respiratorio
Crup
Bronquiolitis
Mononucleosis infecciosa
Poliomielitis
Herpangina
Enfermedad de manos, pies y boca
Enfermedad de Bornholm
Herpes Genital
Verrugas Genitales
Meningitis Aséptica
Miocarditis
Pericarditis
Gastroenteritis
Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)
Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)
Síndrome de Reye
Síndrome de Kawasaki
Gripe
Bronquitis
Neumonía Vírica del "Caminante"
Enfermedad Respiratoria Febril Aguda
Fiebre faringoconjuntiva aguda
Queratoconjuntivitis Epidémica
Virus del Herpes Simplex 1 (VHS-1)
Virus del Herpes Simplex 2 (VHS-2)
Herpes
Enfermedad Citomegálica de Inclusión
Rabia
Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva
Kuru
Insomnio Familiar Fatal

Enfermedades Víricas:

Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
 Enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker
 Paraparesis Espástica Tropical
 Encefalitis Equina Occidental
 Encefalitis de California
 Encefalitis de St. Louis
 Fiebre Amarilla
 Dengue
 Coriomeningitis Linfocítica
 Fiebre de Lassa
 Fiebre Hemorrágica
 Síndrome Pulmonar por Hantvirus
 Infecciones por el Virus de Marburg
 Infecciones por el Virus del Ébola
 Viruela

4.8.7 TERAPIA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS CON MÚLTIPLES FÁRMACOS

- 5 Se desvelan métodos para tratar una enfermedad infecciosa que incluyen administrar a un paciente que lo necesita un Conjugado a modo de Ejemplo y otro agente terapéutico que es un agente anti-enfermedad infecciosa. En una realización, el agente anti-enfermedad infecciosa es, pero no se limitan a, los agentes que se enumeran en la Tabla 8.

TABLA 8

Antibióticos de β -Lactama:

Penicilina G
 Penicilina V
 Cloxacilina
 Dicloxacilina
 Meticilina
 Nafcilina
 Oxacilina
 Ampicilina
 Amoxicilina
 Bacampicilina
 Azlocilina
 Carbenicilina
 Mezlocilina
 Piperacilina
 Ticarcilina

Aminoglicósidos:

Amicacina
Gentamicina
Kanamicina
Neomicina
Netilmicina
Streptomicina
Tobramicina

Macrólidos:

Azitromicina
Claritromicina
Eritromicina
Lincomicina
Clindamicina

Tetraciclinas:

Demeclociclina
Doxiciclina
Minociclina
Oxitetraciclina
Tetraciclina

Quinolonas:

Cinoxacina
Ácido Nalidíxico

Fluoroquinolonas:

Ciprofloxacina
Enoxacina
Grepafloxacina
Levofloxacina
Lomefloxacina
Norfloxacina
Ofloxacina
Sparfloxacina
Trovafloracina

Polipéptidos:

Bacitracina
Colistina
Polimixina B

Sulfonamidas:

Sulfisoxazol
Sulfametoxazol
Sulfadiazina
Sulfametizol
Sulfacetamida

Diversos Agentes Antibacterianos:

Trimetoprim
Sulfametazol
Cloramfenicol
Vancomicina
Metronidazol
Quinupristina
Dalfopristina
Rifampina
Espectinomicina
Nitrofurantoína

Agentes Antivirales:

Agentes Antivirales Generales:

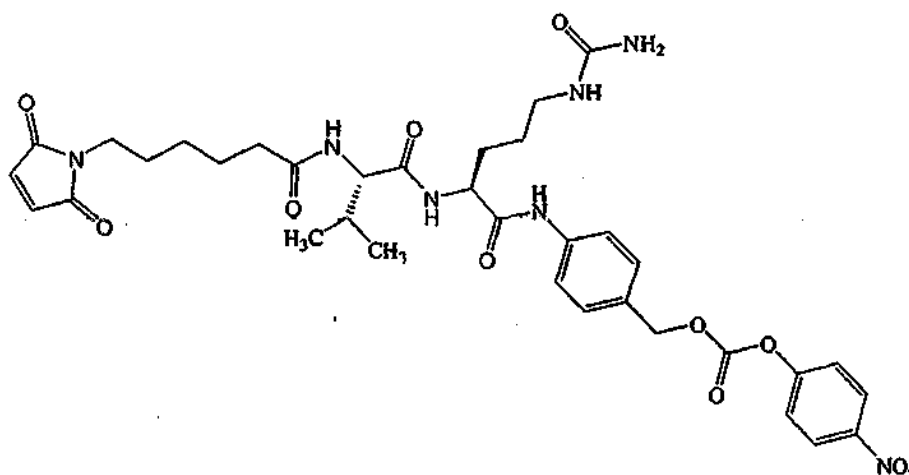
Idoxuradina
Vidarabina
Trifluridina
Aciclovir
Fanciciclovir
Penciciclovir
Valaciclovir
Ganciciclovir
Foscarnet
Ribavirina
Amantadina
Rimantadina
Cidofovir
Oligonucleótidos Antisentido
Inmunoglobulinas
Inteferones

Fármacos para infección por VIH

Tenofovir
Emtricitabina
Zidovudina
Didanosina
Zalcitabina
Estavudina
Lamivudina
Nevirapina
Delavirdina
Saquinavir
Ritonavir
Indinavir
Nelfinavir

5. Ejemplos

Ejemplo 1 - Preparación del compuesto AB

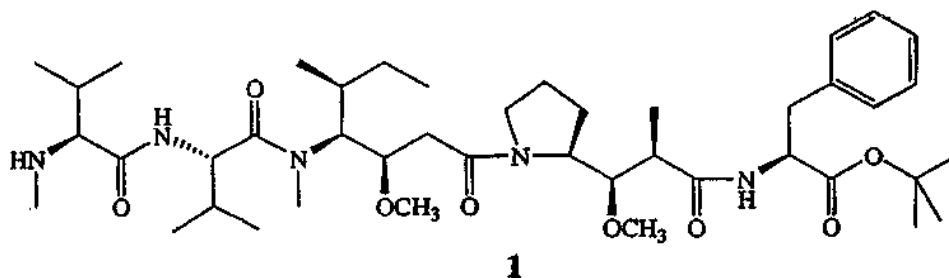
**AB**

Fmoc-val-cit-PAB-OH (14,61 g, 24,3 mmol, 1,0 equiv., Patente de Estados Unidos N° 6214345 de Firestone et al.) se diluyó con DMF (120 ml, 0,2 M) y a esta solución se añadió a dietilamina (60 ml). La reacción se controló por HPLC y se encontró que estaba completa en 2 h. La mezcla de reacción se concentró y el resto resultante se precipitó usando acetato de etilo (aprox. 100 ml) con sonicación durante 10 min. Se añadió éter (200 ml) y el precipitado se sonicó adicionalmente durante 5 min. La solución se dejó en reposo durante 30 min. sin agitación y a continuación se filtró y se secó a alto vacío para proporcionar Val-cit-PAB-OH, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento: 8,84 g (96 %). Val-cit-PAB-OH (8,0 g, 21 mmol) se diluyó con DMF (110 ml) y la solución resultante se trató con MC-OSu (Willner *et al.*, (1993) Bioconjugate Chem. 4: 521; 6,5 g, 21 mmol, 1,0 equiv.). La reacción era completa de acuerdo con HPLC después de 2 h. La mezcla de reacción se concentró y el aceite resultante se precipitó usando acetato de etilo (50 ml). Después de sonicar durante 15 min, se añadió éter (400 ml) y la mezcla se sonicó adicionalmente hasta que todas las partículas grandes se separaron. La solución se filtró a continuación y el sólido se secó para proporcionar un sólido intermedio de color blanquecino. Rendimiento: 11,63 g (96 %); ES-MS m/z 757,9 [M-H]

Fmoc-val-cit-PAB-OH (14,61 g, 24,3 mmol, 1,0 equiv., Patente de Estados Unidos N° 6214345 de Firestone et al.) se diluyó con DMF (120 ml, 0,2 M) y a esta solución se añadió a dietilamina (60 ml). La reacción se controló por HPLC y se encontró que estaba completa en 2 h. La mezcla de reacción se concentró y el resto resultante se precipitó usando acetato de etilo (aprox. 100 ml) con sonicación durante 10 min. Se añadió éter (200 ml) y el precipitado se sonicó adicionalmente durante 5 min. La solución se dejó en reposo durante 30 min. sin agitación y a continuación se filtró y se secó a alto vacío para proporcionar Val-cit-PAB-OH, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento: 8,84 g (96 %). Val-cit-PAB-OH (8,0 g, 21 mmol) se diluyó con DMF (110 ml) y la solución resultante se trató con MC-OSu (Willner *et al.*, (1993) Bioconjugate Chem. 4: 521; 6,5 g, 21 mmol, 1,0 equiv.). La reacción era completa de acuerdo con HPLC después de 2 h. La mezcla de reacción se concentró y el aceite resultante se precipitó usando acetato de etilo (50 ml). Después de sonicar durante 15 min, se añadió éter (400 ml) y la mezcla se sonicó adicionalmente hasta que todas las partículas grandes se separaron. La solución se filtró a continuación y el sólido se secó para proporcionar un sólido intermedio de color blanquecino. Rendimiento: 11,63 g (96 %); ES-MS m/z 757,9 [M-H].

El sólido intermedio de color blanquecino (8,0 g, 14,0 mmol) se diluyó con DMF (120 ml, 0,12 M) y a la solución resultante se añadió bis(4-nitrofenil)carbonato (8,5 g, 28,0 mmol, 2,0 equiv.) y DIEA (3,66 ml, 21,0 mmol, 1,5 equiv.). La reacción se completó en 1 h de acuerdo con HPLC. La mezcla de reacción se concentró para proporcionar un aceite que se precipitó con EtOAc, y a continuación se trituró con EtOAc (aprox. 25 ml). El soluto se precipitó adicionalmente con éter (aprox. 200 ml) y se trituró durante 15 min. El sólido se filtró y se secó a alto vacío para proporcionar el Compuesto **AB** que era puro en un 93 % de acuerdo con HPLC y se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento: 9,7 g (94 %).

Ejemplo 2 - Preparación del compuesto 1



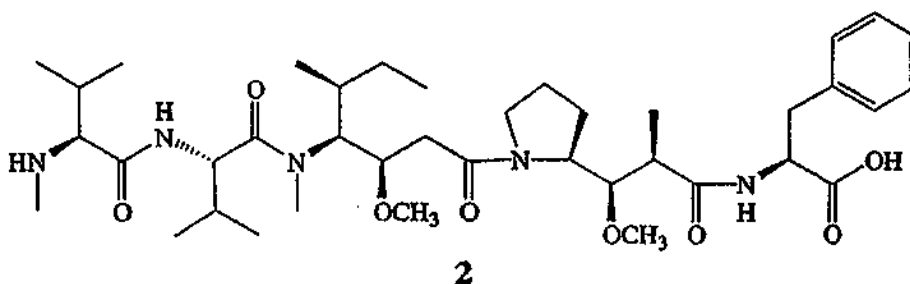
Sal de HCl del éster *t*-butilico de fenilalanina (868 mg, 3 mmol), *N*-Boc-Dolaproína (668 mg, 1 equiv.), DEPC (820 μ l, 1,5 equiv.), y DIEA (1,2 ml) se diluyeron con diclorometano (3 ml). Después de 2 horas (h) a temperatura ambiente (aproximadamente 28 grados Celsius), la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (20 ml), se lavó sucesivamente con NaHCO_3 acuoso (ac.) saturado (2 x 10 ml), NaCl ac. saturado (2 x 10 ml). La fase orgánica se separó y se concentró. El resto resultante se volvió suspender en acetato de etilo y se purificó por cromatografía ultrarrápida en acetato de etilo. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el dipéptido en forma de un sólido de color blanco: 684 mg (46 %). ES-MS m/z 491,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Para escisión selectiva de Boc en presencia de éster de *t*-butilo, el dipéptido anterior (500 mg, 1,28 mmol) se diluyó con dioxano (2 ml). Se añadió HCl 4 M/dioxano (960 μ l, 3 equiv.), y la mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Se observó desprotección de Boc casi completa por RP-HPLC con una cantidad mínima de escisión del éster de *t*-butilo. La mezcla se enfrió en un baño de hielo, y se añadió trietilamina (500 μ l). Después de 10 min, la mezcla se retiró del baño de enfriamiento, se diluyó con diclorometano (20 ml), se lavó sucesivamente con NaHCO_3 ac. saturado (2 x 10 ml), NaCl ac. saturado (2 x 10 ml). La fase orgánica se concentró para dar una espuma de color amarillo: 287 mg (57 %). El compuesto intermedio se usó sin purificación adicional.

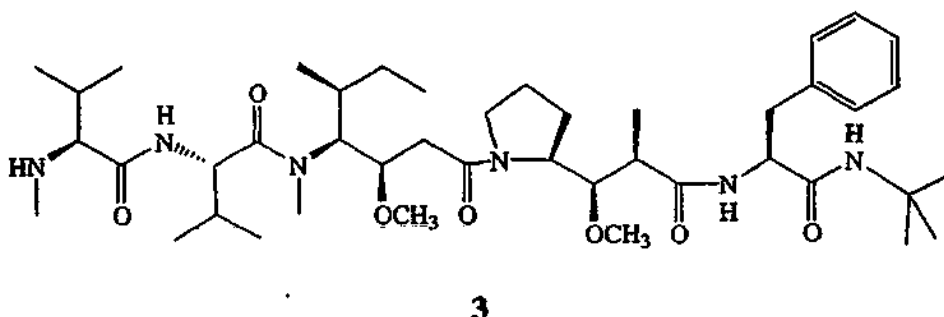
El tripéptido Fmoc-Meal-val-dil-*O*-*t*-Bu (preparado tal como se describe en el documento WO 02/088172, titulado "Pentapeptide Compounds and Uses Related Thereto"; 0,73 mmol) se trató con TFA (3 ml), diclorometano (3 ml) durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a sequedad, el resto se co-evaporó con tolueno (3 x 20 ml), se secó al vacío durante una noche. El resto se diluyó con diclorometano (5 ml) y se añadió dipéptido desprotegido (287 mg, 0,73 mmol), seguido de DIEA (550 μ l, 4 equiv.), DEPC (201 μ l, 1,1 equiv.). Después de 2 h a temperatura ambiente la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (50 ml), se lavó sucesivamente con ácido cítrico ac. al 10 % (2 x 20 ml), NaHCO_3 ac. saturado (2 x 10 ml), NaCl ac. saturado (10 ml). La fase orgánica se separó y se concentró. El resto resultante se volvió a suspender en acetato de etilo y se purificó por cromatografía ultrarrápida en acetato de etilo. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar Fmoc-Meal-val-dil-dap-phe-*O*-*t*-Bu en forma de un sólido de color blanco: 533 mg (71 %). R_f 0.4 (EtOAc). ES-MS m/z 1010,6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

El producto (200 mg, 0,2 mmol) se diluyó con diclorometano (3 ml), dietilamina (1 ml). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Los disolventes se retiraron para proporcionar un aceite que se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice en un gradiente de la etapa de MeOH al 0-10 % en diclorometano para proporcionar el Compuesto 1 en forma de un sólido de color blanco: 137 mg (87 %). R_f 0,3 (MeOWCH₂Cl₂ al 10 %). ES-MS m/z 788,6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ejemplo 3 - Preparación del compuesto 2



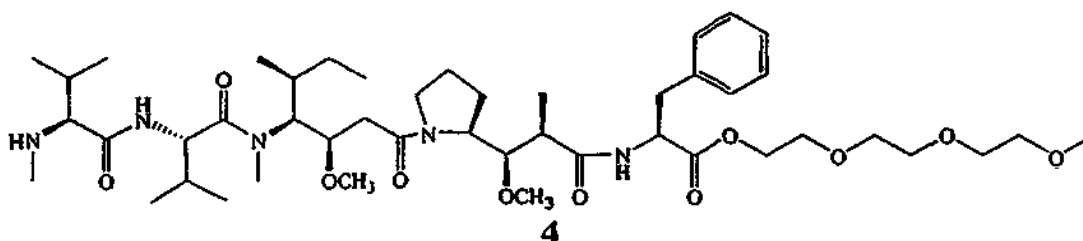
El compuesto 2 se preparó a partir del compuesto 1 (30 mg, 0,038 mmol) por tratamiento con HCl 4 M/dioxano (4 ml) durante 7 h a temperatura ambiente. El disolvente se retiró, y el resto se secó al vacío durante una noche para proporcionar el Compuesto 2 en forma de un sólido higroscópico de color blanco: 35 mg (120 % calculado para sal de HCl). ES-MS m/z 732,56 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Ejemplo 4 - Preparación del compuesto 3

- 5 Fmoc-Meal-val-dil-dap-phe-O-*t*-Bu (Ejemplo 2, 50 mg) se trató con HCl 4 M/dioxano (4 ml) durante 16 h a temperatura ambiente. El disolvente se retiró, y el resto se secó al vacío durante una noche para dar 50 mg de un sólido intermedio higroscópico de color blanco.

10 El sólido intermedio de color blanco (20 mg, 0,02 mmol) se diluyó con diclorometano (1 ml); se añadió DEPC (5 μ l, 0,03 mmol, 1,5 equiv.) seguido de DIEA (11 μ l, 0,06 mmol, 3 equiv.), y *t*-butilamina (3,2 μ l, 0,03 mmol, 1,5 equiv.). Después de 2 h a temperatura ambiente, se encontró que la reacción era completa por RP-HPLC. Se añadió más DEPC (10 μ l) y *t*-butilamina (5 μ l) y la reacción se agitó durante un periodo adicional de 4 h. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (15 ml), se lavó sucesivamente con agua (5 ml), HCl ac. 0,1 M (10 ml), NaCl ac. saturado (10 ml). La fase orgánica se separó y se concentró. El resto resultante se diluyó con diclorometano y se purificó por cromatografía ultrarrápida en un gradiente de etapa de MeOH al 0-5 % en diclorometano. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el compuesto intermedio protegido con Fmoc en forma de un sólido de color blanco: 7,3 mg (36 %). R_f 0,75 (Me-OH al 10 % /CH₂Cl₂).

20 El compuesto intermedio protegido con Fmoc se diluyó con diclorometano (0,5 ml) y se trató con dietilamina (0,5 ml) durante 3 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a sequedad. El producto se aisló por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice en un gradiente de etapa de MeOH al 0-10 % en diclorometano para proporcionar el Compuesto **3** en forma de un sólido de color blanco: 4 mg (70 %). R_f 0,2 (MeOH al 10 %/CH₂Cl₂). ES-MS m/z 787 [M+H]⁺, 809 [M+Na]⁺.

Ejemplo 5 - Preparación del compuesto 4

30 Boc-L-Fenilalanina (265 mg, 1 mmol, 1 equiv.) y éter monometílico de trietilenglicol (164 μ l, 1 mmol, 1 equiv.) se diluyeron con diclorometano (5 ml). A continuación, se añadió DCC (412 mg, 2 mmol, 2 equiv.), seguido de DMAP (10 mg). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El precipitado se retiró por filtración. El disolvente se retiró al vacío, el resto se diluyó con acetato de etilo, y se purificó por gel de sílice cromatografía ultrarrápida en acetato de etilo. Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron, y se secaron al vacío para dar un sólido de color blanco: 377 mg (91 %). R_f 0,5 (EtOAc). ES-MS m/z 434 [M+Na]⁺.

La retirada del grupo protector Boc se realizó por tratamiento del material anterior en dioxano (10 ml) con HCl 4 M/dioxano (6 ml) durante 6 h a temperatura ambiente. El disolvente se retiró al vacío, el resto se secó al vacío para dar un sólido de color blanco.

40 La sal de HCl del éster del éter monometílico de Fenilalanina-trietilenglicol (236 mg, 0,458 mmol, 1 equiv.) y N-Boc-Dolaproína (158 mg, 0,55 mmol, 1,2 equiv.) se diluyeron con diclorometano (3 ml). DEPC (125 μ l, 1,5 equiv.) y se añadió a la mezcla seguido de DIEA (250 μ l, 3 equiv.). Después de 2 h a temperatura ambiente la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (30 ml), se lavó sucesivamente con NaHCO₃ ac. saturado (2 x 10 ml), ácido cítrico ac. al 10 % (2 x 10 ml), NaCl ac. saturado (10 ml). La fase orgánica se separó y se concentró. El resto resultante se volvió suspender en acetato de etilo y se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice en

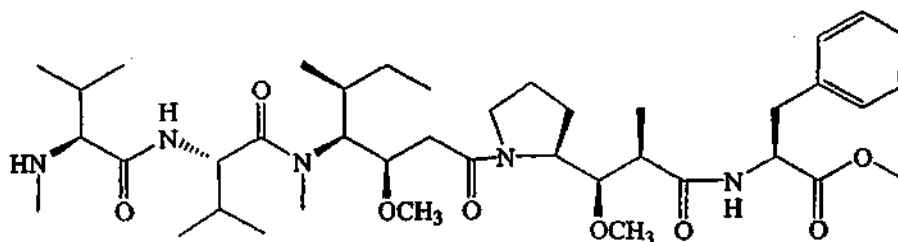
acetato de etilo. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar una espuma intermedia de color blanco: 131 mg (50 %). R_f 0,25 (EtOAc). ES-MS m/z 581,3 $[M+H]^+$.

La desprotección de Boc se realizó en diclorometano (2 ml), TFA (0,5 ml) a temperatura ambiente durante 2 h. El disolvente se retiró al vacío, y el resto co-evaporó con tolueno (3 x 25 ml), después se secó al vacío para dar 138 mg de sal de TFA de dipéptido.

Fmoc-Meal-val-dil-OH (Ejemplo 2, 147 mg, 0,23 mmol, 1 equiv.), y sal de TFA de dipéptido (138 mg) se diluyeron con diclorometano (2 ml). A la mezcla se añadió DEPC (63 μ l, 1,5 equiv.), seguido de DIEA (160 μ l, 4 equiv.). Después de 2 h a temperatura ambiente la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (30 ml), se lavó sucesivamente con ácido cítrico ac. al 10 % (2 x 20 ml), NaCl ac. saturado (20 ml). La fase orgánica se separó y se concentró. El resto resultante se volvió a suspender en diclorometano y se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice en un gradiente de etapa de MeOH al 0-5 % en diclorometano. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar una espuma de color blanco: 205 mg (81 %). R_f 0,4 (MeOH al 10 %/ CH_2Cl_2). ES-MS m/z 1100,6 $[M+H]^+$, 1122,4 $[M+Na]^+$.

El grupo protector Fmoc se retiró por tratamiento con dietilamina (2 ml) en diclorometano (6 ml). Después de 6 h a temperatura ambiente, el disolvente se retiró al vacío, el producto se aisló por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice en un gradiente de etapa de MeOH al 0-10 % en diclorometano. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron. Después de la evaporación de diclorometano/hexano, 1:1, se obtuvo el Compuesto 4 en forma de una espuma de color blanco: 133 mg (80 %). R_f 0,15 (MeOH al 10 %/ CH_2Cl_2). ES-MS m/z 878,6 $[M+H]^+$.

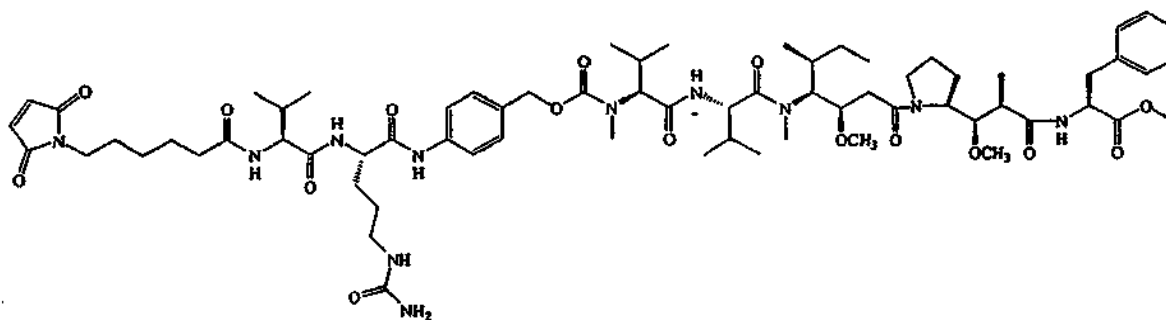
Ejemplo 6 - Preparación del compuesto 5



Fmoc-Meal-val-dil-OH (Ejemplo 2, 0,50 g, 0,78 mmol) y dap-phe-OMe-HCl (0,3 g, 0,78 mmol, preparado de acuerdo con Pettit, G.R., et al. Anti-Cancer Drug Design 1998, 13, 243-277) se disolvieron en CH_2Cl_2 (10 ml) seguido de la adición de diisopropiletilamina (0,30 ml, 1,71 mmol, 2,2 equiv.). Se añadió DEPC (0,20 ml, 1,17, 1,5 equiv.) y los contenidos se mantuvieron en Ar. La reacción era completa de acuerdo con HPLC en 1 h. La mezcla se concentró hasta un aceite y se purificó por cromatografía en SiO_2 (columna de 300 x 25 mm) y se eluyó con EtOAc al 100 %. El producto se aisló en forma de un sólido espumoso de color blanco. Rendimiento: 0,65 g (87 %). ES-MS m/z 968,35 $[M+H]^+$, 991,34 $[M+Na]^+$; $\lambda_{m\acute{a}x}$ de UV 215, 265 nm.

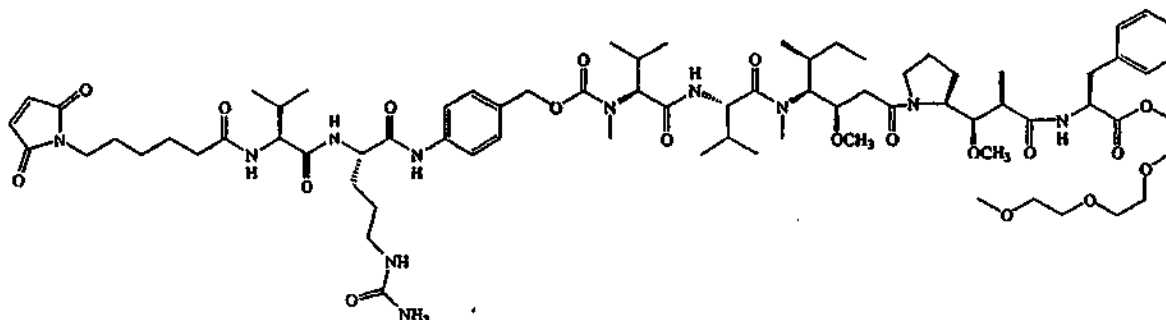
El péptido protegido con Fmoc (0,14 g, 0,14 mmol) en cloruro de metileno (5 ml) se trató con dietilamina (2 ml) y los contenidos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción, completa por HPLC, se concentró hasta un aceite, se recogió en 2 ml de DMSO y se inyectó en una HPLC preparativa (columna C_{12} -RP, 5 μ , 100 Å, gradiente lineal de MeCN en agua (que contenía TFA al 0,1 %) del 10 al 100 % en 40 min seguido de 20 min al 100 %, a un caudal de 25 ml/min). las fracciones que contenían el producto se evaporaron para proporcionar un polvo de color blanco para la sal de trifluoroacetato. Rendimiento: 0,126 g (98 %). R_f 0,28 (EtOAc al 100 %); ES-MS m/z 746,59 $[M+H]^+$, 768,51 $[M+Na]^+$; $\lambda_{m\acute{a}x}$ de UV 215 nm.

Ejemplo 7 - Preparación del compuesto 6

**6**

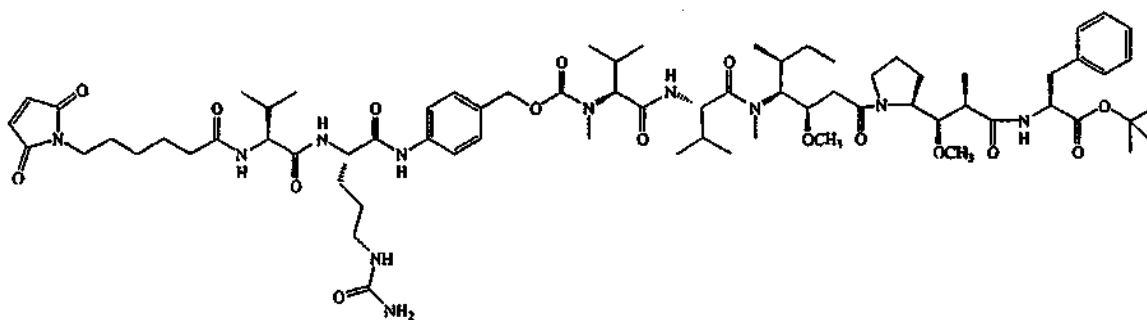
La sal de trifluoroacetato del Compuesto 5 (0,11 g, 0,13 mmol), Compuesto **AB** (0,103 g, 0,14 mmol, 1,1 equiv.) y HOBt (3,4 mg, 26 μ mol, 0,2 equiv.) se suspendieron en DMF/piridina (2 ml/0,5 ml, respectivamente). Se añadió diisopropiletilamina (22,5 μ l, 0,13 mmol, 1,0 equiv.) y la solución de color amarillo se agitó en una atmósfera de argón. Después de 3 h, se añadió una cantidad adicional de 1,0 equiv. de DIEA. 24 horas más tarde, se incluyeron 0,5 equiv. del conector activado en la mezcla de reacción. Después de 40 h totales, la reacción se completó. Los contenidos se evaporaron, se recogieron en DMSO y se inyectaron en una HPLC preparativa (columna C₁₂-RP, 5 μ , 100 Å, gradiente lineal de MeCN en agua (que contenía TFA al 0,1 %) del 10 al 100 % en 40 min seguido de 20 min al 100 %, a un caudal de 50 ml/min). Las fracciones deseadas se evaporaron para dar el producto en forma de un aceite de color amarillo. Se añadieron cloruro de metileno (aprox. 2 ml) y éter en exceso para proporcionar el Compuesto **6** en forma de un precipitado de color blanco que se filtró y se secó. Rendimiento: 90 mg (52 %). ES-MS m/z 1344,32 [M+H]⁺, 1366,29 [M+Na]⁺; $\lambda_{\text{máx}}$ de UV 215,248 nm.

Ejemplo 8 - Preparación del compuesto 7

**7**

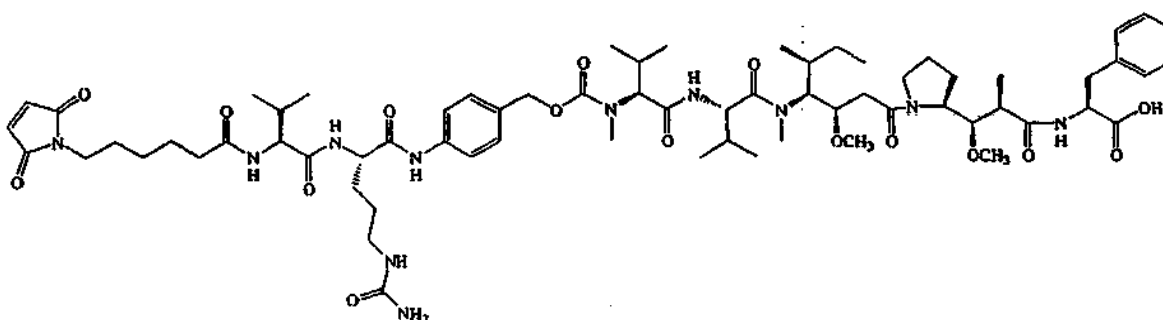
El Compuesto **4** (133 mg, 0,15 mmol, 1 equiv.), Compuesto **AB**, (123 mg, 0,167 mmol, 1,1 equiv.), y HOBt (4 mg, 0,2 equiv.) se diluyeron con DMF (1,5 ml). Después de 2 min, se añadió piridina (5 ml) y la reacción se controló usando RP-HPLC. La reacción mostró que estaba completa en 18 h. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (20 ml), se lavó sucesivamente con ácido cítrico ac. al 10 % (2 x 10 ml), agua (10 ml), NaCl ac. saturado (10 ml). La fase orgánica se separó y se concentró. El resto resultante se volvió a suspender en diclorometano y se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice en un gradiente de etapa de MeOH al 0-10 % en diclorometano. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el Compuesto 7 en forma de una espuma de color blanco: 46 mg (21 %). R_f 0,15 (MeOH al 10 %/CH₂Cl₂). ES-MS m/z 1476,94 [M+H]⁺.

Ejemplo 9 - Preparación del éster t-butílico de MC-Val-Cit-PAB-MMAF 8

**8**

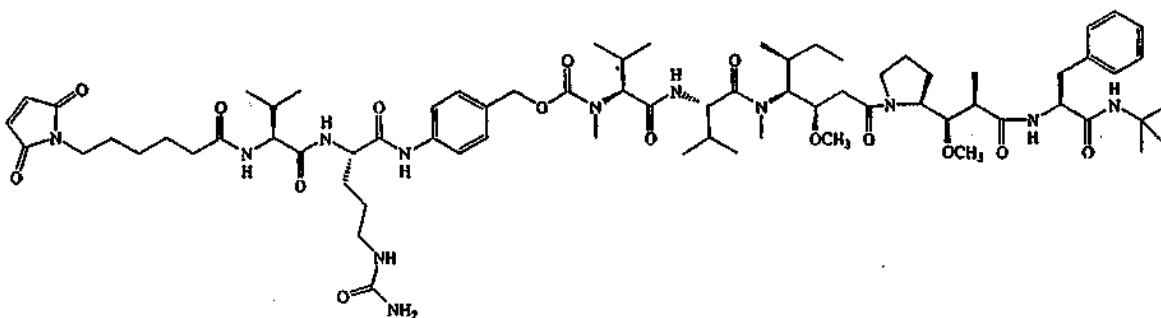
El Compuesto **1** (83 mg, 0,11 mmol), Compuesto **AB** (85 mg, 0,12 mmol, 1,1 equiv.), y HOBt (2,8 mg, 21 μ mol, 0,2 equiv.) se recogieron en DMF seca (1,5 ml) y piridina (0,3 ml) en una atmósfera de argón. Después de 30 h, se encontró que la reacción está básicamente completa por HPLC. La mezcla se evaporó, se recogió en una cantidad mínima de DMSO y se purificó por HPLC preparativa (columna C₁₂-RP, 5 μ , 100 Å, gradiente lineal de MeCN en agua (que contenía TFA al 0,1 %) del 10 al 100 % en 40 min seguido de 20 min al 100 %, a un caudal de 25 ml/min) para proporcionar el Compuesto **8** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 103 mg (71 %). ES-MS m/z 1387,06 [M+H]⁺, 1409,04 [M+Na]⁺; $\lambda_{\text{máx}}$ de UV 205, 248 nm.

Ejemplo 10 - Preparación de MC-val-cit-PAB-MMAF **9**

**9**

El Compuesto **8** (45 mg, 32 μ mol) se suspendió en cloruro de metileno (6 ml) seguido de la adición de TFA (3 ml). La solución resultante se mantuvo durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se purificó por HPLC preparativa (columna C₁₂-RP, 5 μ , 100 Å, gradiente lineal de MeCN en agua (que contenía TFA al 0,1 %) del 10 al 100 % en 40 min seguido de 20 min al 100 %, a un caudal de 25 ml/min). Las fracciones deseadas se concentraron para proporcionar maleimidocaproil-valina-citrulina-p-hidroximetilaminobenceno-MMAF (MC-val-cit-PAB-MMAF) **9** en forma de un sólido de color blanquecino. Rendimiento: 11 mg (25 %). ES-MS m/z 1330,29 [M+H]⁺, 1352,24 [M+Na]⁺; $\lambda_{\text{máx}}$ de UV 205, 248 nm.

Ejemplo 11 - Preparación de MC-val-cit-PAB-MMAF terc-butil amida **10**

**10**

El Compuesto **3** (217 mg, 0,276 mmol, 1,0 equiv.), Compuesto **AB** (204 mg, 0,276 mmol, 1,0 equiv.), y HOBt (11 mg, 0,0828 mmol, 0.3 equiv.) se diluyeron con piridina/DMF (6 ml). A esta mezcla se añadió DIEA (0,048 ml), y la mezcla se agitó durante aproximadamente 16 h. los compuestos orgánicos volátiles se evaporaron al vacío. El resto en bruto se purificó por Chromatotron® (cromatografía en capa fina radial) con un gradiente de etapa (metanol al 0-5-10 % en DCM) para proporcionar MC-val-cit-PAB-MMAF terc-butil amida **10**. Rendimiento: 172 mg (45 %); ES-MS m/z 1386,33 [M+H]⁺, 1408,36 [M+Na]⁺; $\lambda_{\text{máx}}$ de UV 215, 248 nm.

Ejemplo 12 - Preparación de AC10-MC-MMAE por conjugación de AC10 y MC-MMAE

AC10, disuelto en borato sódico 500 mM y cloruro sódico 500 mM a pH 8,0 se trata con un exceso de ditiotreitól 100 mM (DTT). Después de incubación a 37 °C durante aproximadamente 30 minutos, el tampón se intercambia por elución sobre resina de Sephadex G25 y se eluyó con PBS con DTPA 1 mM. El valor de tiol/Ab se comprueba 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 por reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido disuelto en PBS se enfría en hielo.

El reactivo de conector de fármaco, maleimidocaproil-monometil auristatina E, es decir MC-MMAE, disuelto en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua a una concentración conocida, y se añade al anticuerpo reducido enfriado AC10 en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para inactivar la reacción y proteger cualquier grupo tiol del anticuerpo sin reaccionar. La mezcla de reacción se concentra mediante un tipo de ultrafiltración en centrífuga y AC10-MC-MMAE se purifica y se desala por 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.

Ejemplo 13 - Preparación de AC10-MC-MMAF por conjugación de AC10 y MC-MMAF

AC10-MC-MMAF se preparó por conjugación de AC10 y MC-MMAF siguiendo el procedimiento del Ejemplo 12.

Ejemplo 14 - Preparación de AC10-MC-val-cit-PAB-MMAE por conjugación de AC10 y MC-val-cit-PAB-MMAE

AC10-MC-val-cit-PAB-MMAE se preparó por conjugación de AC10 y MC-val-cit-PAB-MMAE siguiendo el procedimiento del Ejemplo 12.

Ejemplo 15 - Preparación de AC10-MC-val-cit-PAB-MMAF por conjugación de AC10 y MC-val-cit-PAB-MMAF (9)

AC10-MC-val-cit-PAB-MMAF se preparó por conjugación de AC10 y MC-val-cit-PAB-MMAF (9) siguiendo el procedimiento del Ejemplo 12.

Ejemplo 16 – Determinación de citotoxicidad de compuestos seleccionados

La actividad de citotoxicidad de MMAF y los Compuestos **1-5** se evaluaron en las líneas celulares OVCAR-3 positivas para Lewis Y, las líneas celulares positivas para Lewis Y de carcinoma de mama H3396, carcinoma de pulmón L2987 y carcinoma de colon LS174t se puede someter al ensayo para la citotoxicidad. Para evaluar la citotoxicidad de los Compuestos **1-5**, se puede sembrar células a aproximadamente 5 – 10.000 por pocillo en 150 μl de medio de cultivo tratado a continuación con dosis graduadas de los Compuestos **1-5** por cuadruplicado al comienzo del ensayo. Los ensayos de citotoxicidad normalmente se realizan durante 96 horas después de la adición de los compuestos de ensayo. Cincuenta μl de colorante de resazurina se pueden añadir a cada pocillo durante las últimas 4 a 6 horas de la incubación para evaluar las células viables al final del cultivo. La reducción del colorante se puede determinar mediante espectrometría de fluorescencia usando las longitudes de onda de excitación y de emisión de 535 nm y 590 nm, respectivamente. Para el análisis, el alcance de la reducción con resazurina mediante las células tratadas se puede comparar con el de las células de control sin tratar.

Para ensayos de exposición de 1 h las células se pueden pulsar con el fármaco durante 1 h y a continuación lavar; el efecto citotóxico se puede determinar después de 96 h de incubación.

Ejemplo 17 – cata citotoxicidad *in vitro* para compuestos seleccionados

La Tabla 10 muestra el efecto citotóxico de Conjugados de los Compuestos cAC10 **7-10**, sometidos al ensayo tal como se describe en el Procedimiento General I en una línea celular Karpas 299 de CD30+. Se presentan los datos de dos experimentos separados. Se encontró que los conjugados cAC10 de los Compuestos **7** y **9** eran ligeramente más activos que cAC10-val-cit-MMAE.

TABLA 10

Conjugado	Cl ₅₀ (ng/ml)
cAC10-val-cit-MMAE	6
cAC10-7	1,0
cAC10-8	15
cAC10-9	0,5
cAC10-10	20

En otros experimentos, BR96-val-cit-MMAF era al menos 250 veces más potente que el MMAF libre.

Procedimiento General I – Determinación de citotoxicidad. Para evaluar la citotoxicidad de los Conjugados a modo de Ejemplo 7-10, se sembraron celulasas aproximadamente 5 – 10.000 por pocillo en 150 µl de medio de cultivo y a continuación se trató con dosis graduadas de los Conjugados a modo de Ejemplo 7-10 por cuadruplicado al comienzo del ensayo. Se realizaron ensayos de citotoxicidad durante 96 horas después de la adición de los compuestos de ensayo. Cincuenta µl de colorante de resazurina se añadieron a cada pocillo durante las últimas 4 a 6 horas de la incubación para evaluar las células viables al final del cultivo. La reducción del colorante se puede determinar mediante espectrometría de fluorescencia usando las longitudes de onda de excitación y de emisión de 535 nm y 590 nm, respectivamente. Para el análisis, el alcance de la reducción con resazurina mediante las células tratadas se puede comparar con el de las células de control sin tratar.

Ejemplo 18 – Ensayo de proliferación celular *in vitro*

La eficacia de ADC se puede medir con un ensayo de proliferación celular usando el siguiente protocolo (Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Mendoza et al. (2002) Cancer Res. 62: 5485-5488):

1. Una alícuota de 100 µl de cultivo celular que contiene aproximadamente 10⁴ células (SKBR-3, BT474, MCF7 o MDA-MB-468) en medio se depositó en cada pocillo de una placa de paredes opacas, de 96 pocillos.
2. Se prepararon pocillos de control que contenían medio y sin células.
3. Se añadió ADC a los concilios experimentales y se incubó durante 3-5 días.
4. Las placas se equilibraron a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.
5. Se añadió un volumen de Reactivo CellTiter-Glo igual al volumen del medio de cultivo celular presente en cada pocillo.
6. Los contenidos se mezclaron durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular.
7. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia.
8. La luminiscencia se registró y se indicó en gráficos como RLU = unidades relativas de luminiscencia.

Ejemplo 19 – Aclaramiento de plasma en ratas

La farmacocinética del aclaramiento de plasma de conjugados de anticuerpo y fármaco y anticuerpo total se estudiaron en ratas Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, 250-275 gramos cada una). Los animales se dosificaron con inyección embolo en la vena de la cola (Impulso IV). Se recogieron aproximadamente 300 µl de sangre entera a través de cánula yugular, o extracción en la cola, en recipientes con anticoagulante de litio/heparina en cada punto temporal: 0 (dosis previa), 10, y en 30 minutos; 1, 2, 4, 8, 24 y 36 horas; y 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28 días después de la dosis. El anticuerpo total se midió por ELISA - ECD/GxhuFc-HRP. El conjugado de anticuerpo y fármaco se midió por ELISA-MMAE/MMAF/ECD-Bio/SA-HRP.

Ejemplo 20 - Aclaramiento de plasma en monos

La farmacocinética del aclaramiento de plasma de conjugados de anticuerpo y fármaco y anticuerpo total se puede estudiar en monos cynomolgus. La Figura 12 muestra un estudio en dos etapas de aclaramiento de la concentración en plasma después de la administración de H-MC-vc-MMAE a monos Cynomolgus a diferentes dosis: 0,5, 1,5, 2,5, y 3,0 mg/kg, administradas el día 1 y el día 21. Las concentraciones de anticuerpo total y ADC se midieron con el tiempo. (H = Trastuzumab).

Ejemplo 21 – Eficacia *in vivo* del volumen tumoral en ratones transgénicos con explantes

Los animales adecuados para experimentos transgénicos se pueden obtener en fuentes comerciales convencionales tales como Taconic (Germantown, N.Y.). Muchas cepas son adecuadas, pero son preferentes los ratones hembra FVB debido a su mayor susceptibilidad a la formación de tumores. Los machos de FVB se pueden usar para apareamiento y se pueden usar sementales CD.1 vasectomizados para estimular un pseudo-embarazo. Los ratones vasectomizados se pueden obtener de cualquier proveedor comercial. Los fundadores se pueden criar con ratones

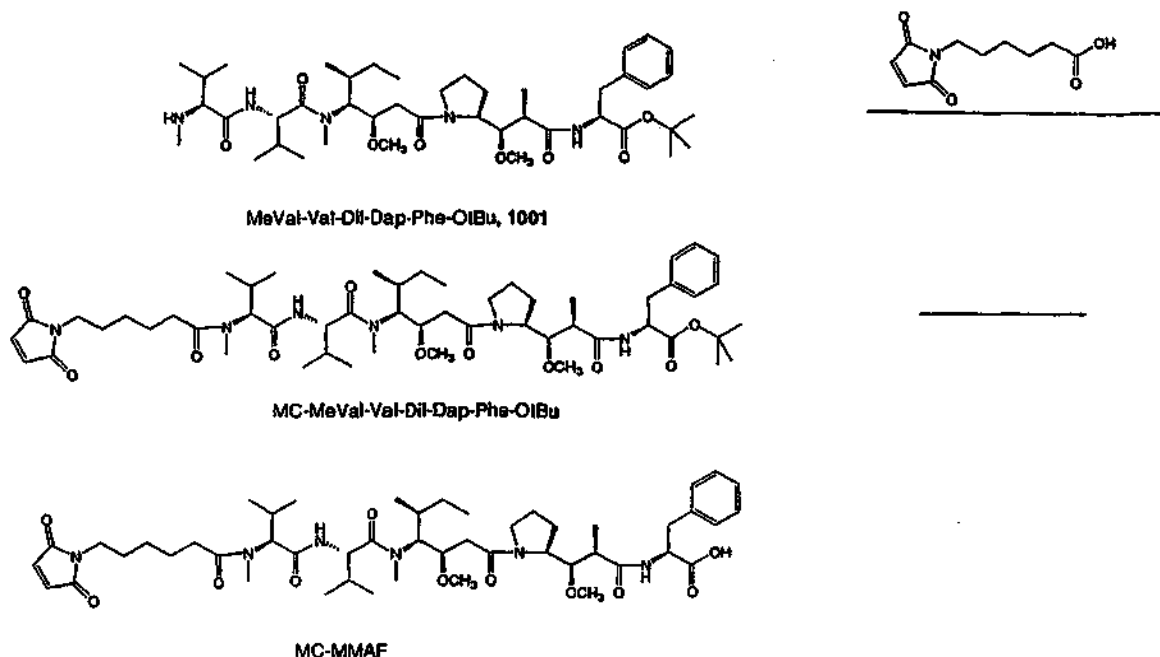
FVB o con ratones heterocigotos 129/BL6 x FVB p53. Los ratones con heterocigosis en el alelo p53 se pueden usar para aumentar potencialmente la formación de tumores. Algunos tumores F1 son de cepas mixtas. Los tumores en los fundadores solamente pueden ser FVB.

- 5 Los animales que tienen tumores (aloinjerto propagado de ratones transgénicos Fo5 mmtv) se pueden tratar con una sola dosis o con múltiples dosis por inyección IV de ADC. El volumen tumoral se puede evaluar en diversos puntos temporales después de la inyección.

Ejemplo 22 - Síntesis de MC-MMAF a través de éster t-butilico

10

Síntesis 1:

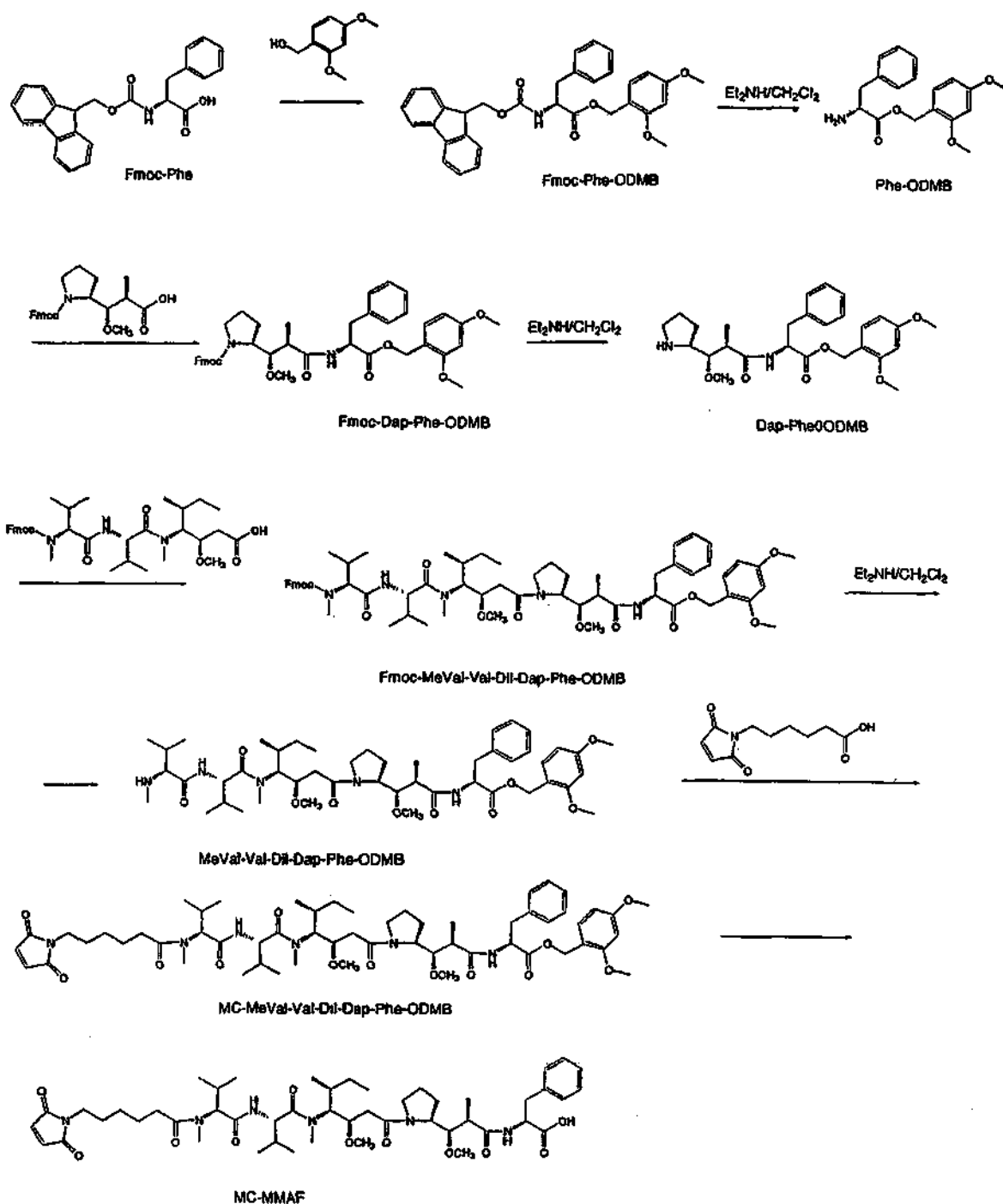


- 15 MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (compuesto 1, 128,6 mg, 0,163 mmol) se suspendió en CH_2Cl_2 (0,500 ml). Se añadieron ácido 6-maleimidocaproico (68,9 mg, 0,326 mmol) y 1,3-diisopropilcarbodiimida (0,0505 ml, 0,326 mmol) seguido de piridina (0,500 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 1,0 h. El análisis de HPLC indicó consumo completo del compuesto de partida 1. Los compuestos orgánicos volátiles se evaporaron a presión reducida. El producto se aisló por cromatografía en columna ultrarrápida, usando un gradiente de etapa de Metanol al 0 a 5 % en CH_2Cl_2 . Se recuperó un total de 96 mg de MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (12) pura (rendimiento de un 60 %). ES-MS m/z 981,26 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 1003,47 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 979,65 $[\text{M}-\text{H}]^-$.
- 20

- MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (Compuesto 12,74 mg, 0,0754 mmol) se suspendió en CH_2Cl_2 (2,0 ml) y TFA (1 ml) a temperatura ambiente. Después de 2,5 h, el análisis de HPLC indicó consumo completo del material de partida. Los compuestos orgánicos volátiles se evaporaron a presión reducida, y el producto se aisló a través de RP-HPLC preparativa, usando una Columna Synergi Max-RP C_{12} de 80 Å de Phenomenex (250 x 21,20 mm). Eluyente: gradiente lineal de MeCN del 10 % al 90 %/TFA al 0,05 % (ac.) durante 30 minutos, a continuación MeCN al 90 %/TFA al 0,05 % (ac.) isocrático para un periodo adicional de 20 minutos. ES-MS m/z 925,33 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 947,30 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 923,45 $[\text{M}-\text{H}]^-$.
- 25
- 30

Ejemplo 23a - Síntesis de MC-MMAF (11) a través de éster dimetoxibencílico

Síntesis 2:



Preparación de éster Fmoc-L-Fenilalanina-2,4-dimetoxibencílico (Fmoc-Phe-ODMB)

- 5 Un matraz de fondo redondo de 5 l de 3 bocas, se cargó con Fmoc-L-Fenilalanina (200 g, 516 mmol de Bachem), alcohol 2,4-dimetoxibencílico (95,4 g, 567 mmol, Aldrich), y CH₂Cl₂ (2,0 l). Se añadió t-butil acetal de N,N-dimetilformamida (155 ml, 586 mmol, Fluka) a la suspensión resultante durante 20 min en atmósfera de N₂, que dio como resultado una solución transparente. Después, la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche, tras lo cual el análisis de TLC (0,42, Heptano/EtOAc = 2:1) indicó que la reacción era completa. La mezcla de
10 reacción se concentró a presión reducida para dar un aceite de color amarillo claro, que se disolvió de nuevo en CH₂Cl₂ (200 ml) y se purificó a través de un lecho corto de gel de sílice (25 cm x 25 cm, CH₂Cl₂) para dar una espuma incolora (250 g). Se añadió MeCN (1 l) en la espuma resultante, que disolvió totalmente el lote. A continuación se concentró a sequedad y se volvió a disolver en MeCN (1 l) y la suspensión resultante se agitó durante 1 h, se filtró y la torta de filtro se aclaró con MeCN (2 x 200 ml) para dar éster Fmoc-L-fenilalanina-2,4-dimetoxibencílico en forma de un sólido de color blanco (113,58 g, 41 %, AUC de un 95,5 % por análisis de HPLC).
15

Datos: HPLC.

Preparación Éster L-fenilalanina-2,4-dimetoxibencílico (Phe-ODMB)

- 5 Un matraz de fondo redondo de 500 ml se cargó con éster Fmoc-L-fenilalanina-2,4-dimetoxibencílico (26,00 g, 48,3 mmol), CH₂Cl₂ (150 ml) y dietilamina (75 ml, Acros). La mezcla se agitó a temperatura ambiente y la finalización se controló por HPLC. Después de 4 h, la mezcla se concentró (temperatura del baño < 30 °C). El resto se volvió a suspender en CH₂Cl₂ (200 ml) y se concentró. Ésto se repitió una vez. Al resto se añadió MeOH (20 ml), que provocó la formación de un gel. Este resto se diluyó con CH₂Cl₂ (200 ml), se concentró y el aceite turbio se dejó vacío durante una noche. El resto se suspendió en CH₂Cl₂ (100 ml), a continuación se añadió tolueno (120 ml). La mezcla se concentró y el resto se dejó al vacío durante una noche.

Datos: HPLC, RMN 1H.

15 Preparación de Fmoc-Dolaproína (Fmoc-Dap)

- Boc-Dolaproína (58,8 g, 0,205 mol) se suspendió en HCl 4 N en 1,4-dioxano (256 ml, 1,02 mol, Aldrich). Después de agitar durante 1,5 horas, el análisis de TLC indicó que la reacción era completa (MeOH al 10 %/CH₂Cl₂) y la mezcla se concentró casi hasta sequedad. Se cargó 1,4-dioxano adicional (50 ml) y la mezcla se concentró a sequedad y se secó al vacío durante una noche. El sólido de color blanco resultante se disolvió en H₂O (400 ml) y se transfirió a un to matraz de fondo redondo, de tres bocas, de 3 l, con un agitador mecánico y sonda de temperatura. Se añadió N,N-diisopropiletilamina (214,3 ml, 1,23 mol, Acros) durante un minuto, causando una exotermia de 20,5 a 28,2 °C (interna). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió 1,4-dioxano (400 ml). Una solución de Fmoc-OSu (89,90 g, 0,267 mol, Advanced ChemTech) en 1,4-dioxano (400 ml) se añadió desde un embudo de adición durante 15 minutos, manteniendo la temperatura de reacción por debajo de 9 °C. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 19 horas, tras lo cual la mezcla se concentró por evaporación rotatoria hasta una suspensión acuosa (390 g). La suspensión se diluyó con H₂O (750 ml) y Et₂O (750 ml), provocando que se formara un precipitado de color blanco abundante. Las fases se separaron, manteniendo los sólidos con la fase orgánica. La fase acuosa se acidificó usando HCl conc. (30 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 500 ml). Los extractos combinados se secaron sobre MgSO₄, se filtró y se concentró para dar 59,25 g de un aceite de color amarillo A. El extracto de Et₂O se extrajo una vez con NaHCO₃ sat. (200 ml), manteniendo los sólidos con la fase acuosa. La suspensión acuosa se acidificó usando HCl conc. (50 ml) y se extrajo con Et₂O (50 ml) manteniendo los sólidos con la fase orgánica. La fase orgánica se filtró y se concentró para dar 32,33 g de un aceite de color amarillo B. Los dos aceites (A y B) se combinaron y se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con CH₂Cl₂ (3,5 l), a continuación MeOH al 3 %/CH₂Cl₂ (9 l) para dar 68,23 g de Fmoc-dolaproína en forma de una espuma de color blanco (81 %, pureza de un 97,5 % por HPLC (AUC)).

Preparación de Fmoc-Dap-Phe-ODMB

- 40 Phe-ODMB en bruto (48,3 mmol) se suspendió en DMF anhidra (105 ml, Acros) durante 5 minutos y se añadió Fmoc-Dap (19,80 g, 48,3 mmol). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió TBTU (17,08 g, 53,20 mmol, Matrix Innovations). Se añadió N,N-diisopropiletilamina (25,3 ml, 145,0 mmol, Acros) mediante una jeringa durante 3 min. Después de 1 h, el baño de hielo se retiró y la mezcla se dejó calentar durante 30 min. La mezcla se vertió en agua (1 l) y se extrajo con acetato de etilo (300 ml). Después de separación, la fase acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo (2 x 150 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (150 ml), se secó (MgSO₄) y se filtró (papel de filtro) para retirar las sustancias insolubles (compuestos inorgánicos y algo de dibenzofulveno). Después de concentración, el resto (41 g) se adsorbió sobre sílice (41 g) y se purificó por cromatografía (columna de 22 cm x 8 cm; Heptano al 65 %/EtOAc (2,5 l); Heptano al 33 %/EtOAc (3,8 l), para dar 29,4 g de producto en forma de una espuma de color blanco (86 %, pureza de un 92 % por HPLC).

50 Datos: HPLC, RMN 1H, TLC (EtOAc a 1:1/Heptano R_f = 0,33, tinción con rojo en vainilla).

Preparación de Dap-Phe-ODMB

- 55 Un matraz de fondo redondo de 1 l se cargó con Fmoc-Dap-Phe-ODMB (27,66 g), CH₂Cl₂ (122 ml) y dietilamina (61 ml, Acros). La solución se agitó a temperatura ambiente y la finalización se controló por HPLC. Después de 7 h, la mezcla se concentró (temp. del baño < 30 °C). El resto se suspendió en CH₂Cl₂ (300 ml) y se concentró. Ésto se repitió dos veces. Al resto se añadió MeOH (20 ml) y CH₂Cl₂ (300 ml), y la solución se concentró. El resto se suspendió en CH₂Cl₂ (100 ml) y tolueno (400 ml), se concentró, y el resto se dejó al vacío durante una noche para dar un resto de color similar al crema.

Datos: HPLC, RMN 1H, MS.

Preparación de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB

- 65 Dap-Phe-ODMB en bruto (39,1 mmol) se suspendió en DMF anhidra (135 ml, Acros) durante 5 minutos y se añadió

Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH (24,94 g, 39,1 mmol, véase el Ejemplo 2 para la preparación). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió TBTU (13,81 g, 43,0 mmol, Matrix Innovations). N,N-Diisopropiletilamina (20,5 ml, 117,3 mmol, Acros) se añadió mediante una jeringa durante 2 minutos. Después de 1 hora, el baño de hielo se retiró y la mezcla se dejó calentar durante 30 min. La mezcla se vertió en agua (1,5 l) y se diluyó con acetato de etilo (480 ml). Después de reposar durante 15 minutos, las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (300 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (200 ml), se secó (MgSO_4) y se filtró (papel de filtro) para retirar las sustancias insolubles (compuestos inorgánicos y algo de dibenzofulveno). Después de concentración, el resto (49 g) se raspó del matraz y se adsorbió sobre sílice (49 g) y se purificó por cromatografía (columna día de 15 cm x 10 cm; EtOAc a2:1/Heptano (3 l), EtOAc (5 l); fracciones de 250 ml) para dar 31,84 g de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB en forma de una espuma de color blanco (73 %, pureza de un 93 % por HPLC (AUC)).

Datos: HPLC, TLC (EtOAc a 2:1/heptano, R_f = 0.21, tinción con rojo en vanillina).

Preparación de MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB

Un matraz de fondo redondo, de 1 l se cargó con Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (28,50 g), CH_2Cl_2 (80 ml) y dietilamina (40 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche y después se concentró a presión reducida. El resto se adsorbió sobre sílice (30 g) y se purificó por cromatografía ultrarrápida (columna día de 15 cm x 8 cm; MeOH al 2 %/DCM (2 l), MeOH al 3 %/DCM (1 l), MeOH al 6 %/DCM (4 l); fracciones de 250 ml) para dar 15,88 g de MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB en forma de una espuma de color blanco (69 %, pureza de un 96 % por HPLC (AUC)).

Datos: HPLC, TLC (MeOH al 6 %/DCM, R_f = 0.24, tinción con rojo en vanillina).

Preparación de MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB

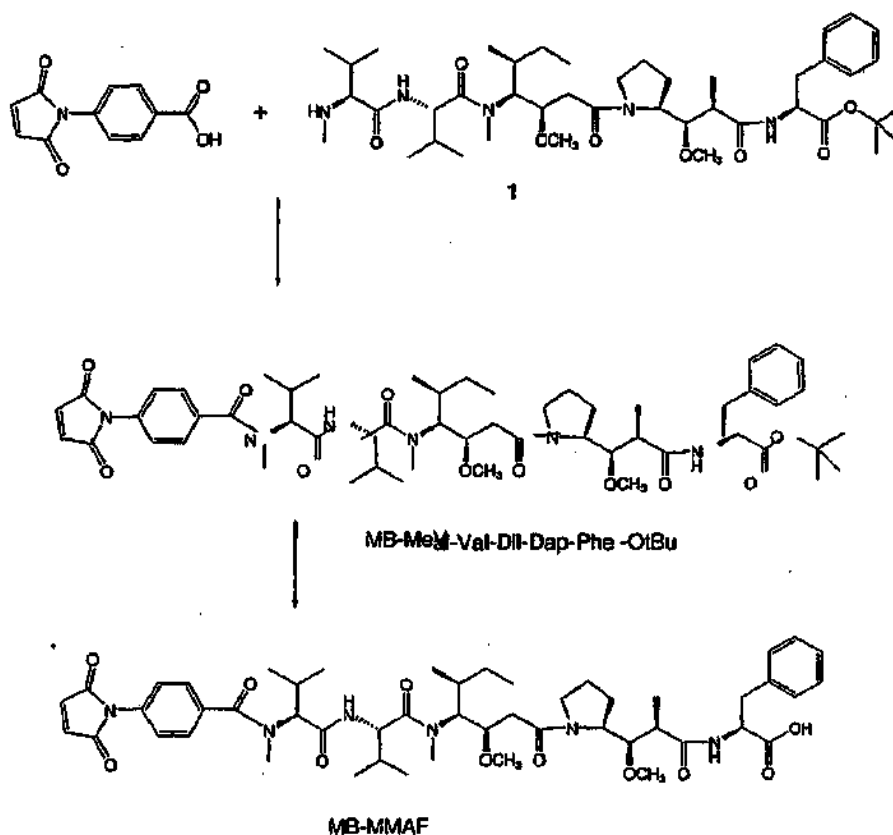
Un matraz de fondo redondo, de 50 ml se cargó con MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (750 mg, 0,85 mmol), DMF anhidra (4 ml), ácido maleimidocaproico (180 mg, 0,85 mmol) y TBTU (300 mg, 0,93 mmol, Matrix Innovations) a temperatura ambiente. N,N-Diisopropiletilamina (450 μl , 2,57 mmol) se añadió mediante una jeringa. Después de 1,5 horas, la mezcla se vertió en agua (50 ml) y se diluyó con acetato de etilo (30 ml). NaCl se añadió para mejorar la separación. Después de la separación de las fases, la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (25 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO_4), se filtró y se concentró. El aceite resultante (1 g) se purificó por cromatografía ultrarrápida [100 ml de sílice; Heptano al 25 %/EtOAc (100 ml), Heptano al 10 %/EtOAc (200 ml), EtOAc (1,5 l)] para dar MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (13) en forma de una espuma de color blanco (521 mg, 57 %, pureza de un 94 % por HPLC(AUC)).

Datos: RMN ^1H , HPLC.

Preparación de MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OH (MC-MMAF) (11)

Un matraz de fondo redondo, de 50 ml se cargó con MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (Compuesto 13,428 mg, 0,39 mmol) y se disolvió en TFA al 2,5 %/ CH_2Cl_2 (20 ml). La solución se volvió de color rosa-púrpura durante 2 min. La finalización se controló por HPLC y TLC (MeOH al 6 %/DCM, tinción con KMnO_4). Después de 40 min, se añadieron tres gotas de agua y la mezcla de color rosa-púrpura se concentró para dar 521 mg de un resto de color rosa. La purificación por cromatografía (IPA al 15 %/DCM) proporcionó 270 mg de MC-MMAF (73 %, pureza de un 92 % por HPLC) en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 23b - Síntesis de análogo de mc-MMAF

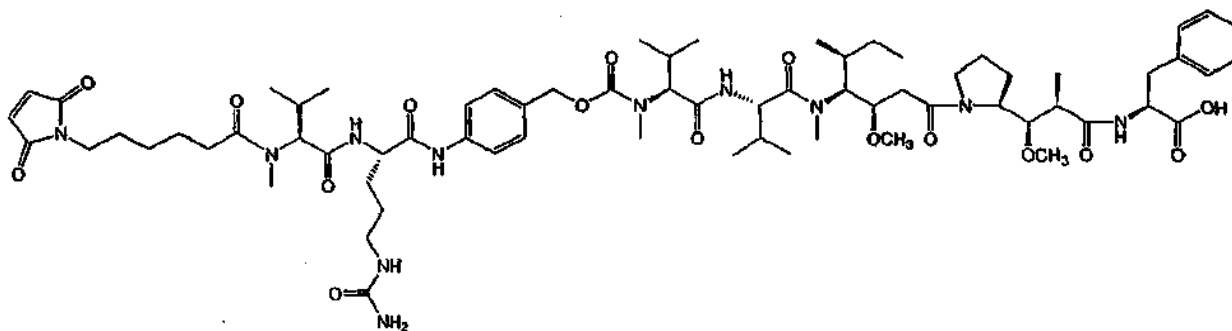


5

10

15

20



A una suspensión a temperatura ambiente de Fmoc-MeVal-OH (3,03 g, 8,57 mmol) y carbonato de N,N'-disuccimidilo (3,29 g, 12,86 mmol) en CH₂Cl₂ (80 ml) se añadió DIEA (4,48 ml, 25,71 mmol). Esta mezcla de reacción se dejó en agitación durante 3,0 h, y después se vertió en un embudo de separación en el que la mezcla orgánica se extrajo con HCl 0,1 M (ac.). El resto orgánico en bruto se concentró a presión reducida, y el producto se aisló por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice usando un gradiente lineal de acetato de etilo al 20-100 %/hexanos. Se recuperó un total de 2,18 g de Fmoc-MeVal-OSu puro (4,80 mmoles, rendimiento de un 56 %).

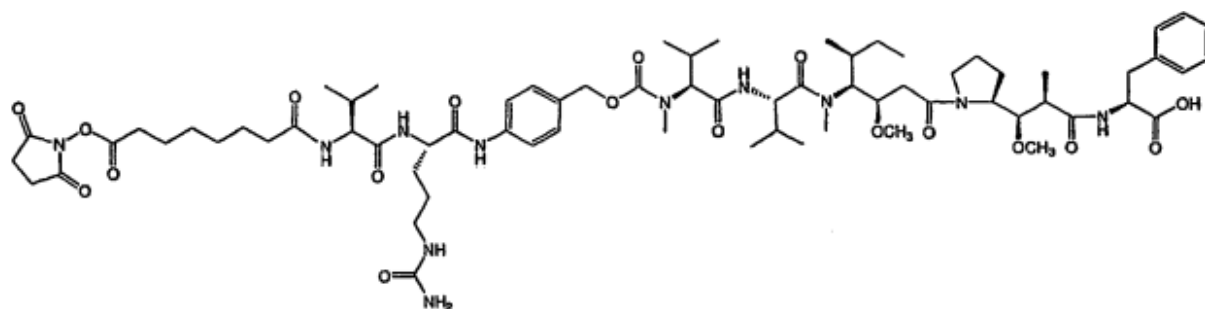
A una suspensión a temperatura ambiente de Fmoc-MeVal-OSu (2,18 g, 4,84 mmol) en DME (13 ml) y THF (6,5 ml) se añadió una solución de L-citrulina (0,85 g, 4,84 mmol) y NaHCO₃ (0,41 g, 4,84 mmol) en H₂O (13 ml). La suspensión se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 16 h, a continuación se extrajo en *tert*-BuOH/CHCl₃/H₂O, se acidificó a pH = 2-3 con HCl 1 M. La fase orgánica se separó, se secó y se concentró a presión reducida. El resto se trituró con éter dietílico dando como resultado 2,01 g de Fmoc-MeVal-Cit-COOH que se usó sin purificación adicional.

El Fmoc-MeVal-Cit-COOH bruto se suspendió en CH₂Cl₂/MeOH a 2:1 (100 ml), y se le añadió alcohol *p*-aminobencílico (0,97 g, 7,9 mmol) y EEDQ (1,95 g, 7,9 mmol). Esta suspensión se dejó en agitación durante 125 h, a continuación los compuestos orgánicos volátiles se retiraron a presión reducida, y el resto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice usando MeOH al 10 %/CH₂Cl₂. Se recuperó el Fmoc-MeVal-Cit-PAB-OH puro (0,55 g, 0,896 mmol, rendimiento de un 18,5 %). ES-MS *m/z* 616,48 [M+H]⁺.

A una suspensión de Fmoc-MeVal-Cit-PAB-OH (0,55 g, 0,896 mmol) en CH₂Cl₂ (40 ml) se añadió STRATOSPHERES[™] (unido a resina de piperazina) (> 5 mmol/g, 150 mg). Después de su agitación a temperatura ambiente durante 16 h la mezcla se filtró a través de celite (lavado previamente con MeOH), y se concentró a presión reducida. El resto se trituró con éter dietílico y hexanos. El material sólido resultante, MeVal-Cit-PAB-OH, se suspendió en CH₂Cl₂ (20 ml), y se le añadió MC-OSu (0,28 g, 0,896 mmol), DIEA (0,17 ml, 0,99 mmol) y DMF (15 ml). Esta suspensión se agitó durante 16 h, pero el análisis de HPLC de la mezcla de reacción indicó reacción incompleta, de modo que la suspensión se concentró a presión reducida hasta un volumen de 6 ml, a continuación se añadió una solución de NaHCO₃ (ac.) al 10 % y la suspensión se agitó durante un periodo adicional de 16 h. El disolvente se retiró a presión reducida, y el resto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice usando un gradiente de MeOH al 0-10 %/CH₂Cl₂, dando como resultado 42 mg (0,072 mmol, rendimiento de un 8 %) de MC-MeVal-Cit-PAB-OH.

A una suspensión de MC-MeVal-Cit-PAB-OH (2,37 g, 4,04 mmol) y bis(nitrofenil)carbonato (2,59 g, 8,52 mmol) en CH₂Cl₂ (10 ml) se añadió DIEA (1,06 ml, 6,06 mmol). Esta suspensión se agitó durante 5,5 h, se concentró a presión reducida y se purificó por trituración con éter dietílico. MC-MeVal-Cit-PAB-OCO-pNP (147 mg, 0,196 mmol) se suspendió en una solución de piridina a 1:5/DMF (3 ml), y se le se añadió HOBt (5 mg, 0,039 mmol), DIEA (0,17 ml, 0,978 mmol) y MMAF (compuesto 2, 150 mg, 0,205 mmol). Esta mezcla de reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente, y a continuación se purificó por RP-HPLC preparativa (x 3), usando una Columna Synergi Max-RP C₁₂ de 80 Å de Phenomenex (250 x 21,20 mm). Eluyente: gradiente lineal de MeCN de un 10 % a un 90 %/TFA al 0,05 % (ac.) durante 30 minutos, a continuación MeCN al 90 %/TFA al 0,05 % (ac.) isocrático durante un periodo adicional de 20 minutos. MC-MeVal-Cit-PAB-MMAF (16) se obtuvo en forma de un sólido de color amarillento (24,5 mg, 0,0182, rendimiento de un 0,45 %). ES-MS *m/z* 1344,95 [M+H]⁺; 1366,94 [M+Na]⁺.

Ejemplo 23d - Preparación de éster de succinimida de suberil-Val-Cit-PAB-MMAF (17)

**Compuesto 17**

El Compuesto 1 (300 mg, 0,38 mmol), Fmoc-Val-Cit-PAB-pNP (436 mg, 0,57 mmol, 1,5 equiv.) se suspendieron en piridina anhidra, 5 ml. Se añadió HOBt (10 mg, 0,076 mmol, 0,2 equiv.) seguido de DIEA (199 μ l, 1,14 mmol, 3 equiv.). La mezcla de reacción se sonicó durante 10 min, y a continuación se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Piridina se retiró a presión reducida, el resto se volvió a suspender en CH_2Cl_2 . La mezcla se separó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice en un gradiente de etapa de MeOH, de un 0 a un 10 %, en CH_2Cl_2 . Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron, se secó al vacío durante una noche para dar 317 mg (rendimiento de un 59 %) de Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF-OtBu. ES-MS m/z 1415,8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF-OtBu (100 mg) se agitó en TFA al 20 %/ CH_2Cl_2 (10 ml), durante 2 h. La mezcla se diluyó con CH_2Cl_2 (50 ml). La fase orgánica se lavó sucesivamente con agua (2 x 30 ml) y salmuera (1 x 30 ml). La fase orgánica se concentró, se cargó sobre un lecho de gel de sílice en MeOH al 10 %/ CH_2Cl_2 . El producto se eluyó con MeOH al 30 %/ CH_2Cl_2 . Después de secar al vacío durante una noche se obtuvo, Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF en forma de un sólido de color blanco, 38 mg, rendimiento de un 40 %. ES-MS m/z 1357,7 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF, 67 mg, se suspendió en CH_2Cl_2 (2 ml) dietilamina (2 ml) y DMF (2 ml). La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El disolvente se retiró a presión reducida. El resto se co-evaporó con piridina (2 ml), a continuación con tolueno (2 x 5 ml), se secó al vacío. Se obtuvo Val-Cit-PAB-MMAF en forma de un aceite de color parduzco, y se usó sin purificación adicional.

Todo el Val-Cit-PAB-MMAF preparado a partir de 67 mg de Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF, se suspendió en piridina (2 ml), y se añadió a una solución de suberato de disuccinimidilo (74 mg, 0,2 mmol, 4 equiv.), en piridina (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 3 horas, se añadió éter (20 ml). El precipitado se recogió, se lavó con una cantidad adicional de éter. Un sólido de color rojizo se suspendió en MeOH al 30 %/ CH_2Cl_2 , se filtra a través de una capa de gel de sílice con MeOH al 30 %/ CH_2Cl_2 como eluyente. Se obtuvo el Compuesto 17 en forma de un sólido de color blanco, 20 mg (rendimiento de un 29 %). ES-MS m/z 1388,5 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Ejemplo 24 – Eficacia *in vivo* de Conjugados de Anticuerpo-Fármaco de mcMMAF

Eficacia de cAC10-mcMMAF en xenoinjertos de ALCL de Karpas-299: Para evaluar la eficacia *in vivo* de cAC10-mcMMAF con un promedio de 4 restos de fármaco por anticuerpo (cAC10-mcF4), células ALCL humanas de Karpas-299 se implantaron por vía subcutánea en ratones C.B-17 SCID inmunodeficientes (5×10^6 células por ratón). Los volúmenes tumorales se calcularon usando la fórmula $(0,5 \times L \times W^2)$ en la que L y W son la medida más larga y más corta de dos medidas bidireccionales. Cuando el volumen tumoral medio en los animales de estudio alcanzó aproximadamente 100 mm^3 (intervalo de 48-162), los ratones se dividieron en 3 grupos (5 ratones por grupo) y se dejaron sin tratar o se dosificaron con una sola inyección intravenosa a través de la vena de la cola de 1 o 2 mg/kg de cAC10-mcF4 (Figura 1). Los tumores en los ratones sin tratar crecieron rápidamente hasta un volumen medio de $> 1.000 \text{ mm}^3$ en 7 días del comienzo de la terapia. Por el contrario, todo el tumor tratado con cAC10-mcF4 mostró una rápida regresión con 3/5 en el grupo de 1 mg/kg y 5/5 en el grupo de 2 mg/kg que obtuvo una respuesta total del tumor. Aunque el tumor en uno de los pacientes con respuesta total en el grupo de 2 mg/kg recurrió aproximadamente 4 semanas más tarde, no hubo tumores detectables en los 4/5 pacientes restantes en este grupo y el los 3 pacientes de respuesta total en el grupo de 1 mg/kg a las 10 semanas después de la terapia.

Eficacia de cBR96-mcMMAF en xenoinjertos de NSCLC L2987: cBR96 es un anticuerpo quimérico que reconoce el antígeno Le^V. Para evaluar la eficacia *in vivo* de cBR96-mcMMAF con 4 fármacos por anticuerpo (cBR96-mcF4), fragmentos de tumor de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) L2987 se implantaron en ratones atímicos desnudos. Cuando los tumores tenían un tamaño medio de aproximadamente 100 mm^3 , los ratones se dividieron en 3 grupos: sin tratar y 2 grupos de terapia. Para la terapia, tal como se muestra en la Figura 3a, se administró cBR96-mcF4 a los ratones a 3 o 10 mg/kg/inyección cada 4 días para un total de 4 inyecciones (q4dx4). Tal como se muestra en la Figura 3b, se administró cBR96-mcF4 a los ratones o un conjugado de control de no unión, cAC10-mcF4, a 10 mg/kg/inyección cada 4 días para un total de 4 inyecciones (q4dx4). Tal como se muestra en las Figuras 3a y 3b, BR96-mcF4 produjo un retraso del crecimiento tumoral pronunciado en comparación con los controles.

La Figura 2 muestra un ensayo de eficacia, de una sola dosis, *in vivo*, de cAC10-mcMMAF en L540CY subcutáneo. Para este estudio había 4 ratones en el grupo sin tratar y 10 en cada uno de los grupos de tratamiento.

5 Ejemplo 25 – Eficacia *in vitro* de Conjugados de Anticuerpo-Fármaco de MC-MMAF

Actividad de conjugados de cAC10-anticuerpo-fármaco frente a líneas celulares CD30⁺. Las Figuras 4a y 16b muestran curvas de dosis-respuesta a partir de un experimento representativo en el que se incubaron cultivos de Karpas 299 (linfoma anaplásico de células grandes) y L428 (Linfoma Hodgkin) con diluciones en serie de cAC10-mcMMAF (Figura 4a) o cAC10-vcMMAF (Figura 4b) durante 96 horas. Los cultivos se marcaron durante 4 horas con resazurina 50 μ M [10-óxido de 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona] y se midió la fluorescencia. Los datos se redujeron en GraphPad Prism versión 4.00 usando el procedimiento de ajuste de curvas de dosis-respuesta de 4 parámetros. Los valores de CI_{50} se definen como la concentración en la que el crecimiento se reduce al 50 % en comparación con cultivos de control sin tratar. Cada concentración se sometió a ensayo por cuadruplicado.

Actividad de conjugados de cBR96-anticuerpo-fármaco frente a líneas celulares Le^y⁺. Las Figuras 5a y 5b muestran curvas de dosis-respuesta a partir de un experimento representativo en el que se incubaron cultivos de H3396 (carcinoma de mama) y L2987 (carcinoma de pulmón de células no pequeñas) con diluciones en serie de cBR96-mcMMAF (Figura 5a) o -vcMMAF (Figura 5b) durante 96 horas. Los cultivos se marcaron durante 4 horas con resazurina 50 μ M y se midió la fluorescencia. Los datos se redujeron en GraphPad Prism versión 4.00 usando el procedimiento de ajuste de curvas de dosis-respuesta de 4 parámetros. Los valores de CI_{50} se definen como la concentración en la que el crecimiento se reduce al 50 % en comparación con cultivos de control sin tratar. Cada concentración se sometió a ensayo por cuadruplicado.

Actividad de conjugados c1F6-anticuerpo-fármaco frente a líneas celulares de carcinoma de células renales CD70⁺. Las Figuras 6a y 6b muestran curvas de dosis-respuesta a partir de un experimento representativo en el que se incubaron cultivos de células Caki-1 y 786-O con diluciones en serie de c1F6-mcMMAF (Figura 6a) o -vcMMAF (Figura 6b) durante 96 horas. Los cultivos se marcaron durante 4 horas con resazurina 50 μ M y se midió la fluorescencia medido. Los datos se redujeron en GraphPad Prism versión 4.00 usando el procedimiento de ajuste de curvas de dosis-respuesta de 4 parámetros. Los valores de CI_{50} se definen como la concentración en la que el crecimiento se reduce al 50 % en comparación con cultivos de control sin tratar. Cada concentración se sometió a ensayo por cuadruplicado.

35 Ejemplo 26 - Purificación de trastuzumab

Un vial que contiene 440 mg de HERCEPTIN® (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Patente de Estados Unidos N° 5821337) anticuerpo se disolvió en 50 ml de tampón MES (MES 25 mM, NaCl 50 mM, pH 5,6) y se cargó en una columna de intercambio catiónico (Sephacrose S, 15 cm x 1,7 cm) que se había equilibrado en el mismo tampón. La columna se lavó a continuación con el mismo tampón (5 volúmenes de columna). Trastuzumab se eluyó aumentando la concentración de NaCl del tampón a 200 mM. Las fracciones que contenían el anticuerpo se combinaron, se diluyó a 10 mg/ml, y se dializó en un tampón que contenía fosfato potásico 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA2 mM, pH 6,5.

45 Ejemplo 27 - Preparación de trastuzumab-MC-MMAE por conjugación de trastuzumab y MC-MMAE

Trastuzumab, disuelto en borato sódico 500 mM y cloruro sódico 500 mM a pH 8,0 se trata con un exceso de ditiotretitol 100 mM (DTT). Después de incubación a 37 °C durante aproximadamente 30 minutos, el campo se intercambia por elución sobre resina Sephadex G25 y eluyendo con PBS con DTPA 1 mM. El valor de tior/Ab se comprueba mediante la determinación de la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tior por reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación del absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido disuelto en PBS se enfría en hielo.

El reactivo de conector del fármaco, maleimidocaproil-monometil auristatina E (MMAE), *es decir* MC-MMAE, disuelto en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua a una concentración conocida, y se añade al anticuerpo trastuzumab reducido enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para inactivar la reacción y se protege cualquier grupo tior del anticuerpo sin reaccionar. La mezcla de reacción se mediante un ultrafiltración en centrífuga y trastuzumab-MC-MMAE se purifica y se desala mediante elución a través de resina G25 en PBS, se filtró a través de filtros de 0,2 μ m en condiciones estériles, y se congeló para su almacenamiento.

60 Ejemplo 28 - Preparación de trastuzumab-MC-MMAF por conjugación de trastuzumab y MC-MMAF

Trastuzumab-MC-MMAF se preparó por conjugación de trastuzumab y MC-MMAF siguiendo el procedimiento del Ejemplo 27.

65 Ejemplo 29 - Preparación de trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAE por conjugación de trastuzumab y MC-val-cit-PAB-MMAE

Trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAE se preparó por conjugación de trastuzumab y MC-val-cit-PAB-MMAE siguiendo el procedimiento del Ejemplo 27.

5 Ejemplo 30 - Preparación de trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF por conjugación de trastuzumab y MC-val-cit-PAB-MMAF 9

Trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF se preparó por conjugación de trastuzumab y MC-val-cit-PAB-MMAF 9 siguiendo el procedimiento del Ejemplo 27.

10 Ejemplo 31 – Toxicidad en ratas

El perfil de toxicidad aguda de fármacos libres y ADC se evaluó en ratas Sprague-Dawley adolescentes (75-125 gramos cada una, Charles River Laboratories (Hollister, CA). Los animales fueron inyectados el Día 1, se obtuvieron perfiles completos de química y hematología en la medida inicial, el día 3 y el día 5 y se realizó una necropsia completa el Día 5. Se realizaron medidas de enzimas hepáticas en todos los animales e histología de rutina tal como se realiza en tres animales aleatorios para cada grupo para los siguientes tejidos: esternón, hígado, riñón, timo, bazo, intestino grueso y delgado. Los grupos experimentales fueron como sigue a continuación:

Grupo	Administrado	mg/kg	µg de MMAF/m ²	MMAF/MAb	N/Sexo
1	Vehículo	0	0	0	2/F
2	trastuzumab-MC-val-cit-MMAF	9,94	840	4,2	6/F
3	trastuzumab-MC-val-cit-MMAF	24,90	2105	4,2	6/F
4	trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF	10,69	840	3,9	6/F
5	trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF	26,78	2105	3,9	6/F
6	trastuzumab-MC-MMAF	10,17	840	4,1	6/F
7	trastuzumab-MC-MMAF	25,50	2105	4,1	6/F
8	trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF	21,85	2105	4,8	6/F

Para trastuzumab-MC-val-cit-MMAF, trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF, trastuzumab-MC-MMAF y trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF, el término µg de MMAF/m² se calculó usando 731,5 como el PM de MMAF y 145167 como el PM de Herceptin.

El área de superficie corporal se calculó como sigue a continuación: $[(\text{peso corporal en gramos a potencia } 0,667) \times 11,8]/10000$. (Guidance for Industry and Reviewers, 2002).

Las soluciones de dosis se administraron mediante una sola inyección en bolo intravenoso en la vena de la cola el Día del Estudio 1 con un volumen de dosis de 10 ml/kg. Los pesos corporales de los animales se midieron antes de la dosis El Día del Estudio 1 y diariamente a partir de ese momento. Se recogió sangre entera en tubos que contenían EDTA para análisis de hematología. La sangre entera se recogió en tubos separadores de suero para análisis clínico de química. Las muestras de sangre se recogieron antes de la dosis el Día del Estudio -4, Día del Estudio 3 y Día del Estudio 5. Además, se recogió sangre entera en tubos que contenían heparina sódica en el momento de la necropsia del plasma se congeló a -70 °C para un posible análisis posterior. Los siguientes tejidos se recogieron y se colocaron en formalina tamponada neutra en el momento de la necropsia: hígado, riñones, corazón, timo, bazo, cerebro, esternón secciones del tracto GI, que incluyen estómago, intestino grueso y delgado. Se examinaron el esternón, intestino delgado, intestino grueso, hígado, timo, bazo y riñón.

Los niveles de enzimas en suero asociados al hígado en cada punto temporal se compararon con un intervalo (percentil 5^º y 95^º) a partir de ratas Sprague-Dawley hembra normales. Recuentos de glóbulos blancos y plaquetas en cada punto temporal se compararon con un intervalo (percentil 5^º y 95^º) a partir de ratas Sprague-Dawley hembra normales.

Estudio de dosis elevada en ratas Sprague-Dawley hembra normales:

Grupo 1:	Vehículo
Grupo 2:	trastuzumab-MC-MMAF, 52,24 mg/kg, 4210 µg/m ²
Grupo 3:	trastuzumab-MC-MMAF, 68,25 mg/kg, 5500 µg/m ²
Grupo 4:	trastuzumab-MC-MMAF, 86,00 mg/kg, 6930 µg/m ²

Tejidos de 11 animales se sometieron a histología de rutina. Estos animales habían sido parte de un estudio de toxicidad aguda de dosis variadas usando un inmunocóncugado de trastuzumab-MC-MMAF. Se observó a los animales durante 12 días después de la dosificación.

5 Ejemplo 32 – Toxicidad/Seguridad en Mono Cynomolgus

Tres grupos de cuatro (2 machos, 2 hembras) *Macaca fascicularis* (mono cynomolgus) sin tratamiento previa se estudiaron para trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE y trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF. La administración intravenosa se realizó los dos días 1 y 22 de los estudios.

Muestra	Grupo	Dosis
Vehículo	1 1M/1F	día 1 día 22
Ejemplo de referencia de H-MC-vc-PAB-MMAE	2 2M/2F	180 µg/m ² (0,5 mg/kg) el día 1 1100 µg/m ² (3,0 mg/kg) el día 22
Ejemplo de referencia de H-MC-vc-PAB-MMAE	3 2M/2F	550 µg/m ² (1,5 mg/kg) el día 8 550 µg/m ² (1,5 mg/kg) el día 29
Ejemplo de referencia de H-MC-vc-PAB-MMAE	4 2M/2F	880 µg/m ² (2,5 mg/kg) el día 15 880 µg/m ² (2,5 mg/kg) el día 36

Muestra	Grupo	Dosis
Vehículo	1 1M/1F	día 1 día 22
H-MC-vc-PAB-MMAF	2 2M/2F	180 µg/m ² (0,5 mg/kg) el día 1 1100 µg/m ² (3,0 mg/kg) el día 22
H-MC-vc-PAB-MMAF	3 2M/2F	550 µg/m ² (1,5 mg/kg) el día 1 550 µg/m ² (1,5 mg/kg) el día 22
H-MC-vc-PAB-MMAF	4 2M/2F	880 µg/m ² (2,5 mg/kg) el día 1 880 µg/m ² (2,5 mg/kg) el día 22
H = trastuzumab		

La dosificación se expresa en el área superficial de un animal con el fin de ser relevante para otras especies, es decir la dosificación en µg/m² es independiente de las especies y por lo tanto comparable entre especies. Las formulaciones de ADC contenían PBS, fosfato sódico 5,4 mM, fosfato potásico 4,2 mM, cloruro sódico 140 mM, pH 6,5.

Se recogió sangre para dosis previa de análisis de hematología, y a los 5 min, 6 h, 10 h, y a los 1, 3, 5, 7, 14, 21 días después de cada dosis. Los recuentos de eritrocitos (RBC) y de plaquetas (PLT) se midieron con el método de dispersión de luz. El recuento de leucocitos (WBC) se midió con el método de peroxidasa/basófilos. El recuento de reticulocitos se midió con el método de dispersión de luz con tinte catiónico. Los recuentos celulares se midieron en un aparato Advia 120. ALT (alanina aminotransferasa) y AST (aspartato aminotransferasa) se midieron en U/L con UV/NADH; metodología IFCC en un aparato AU400 de Olympus, y usando ensayos de Ab ELISA - ECD/GxhuFc-HRP. Conj. Ab ELISA-MMAE/MMAF//ECD-Bio/SA-HRP Total.

Ejemplo 33 - Producción, Caracterización y Humanización de Anticuerpo Monoclonal 4D5 Anti-ErbB2

El anticuerpo monoclonal 4D5 de murino que se une específicamente al dominio extracelular de ErbB2 se produjo tal como se describe en Fendly et al. (1990) Cancer Research 50: 1550-1558. En resumen, células NIH 3T3/HER2-3₄₀₀ (que expresan aproximadamente 1 x 10⁵ moléculas de ErbB2/célula) se produjeron tal como se describe en Hudziak et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84: 7158-7163 (1987) y se cosecharon con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía EDTA 25 mM y se usó para inmunizar ratones BALB/c. Se administraron inyecciones i.p. a los ratones de 10⁷ células en 0,5 ml de PBS en las semanas 0, 2, 5 y 7. A los ratones con antisueros que inmunoprecipitaban ErbB2 marcado con ³²P se les administraron inyecciones i.p. de un extracto de membranas de ErbB2 purificado con aglutinina-Sepharose de germen de trigo (WGA) en las semanas 9 y 13. Ésto fue seguido de una inyección i.v. de 0,1 ml de la preparación de ErbB2 y los estrenos y dos se fundieron con línea de mieloma de ratón X63-Ag8.653. Dos sobrenadantes de hibridoma se identificaron sistemáticamente para la unión a ErbB2 con ELISA y radioinmunoprecipitación.

Maapeo y caracterización de epítomos

El epítomo de ErbB2 unido mediante el anticuerpo monoclonal 4D5 se determinó mediante un análisis de unión competitiva (Fendly et al. *Cancer Research* 50: 1550-1558 (1990)). Se realizaron estudios de bloqueo cruzado mediante fluorescencia directa en células intactas usando la Máquina de Cribado PANDEX™ para cuantificar la fluorescencia. El anticuerpo monoclonal se conjugó con isotiocianato de fluoresceína (FITC), usando procedimientos establecidos (Wofsy et al. *Selected Methods in Cellular Immunology*, p. 287, Mishel y Schilgi (eds.) San Francisco: W.J. Freeman Co. (1980)). Las monocapas confluentes de células NIH 3T3/HER2-3₄₀₀ se tripsinizaron, se lavaron una vez, y se volvieron a suspender a $1,75 \times 10^6$ células/ml en PBS frío que contenía albúmina de suero bovino al 0,5 % (BSA) y NaN₃ al 0,1 %. Se añadió una concentración final de partículas de látex al 1 % (IDC, Portland, OR) para reducir la obstrucción de las membranas de placa PANDEX™. Células en suspensión, 20 µl, y 20 µl de anticuerpos monoclonales purificados (de 100 µg/ml a 0,1 µg/ml) se añadieron a los pocillos de la placa PANDEX™ y se incubó en hielo durante 30 minutos. Una dilución predeterminada del anticuerpo monoclonal marcado con FITC en 20 µl se añadió a cada pocillo, se incubó durante 30 minutos, se lavó, y la fluorescencia se cuantificó con la PANDEX™. Se consideró que los anticuerpos monoclonales compartían un epítomo si cada uno bloqueaba la unión del otro en un 50 % o más en comparación con un anticuerpo monoclonal de control irrelevante. En este experimento, al anticuerpo monoclonal 4D5 se le asignó el epítomo I (restos de aminoácidos de aproximadamente 529 a aproximadamente 625, inclusive dentro del dominio extracelular de ErbB2).

Las características inhibitorias de crecimiento del anticuerpo monoclonal 4D5 se evaluaron usando la línea celular de tumor de mama, SK-BR-3 (véase Hudziak et al. (1989) *Molec. Cell. Biol.* 9 (3): 1165-1172). En resumen, se separaron células SK-BR-3 usando tripsina al 0,25 % (vol/vol) y se suspendieron en medio completo a una densidad de 4×10^5 células por ml. Se sembraron alícuotas de 100 µl (4×10^4 células) en placas de microdilución de 96 pocillos, se permitió que las células se adhirieran, y se añadieron a continuación 100 µl de de ellos solos o medios que contenían anticuerpo monoclonal (concentración final de 5 µg/ml). Después de 72 horas, las placas se lavaron dos veces con PBS (pH 7,5), se tiñeron con violeta de cristal (0,5 % en metanol), y se analizaron para la proliferación celular relativa tal como se describe en Sugarman et al. (1985) *Science* 230: 943-945. El anticuerpo monoclonal 4D5 inhibió la proliferación celular relativa de SK-BR-3 en aproximadamente un 56 %.

Además, se evaluó la capacidad del anticuerpo monoclonal 4D5 para inhibir la fosforilación de tirosina estimulada por HRG de proteínas en el intervalo M_r 180.000 a partir de lisados de células enteras de células MCF7 (Lewis et al. (1996) *Cancer Research* 56: 1457-1465). Se indica que las células MCF7 expresan todos los receptores conocidos de ErbB, pero a niveles relativamente bajos. Dado que ErbB2, ErbB3, y ErbB4 tienen tamaños moleculares casi idénticos, no es posible discernir que proteína se está convirtiendo en tirosina fosforilada cuando se evalúan lisados de células enteras mediante análisis de transferencia de Western. Sin embargo, estas células son ideales para ensayos de fosforilación con tirosina mediante HRG debido a que en las condiciones de ensayo usadas, en ausencia de HRG añadida de forma exógena, presenta niveles de bajos a indetectables de proteínas de fosforilación de tirosina en el intervalo de M_r 180.000.

Se sembraron células MCF7 en placas de 24 pocillos y se añadieron anticuerpos monoclonales a ErbB2 a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente; a continuación se añadió rHRGβ1₁₇₇₋₂₄₄ a cada pocillo hasta una concentración final de 0,2 nM, y la incubación continuó durante 8 minutos. Los medios se aspiraron cuidadosamente de cada pocillo, y las reacciones se detuvieron mediante la adición de 100 µl de tampón de muestra de SDS (SDS al 5 %, DTT 25 mM, y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Cada muestra (25 µl) se sometió a electroforesis en un gel de gradiente al 4-12 % (Novex) y a continuación se transfirieron electroforéticamente a membranas de difluoro de polivinilideno. Se desarrollaron inmunotinciones con antifosfotirosina (4G10, de UBI, usada a 1 µg/ml), y la intensidad de la banda reactiva predominante a M_r 180.000 se cuantificó mediante densitometría de reflectancia, tal como se ha descrito anteriormente (Holmes et al. (1992) *Science* 256: 1205-1210; Sliwkowski et al. *J. Biol. Chem.* 269: 14661-14665 (1994)).

El anticuerpo monoclonal 4D5 inhibió significativamente la generación de una señal de fosforilación de tirosina inducida por HRG a M_r 180.000. En ausencia de HRG, pero fue incapaz de estimular la fosforilación de tirosina de proteínas en el intervalo de M_r 180.000. Además, este anticuerpo no tiene reacción cruzada con EGFR (Fendly et al. *Cancer Research* 50: 1550-1558 (1990)), ErbB3, o ErbB4. El anticuerpo monoclonal 4D5 fue capaz de bloquear la estimulación con HRG de la fosforilación de tirosina en un 50 %.

Se evaluó el efecto inhibitor del crecimiento de anticuerpo monoclonal 4D5 en células MDA-MB-175 y SK-BR-3 en presencia o ausencia de rHRGβ1 exógeno (Schaefer et al. *Oncogene* 15: 1385-1394 (1997)). Los niveles de ErbB2 en células MDA-MB-175 son 4-6 veces más elevados que el nivel encontrado en células epiteliales de mama normales y el receptor ErbB2-ErbB4 es constitutivamente tirosina fosforilada en células MDA-MB-175. El anticuerpo monoclonal 4D5 fue capaz de inhibir la proliferación celular de células MDA-MB-175, tanto en presencia como en ausencia de HRG exógena. La inhibición de proliferación celular por 4D5 es dependiente del nivel de expresión de ErbB2 (Lewis et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 37: 255-263 (1993)). Se podría detectar una inhibición máxima de un 66 % en células SK-BR-3. Sin embargo, este efecto se podría superar con HRG exógeno.

El anticuerpo monoclonal 4D5 de murino se humanizó, usando una estrategia de "mutagénesis de conversión genética", tal como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5821337, cuya divulgación completa se incorpora expresamente por la presente por referencia. El anticuerpo monoclonal 4D5 humanizado usado en los

5

Listado de secuencias

10 <110> Doronina, Svetlana O.
Toki, Brian E.
Senter, Peter D.
Ebens, Allen J.
Polakis, Paul
15 Sliwkowski, Mark X.
Spencer, Susan D
Kline, Toni Beth

<120> COMPUESTOS DE MONOMETILVALINA CAPACES DE CONJUGACIÓN CON LIGANDOS

20 <130> 018891-001020PC

<141> 05-11-2004

25 <150> US 60/598.899
<151> 04-08-2004

<150> US 60/557.116
<151> 26-03-2004

30 <150> US 60/518.534
<151> 06-11-2003

<160> 35

35 <210> 1
<211> 502
<212> PRT
<213> Homo sapien

40 <400> 1

ES 2 456 325 T3

Met	Leu	Leu	Arg	Ser	Ala	Gly	Lys	Leu	Asn	Val	Gly	Thr	Lys	Lys
1				5					10					15
Glu	Asp	Gly	Glu	Ser	Thr	Ala	Pro	Thr	Pro	Arg	Pro	Lys	Val	Leu
				20					25					30
Arg	Cys	Lys	Cys	His	His	His	Cys	Pro	Glu	Asp	Ser	Val	Asn	Asn
				35					40					45
Ile	Cys	Ser	Thr	Asp	Gly	Tyr	Cys	Phe	Thr	Met	Ile	Glu	Glu	Asp
				50					55					60
Asp	Ser	Gly	Leu	Pro	Val	Val	Thr	Ser	Gly	Cys	Leu	Gly	Leu	Glu
				65					70					75
Gly	Ser	Asp	Phe	Gln	Cys	Arg	Asp	Thr	Pro	Ile	Pro	His	Gln	Arg
				80					85					90
Arg	Ser	Ile	Glu	Cys	Cys	Thr	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Asn	Lys	Asp
				95					100					105
Leu	His	Pro	Thr	Leu	Pro	Pro	Leu	Lys	Asn	Arg	Asp	Phe	Val	Asp
				110					115					120
Gly	Pro	Ile	His	His	Arg	Ala	Leu	Leu	Ile	Ser	Val	Thr	Val	Cys
				125					130					135

Ser	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Ile	Ile	Leu	Phe	Cys	Tyr	Phe	Arg	Tyr		140	145	150
Lys	Arg	Gln	Glu	Thr	Arg	Pro	Arg	Tyr	Ser	Ile	Gly	Leu	Glu	Gln		155	160	165
Asp	Glu	Thr	Tyr	Ile	Pro	Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Arg	Asp	Leu	Ile		170	175	180
Glu	Gln	Ser	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Leu	Pro	Leu	Leu		185	190	195
Val	Gln	Arg	Thr	Ile	Ala	Lys	Gln	Ile	Gln	Met	Val	Lys	Gln	Ile		200	205	210
Gly	Lys	Gly	Arg	Tyr	Gly	Glu	Val	Trp	Met	Gly	Lys	Trp	Arg	Gly		215	220	225
Glu	Lys	Val	Ala	Val	Lys	Val	Phe	Phe	Thr	Thr	Glu	Glu	Ala	Ser		230	235	240
Trp	Phe	Arg	Glu	Thr	Glu	Ile	Tyr	Gln	Thr	Val	Leu	Met	Arg	His		245	250	255
Glu	Asn	Ile	Leu	Gly	Phe	Ile	Ala	Ala	Asp	Ile	Lys	Gly	Thr	Gly		260	265	270
Ser	Trp	Thr	Gln	Leu	Tyr	Leu	Ile	Thr	Asp	Tyr	His	Glu	Asn	Gly		275	280	285
Ser	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Lys	Ser	Thr	Thr	Leu	Asp	Ala	Lys	Ser		290	295	300
Met	Leu	Lys	Leu	Ala	Tyr	Ser	Ser	Val	Ser	Gly	Leu	Cys	His	Leu		305	310	315
His	Thr	Glu	Ile	Phe	Ser	Thr	Gln	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Ala	His		320	325	330
Arg	Asp	Leu	Lys	Ser	Lys	Asn	Ile	Leu	Val	Lys	Lys	Asn	Gly	Thr		335	340	345
Cys	Cys	Ile	Ala	Asp	Leu	Gly	Leu	Ala	Val	Lys	Phe	Ile	Ser	Asp		350	355	360
Thr	Asn	Glu	Val	Asp	Ile	Pro	Pro	Asn	Thr	Arg	Val	Gly	Thr	Lys		365	370	375
Arg	Tyr	Met	Pro	Pro	Glu	Val	Leu	Asp	Glu	Ser	Leu	Asn	Arg	Asn		380	385	390
His	Phe	Gln	Ser	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Met	Tyr	Ser	Phe	Gly	Leu		395	400	405
Ile	Leu	Trp	Glu	Val	Ala	Arg	Arg	Cys	Val	Ser	Gly	Gly	Ile	Val		410	415	420
Glu	Glu	Tyr	Gln	Leu	Pro	Tyr	His	Asp	Leu	Val	Pro	Ser	Asp	Pro		425	430	435
Ser	Tyr	Glu	Asp	Met	Arg	Glu	Ile	Val	Cys	Ile	Lys	Lys	Leu	Arg				

				440						445					450
Pro	Ser	Phe	Pro	Asn	Arg	Trp	Ser	Ser	Asp	Glu	Cys	Leu	Arg	Gln	
				455					460					465	
Met	Gly	Lys	Leu	Met	Thr	Glu	Cys	Trp	Ala	His	Asn	Pro	Ala	Ser	
				470					475					480	
Arg	Leu	Thr	Ala	Leu	Arg	Val	Lys	Lys	Thr	Leu	Ala	Lys	Met	Ser	
				485					490					495	
Glu	Ser	Gln	Asp	Ile	Lys	Leu									
				500											

<210> 2
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 2

5

Met	Ala	Gly	Ala	Gly	Pro	Lys	Arg	Arg	Ala	Leu	Ala	Ala	Pro	Ala	1	5	10	15
Ala	Glu	Glu	Lys	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Lys	Met	Leu	Ala	Ala	Lys	20	25	30	
Ser	Ala	Asp	Gly	Ser	Ala	Pro	Ala	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Val	Thr	35	40	45	
Leu	Gln	Arg	Asn	Ile	Thr	Leu	Leu	Asn	Gly	Val	Ala	Ile	Ile	Val	50	55	60	
Gly	Thr	Ile	Ile	Gly	Ser	Gly	Ile	Phe	Val	Thr	Pro	Thr	Gly	Val	65	70	75	
Leu	Lys	Glu	Ala	Gly	Ser	Pro	Gly	Leu	Ala	Leu	Val	Val	Trp	Ala	80	85	90	
Ala	Cys	Gly	Val	Phe	Ser	Ile	Val	Gly	Ala	Leu	Cys	Tyr	Ala	Glu	95	100	105	
Leu	Gly	Thr	Thr	Ile	Ser	Lys	Ser	Gly	Gly	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Met	110	115	120	
Leu	Glu	Val	Tyr	Gly	Ser	Leu	Pro	Ala	Phe	Leu	Lys	Leu	Trp	Ile	125	130	135	
Glu	Leu	Leu	Ile	Ile	Arg	Pro	Ser	Ser	Gln	Tyr	Ile	Val	Ala	Leu	140	145	150	
Val	Phe	Ala	Thr	Tyr	Leu	Leu	Lys	Pro	Leu	Phe	Pro	Thr	Cys	Pro	155	160	165	
Val	Pro	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Leu	Val	Ala	Cys	Leu	Cys	Val	Leu	170	175	180	
Leu	Leu	Thr	Ala	Val	Asn	Cys	Tyr	Ser	Val	Lys	Ala	Ala	Thr	Arg	185	190	195	
Val	Gln	Asp	Ala	Phe	Ala	Ala	Ala	Lys	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	200	205	210	

Ile	Ile	Leu	Leu	Gly	Phe	Val	Gln	Ile	Gly	Lys	Gly	Val	Val	Ser	215	220	225
Asn	Leu	Asp	Pro	Asn	Phe	Ser	Phe	Glu	Gly	Thr	Lys	Leu	Asp	Val	230	235	240
Gly	Asn	Ile	Val	Leu	Ala	Leu	Tyr	Ser	Gly	Leu	Phe	Ala	Tyr	Gly	245	250	255
Gly	Trp	Asn	Tyr	Leu	Asn	Phe	Val	Thr	Glu	Glu	Met	Ile	Asn	Pro	260	265	270
Tyr	Arg	Asn	Leu	Pro	Leu	Ala	Ile	Ile	Ile	Ser	Leu	Pro	Ile	Val	275	280	285
Thr	Leu	Val	Tyr	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Ala	Tyr	Phe	Thr	Thr	Leu	290	295	300
Ser	Thr	Glu	Gln	Met	Leu	Ser	Ser	Glu	Ala	Val	Ala	Val	Asp	Phe	305	310	315
Gly	Asn	Tyr	His	Leu	Gly	Val	Met	Ser	Trp	Ile	Ile	Pro	Val	Phe	320	325	330
Val	Gly	Leu	Ser	Cys	Phe	Gly	Ser	Val	Asn	Gly	Ser	Leu	Phe	Thr	335	340	345
Ser	Ser	Arg	Leu	Phe	Phe	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Gly	His	Leu	Pro	350	355	360
Ser	Ile	Leu	Ser	Met	Ile	His	Pro	Gln	Leu	Leu	Thr	Pro	Val	Pro	365	370	375
Ser	Leu	Val	Phe	Thr	Cys	Val	Met	Thr	Leu	Leu	Tyr	Ala	Phe	Ser	380	385	390
Lys	Asp	Ile	Phe	Ser	Val	Ile	Asn	Phe	Phe	Ser	Phe	Phe	Asn	Trp	395	400	405
Leu	Cys	Val	Ala	Leu	Ala	Ile	Ile	Gly	Met	Ile	Trp	Leu	Arg	His	410	415	420
Arg	Lys	Pro	Glu	Leu	Glu	Arg	Pro	Ile	Lys	Val	Asn	Leu	Ala	Leu	425	430	435
Pro	Val	Phe	Phe	Ile	Leu	Ala	Cys	Leu	Phe	Leu	Ile	Ala	Val	Ser	440	445	450
Phe	Trp	Lys	Thr	Pro	Val	Glu	Cys	Gly	Ile	Gly	Phe	Thr	Ile	Ile	455	460	465
Leu	Ser	Gly	Leu	Pro	Val	Tyr	Phe	Phe	Gly	Val	Trp	Trp	Lys	Asn	470	475	480
Lys	Pro	Lys	Trp	Leu	Leu	Gln	Gly	Ile	Phe	Ser	Thr	Thr	Val	Leu	485	490	495
Cys	Gln	Lys	Leu	Met	Gln	Val	Val	Pro	Gln	Glu	Thr				500	505	

<210> 3
<211> 339

<212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 3

5

```

Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys
 1          5          10          15

Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys
          20          25          30

Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His
          35          40          45

Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu
          50          55          60

Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile
          65          70          75

Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu
          80          85          90

Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr
          95          100          105

Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met
          110          115          120

Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile
          125          130          135

Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys Lys Phe
          140          145          150

Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly
          155          160          165

Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu
          170          175          180

Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp
          185          190          195

Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu
          200          205          210

His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val
          215          220          225

Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
          230          235          240

Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser
          245          250          255

Lys Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Ile His Ala Leu
          260          265          270

Ile Phe Ala Trp Asn Lys Trp Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp

```

ES 2 456 325 T3

	275		280		285
Tyr Thr Pro Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Ile Val					
	290		295		300
Val Leu Ile Phe Lys Ser Ile Leu Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys					
	305		310		315
Lys Ile Leu Lys Ile Arg His Gly Trp Glu Asp Val Thr Lys Ile					
	320		325		330
Asn Lys Thr Glu Ile Cys Ser Gln Leu					
	335				

<210> 4
 <211> 6995
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 4

Pro	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Thr	Pro	Gly	Leu	Val	Ile	Thr	Thr	Asp	1	5	10	15
Arg	Met	Gly	Ile	Ser	Arg	Glu	Pro	Gly	Thr	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	20	25	30	
Leu	Ser	Ser	Thr	Ser	His	Glu	Arg	Leu	Thr	Thr	Leu	Glu	Asp	Thr	35	40	45	
Val	Asp	Thr	Glu	Ala	Met	Gln	Pro	Ser	Thr	His	Thr	Ala	Val	Thr	50	55	60	
Asn	Val	Arg	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	His	Glu	Ser	Gln	Ser	Ser	Val	65	70	75	
Leu	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	Pro	Lys	Ala	Thr	Ser	Pro	Met	Gly	Thr	80	85	90	
Thr	Tyr	Thr	Met	Gly	Glu	Thr	Ser	Val	Ser	Ile	Ser	Thr	Ser	Asp	95	100	105	
Phe	Phe	Glu	Thr	Ser	Arg	Ile	Gln	Ile	Glu	Pro	Thr	Ser	Ser	Leu	110	115	120	
Thr	Ser	Gly	Leu	Arg	Glu	Thr	Ser	Ser	Ser	Glu	Arg	Ile	Ser	Ser	125	130	135	
Ala	Thr	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Leu	Ser	Glu	Val	Pro	Ser	Gly	Ala	140	145	150	
Thr	Thr	Glu	Val	Ser	Arg	Thr	Glu	Val	Ile	Ser	Ser	Arg	Gly	Thr	155	160	165	
Ser	Met	Ser	Gly	Pro	Asp	Gln	Phe	Thr	Ile	Ser	Pro	Asp	Ile	Ser	170	175	180	
Thr	Glu	Ala	Ile	Thr	Arg	Leu	Ser	Thr	Ser	Pro	Ile	Met	Thr	Glu	185	190	195	
Ser	Ala	Glu	Ser	Ala	Ile	Thr	Ile	Glu	Thr	Gly	Ser	Pro	Gly	Ala	200	205	210	

Thr	Ser	Glu	Gly	Thr	Leu	Thr	Leu	Asp	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Phe	215	220	225
Trp	Ser	Gly	Thr	His	Ser	Thr	Ala	Ser	Pro	Gly	Phe	Ser	His	Ser	230	235	240
Glu	Met	Thr	Thr	Leu	Met	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Asp	Val	Pro	Trp	245	250	255
Pro	Ser	Leu	Pro	Ser	Val	Glu	Glu	Ala	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	260	265	270
Leu	Ser	Ser	Pro	Ala	Met	Thr	Ser	Thr	Ser	Phe	Phe	Ser	Thr	Leu	275	280	285
Pro	Glu	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	290	295	300
Thr	Leu	Gly	Pro	Val	Lys	Thr	Thr	Asp	Met	Leu	Arg	Thr	Ser	Ser	305	310	315
Glu	Pro	Glu	Thr	Ser	Ser	Pro	Pro	Asn	Leu	Ser	Ser	Thr	Ser	Ala	320	325	330
Glu	Ile	Leu	Ala	Thr	Ser	Glu	Val	Thr	Lys	Asp	Arg	Glu	Lys	Ile	335	340	345
His	Pro	Ser	Ser	Asn	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Val	Gly	Thr	Val	Ile	350	355	360
Tyr	Lys	His	Leu	Ser	Pro	Ser	Ser	Val	Leu	Ala	Asp	Leu	Val	Thr	365	370	375
Thr	Lys	Pro	Thr	Ser	Pro	Met	Ala	Thr	Thr	Ser	Thr	Leu	Gly	Asn	380	385	390
Thr	Ser	Val	Ser	Thr	Ser	Thr	Pro	Ala	Phe	Pro	Glu	Thr	Met	Met	395	400	405
Thr	Gln	Pro	Thr	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Gly	Leu	Arg	Glu	Ile	Ser	410	415	420
Thr	Ser	Gln	Glu	Thr	Ser	Ser	Ala	Thr	Glu	Arg	Ser	Ala	Ser	Leu	425	430	435
Ser	Gly	Met	Pro	Thr	Gly	Ala	Thr	Thr	Lys	Val	Ser	Arg	Thr	Glu	440	445	450
Ala	Leu	Ser	Leu	Gly	Arg	Thr	Ser	Thr	Pro	Gly	Pro	Ala	Gln	Ser	455	460	465
Thr	Ile	Ser	Pro	Glu	Ile	Ser	Thr	Glu	Thr	Ile	Thr	Arg	Ile	Ser	470	475	480
Thr	Pro	Leu	Thr	Thr	Thr	Gly	Ser	Ala	Glu	Met	Thr	Ile	Thr	Pro	485	490	495
Lys	Thr	Gly	His	Ser	Gly	Ala	Ser	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Leu	500	505	510

Asp	Thr	Ser	Ser	Arg	Ala	Ser	Trp	Pro	Gly	Thr	His	Ser	Ala	Ala	515	520	525
Thr	His	Arg	Ser	Pro	His	Ser	Gly	Met	Thr	Thr	Pro	Met	Ser	Arg	530	535	540
Gly	Pro	Glu	Asp	Val	Ser	Trp	Pro	Ser	Arg	Pro	Ser	Val	Glu	Lys	545	550	555
Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Ser	Leu	Val	Ser	Leu	Ser	Ala	Val	Thr	Ser	560	565	570
Pro	Ser	Pro	Leu	Tyr	Ser	Thr	Pro	Ser	Glu	Ser	Ser	His	Ser	Ser	575	580	585
Pro	Leu	Arg	Val	Thr	Ser	Leu	Phe	Thr	Pro	Val	Met	Met	Lys	Thr	590	595	600
Thr	Asp	Met	Leu	Asp	Thr	Ser	Leu	Glu	Pro	Val	Thr	Thr	Ser	Pro	605	610	615
Pro	Ser	Met	Asn	Ile	Thr	Ser	Asp	Glu	Ser	Leu	Ala	Thr	Ser	Lys	620	625	630
Ala	Thr	Met	Glu	Thr	Glu	Ala	Ile	Gln	Leu	Ser	Glu	Asn	Thr	Ala	635	640	645
Val	Thr	Gln	Met	Gly	Thr	Ile	Ser	Ala	Arg	Gln	Glu	Phe	Tyr	Ser	650	655	660
Ser	Tyr	Pro	Gly	Leu	Pro	Glu	Pro	Ser	Lys	Val	Thr	Ser	Pro	Val	665	670	675
Val	Thr	Ser	Ser	Thr	Ile	Lys	Asp	Ile	Val	Ser	Thr	Thr	Ile	Pro	680	685	690
Ala	Ser	Ser	Glu	Ile	Thr	Arg	Ile	Glu	Met	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	695	700	705
Leu	Thr	Pro	Thr	Pro	Arg	Glu	Thr	Ser	Thr	Ser	Gln	Glu	Ile	His	710	715	720
Ser	Ala	Thr	Lys	Pro	Ser	Thr	Val	Pro	Tyr	Lys	Ala	Leu	Thr	Ser	725	730	735
Ala	Thr	Ile	Glu	Asp	Ser	Met	Thr	Gln	Val	Met	Ser	Ser	Ser	Arg	740	745	750
Gly	Pro	Ser	Pro	Asp	Gln	Ser	Thr	Met	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Thr	755	760	765
Glu	Val	Ile	Thr	Arg	Leu	Ser	Thr	Ser	Pro	Ile	Lys	Thr	Glu	Ser	770	775	780
Thr	Glu	Met	Thr	Ile	Thr	Thr	Gln	Thr	Gly	Ser	Pro	Gly	Ala	Thr	785	790	795
Ser	Arg	Gly	Thr	Leu	Thr	Leu	Asp	Thr	Ser	Thr	Thr	Phe	Met	Ser	800	805	810
Gly	Thr	His	Ser	Thr	Ala	Ser	Gln	Gly	Phe	Ser	His	Ser	Gln	Met			

	815		820		825
Thr Ala Leu Met	Ser Arg Thr Pro Gly	Glu Val Pro Trp Leu	Ser		
	830		835		840
His Pro Ser Val	Glu Glu Ala Ser Ser	Ala Ser Phe Ser Leu	Ser		
	845		850		855
Ser Pro Val Met	Thr Ser Ser Ser Pro	Val Ser Ser Thr Leu	Pro		
	860		865		870
Asp Ser Ile His	Ser Ser Ser Leu Pro	Val Thr Ser Leu Leu	Thr		
	875		880		885
Ser Gly Leu Val	Lys Thr Thr Glu Leu	Leu Gly Thr Ser Ser	Glu		
	890		895		900
Pro Glu Thr Ser	Ser Pro Pro Asn Leu	Ser Ser Thr Ser Ala	Glu		
	905		910		915
Ile Leu Ala Thr	Thr Glu Val Thr Thr	Asp Thr Glu Lys Leu	Glu		
	920		925		930
Met Thr Asn Val	Val Thr Ser Gly Tyr	Thr His Glu Ser Pro	Ser		
	935		940		945
Ser Val Leu Ala	Asp Ser Val Thr Thr	Lys Ala Thr Ser Ser	Met		
	950		955		960
Gly Ile Thr Tyr	Pro Thr Gly Asp Thr	Asn Val Leu Thr Ser	Thr		
	965		970		975
Pro Ala Phe Ser	Asp Thr Ser Arg Ile	Gln Thr Lys Ser Lys	Leu		
	980		985		990
Ser Leu Thr Pro	Gly Leu Met Glu Thr	Ser Ile Ser Glu Glu	Thr		
	995		1000		1005
Ser Ser Ala Thr	Glu Lys Ser Thr Val	Leu Ser Ser Val Pro	Thr		
	1010		1015		1020
Gly Ala Thr Thr	Glu Val Ser Arg Thr	Glu Ala Ile Ser Ser	Ser		
	1025		1030		1035
Arg Thr Ser Ile	Pro Gly Pro Ala Gln	Ser Thr Met Ser Ser	Asp		
	1040		1045		1050
Thr Ser Met Glu	Thr Ile Thr Arg Ile	Ser Thr Pro Leu Thr	Arg		
	1055		1060		1065
Lys Glu Ser Thr	Asp Met Ala Ile Thr	Pro Lys Thr Gly Pro	Ser		
	1070		1075		1080
Gly Ala Thr Ser	Gln Gly Thr Phe Thr	Leu Asp Ser Ser Ser	Thr		
	1085		1090		1095
Ala Ser Trp Pro	Gly Thr His Ser Ala	Thr Thr Gln Arg Phe	Pro		
	1100		1105		1110
Arg Ser Val Val	Thr Thr Pro Met Ser	Arg Gly Pro Glu Asp	Val		
	1115		1120		1125

Ser Trp Pro Ser Pro Leu Ser Val Glu Lys Asn Ser Pro Pro Ser	1130	1135	1140
Ser Leu Val Ser Ser Ser Ser Val Thr Ser Pro Ser Pro Leu Tyr	1145	1150	1155
Ser Thr Pro Ser Gly Ser Ser His Ser Ser Pro Val Pro Val Thr	1160	1165	1170
Ser Leu Phe Thr Ser Ile Met Met Lys Ala Thr Asp Met Leu Asp	1175	1180	1185
Ala Ser Leu Glu Pro Glu Thr Thr Ser Ala Pro Asn Met Asn Ile	1190	1195	1200
Thr Ser Asp Glu Ser Leu Ala Ala Ser Lys Ala Thr Thr Glu Thr	1205	1210	1215
Glu Ala Ile His Val Phe Glu Asn Thr Ala Ala Ser His Val Glu	1220	1225	1230
Thr Thr Ser Ala Thr Glu Glu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro Gly Phe	1235	1240	1245
Ser Glu Pro Thr Lys Val Ile Ser Pro Val Val Thr Ser Ser Ser	1250	1255	1260
Ile Arg Asp Asn Met Val Ser Thr Thr Met Pro Gly Ser Ser Gly	1265	1270	1275
Ile Thr Arg Ile Glu Ile Glu Ser Met Ser Ser Leu Thr Pro Gly	1280	1285	1290
Leu Arg Glu Thr Arg Thr Ser Gln Asp Ile Thr Ser Ser Thr Glu	1295	1300	1305
Thr Ser Thr Val Leu Tyr Lys Met Pro Ser Gly Ala Thr Pro Glu	1310	1315	1320
Val Ser Arg Thr Glu Val Met Pro Ser Ser Arg Thr Ser Ile Pro	1325	1330	1335
Gly Pro Ala Gln Ser Thr Met Ser Leu Asp Ile Ser Asp Glu Val	1340	1345	1350
Val Thr Arg Leu Ser Thr Ser Pro Ile Met Thr Glu Ser Ala Glu	1355	1360	1365
Ile Thr Ile Thr Thr Gln Thr Gly Tyr Ser Leu Ala Thr Ser Gln	1370	1375	1380
Val Thr Leu Pro Leu Gly Thr Ser Met Thr Phe Leu Ser Gly Thr	1385	1390	1395
His Ser Thr Met Ser Gln Gly Leu Ser His Ser Glu Met Thr Asn	1400	1405	1410
Leu Met Ser Arg Gly Pro Glu Ser Leu Ser Trp Thr Ser Pro Arg	1415	1420	1425

Phe Val Glu Thr Thr Arg Ser Ser Ser Ser Leu Thr Ser Leu Pro	1430	1435	1440
Leu Thr Thr Ser Leu Ser Pro Val Ser Ser Thr Leu Leu Asp Ser	1445	1450	1455
Ser Pro Ser Ser Pro Leu Pro Val Thr Ser Leu Ile Leu Pro Gly	1460	1465	1470
Leu Val Lys Thr Thr Glu Val Leu Asp Thr Ser Ser Glu Pro Lys	1475	1480	1485
Thr Ser Ser Ser Pro Asn Leu Ser Ser Thr Ser Val Glu Ile Pro	1490	1495	1500
Ala Thr Ser Glu Ile Met Thr Asp Thr Glu Lys Ile His Pro Ser	1505	1510	1515
Ser Asn Thr Ala Val Ala Lys Val Arg Thr Ser Ser Ser Val His	1520	1525	1530
Glu Ser His Ser Ser Val Leu Ala Asp Ser Glu Thr Thr Ile Thr	1535	1540	1545
Ile Pro Ser Met Gly Ile Thr Ser Ala Val Glu Asp Thr Thr Val	1550	1555	1560
Phe Thr Ser Asn Pro Ala Phe Ser Glu Thr Arg Arg Ile Pro Thr	1565	1570	1575
Glu Pro Thr Phe Ser Leu Thr Pro Gly Phe Arg Glu Thr Ser Thr	1580	1585	1590
Ser Glu Glu Thr Thr Ser Ile Thr Glu Thr Ser Ala Val Leu Phe	1595	1600	1605
Gly Val Pro Thr Ser Ala Thr Thr Glu Val Ser Met Thr Glu Ile	1610	1615	1620
Met Ser Ser Asn Arg Thr His Ile Pro Asp Ser Asp Gln Ser Thr	1625	1630	1635
Met Ser Pro Asp Ile Ile Thr Glu Val Ile Thr Arg Leu Ser Ser	1640	1645	1650
Ser Ser Met Met Ser Glu Ser Thr Gln Met Thr Ile Thr Thr Gln	1655	1660	1665
Lys Ser Ser Pro Gly Ala Thr Ala Gln Ser Thr Leu Thr Leu Ala	1670	1675	1680
Thr Thr Thr Ala Pro Leu Ala Arg Thr His Ser Thr Val Pro Pro	1685	1690	1695
Arg Phe Leu His Ser Glu Met Thr Thr Leu Met Ser Arg Ser Pro	1700	1705	1710
Glu Asn Pro Ser Trp Lys Ser Ser Pro Phe Val Glu Lys Thr Ser	1715	1720	1725
Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser Leu Pro Val Thr Thr Ser Pro Ser			

1730	1735	1740
Val Ser Ser Thr Leu Pro Gln Ser Ile Pro Ser Ser Ser Phe Ser 1745	1750	1755
Val Thr Ser Leu Leu Thr Pro Gly Met Val Lys Thr Thr Asp Thr 1760	1765	1770
Ser Thr Glu Pro Gly Thr Ser Leu Ser Pro Asn Leu Ser Gly Thr 1775	1780	1785
Ser Val Glu Ile Leu Ala Ala Ser Glu Val Thr Thr Asp Thr Glu 1790	1795	1800
Lys Ile His Pro Ser Ser Ser Met Ala Val Thr Asn Val Gly Thr 1805	1810	1815
Thr Ser Ser Gly His Glu Leu Tyr Ser Ser Val Ser Ile His Ser 1820	1825	1830
Glu Pro Ser Lys Ala Thr Tyr Pro Val Gly Thr Pro Ser Ser Met 1835	1840	1845
Ala Glu Thr Ser Ile Ser Thr Ser Met Pro Ala Asn Phe Glu Thr 1850	1855	1860
Thr Gly Phe Glu Ala Glu Pro Phe Ser His Leu Thr Ser Gly Leu 1865	1870	1875
Arg Lys Thr Asn Met Ser Leu Asp Thr Ser Ser Val Thr Pro Thr 1880	1885	1890
Asn Thr Pro Ser Ser Pro Gly Ser Thr His Leu Leu Gln Ser Ser 1895	1900	1905
Lys Thr Asp Phe Thr Ser Ser Ala Lys Thr Ser Ser Pro Asp Trp 1910	1915	1920
Pro Pro Ala Ser Gln Tyr Thr Glu Ile Pro Val Asp Ile Ile Thr 1925	1930	1935
Pro Phe Asn Ala Ser Pro Ser Ile Thr Glu Ser Thr Gly Ile Thr 1940	1945	1950
Ser Phe Pro Glu Ser Arg Phe Thr Met Ser Val Thr Glu Ser Thr 1955	1960	1965
His His Leu Ser Thr Asp Leu Leu Pro Ser Ala Glu Thr Ile Ser 1970	1975	1980
Thr Gly Thr Val Met Pro Ser Leu Ser Glu Ala Met Thr Ser Phe 1985	1990	1995
Ala Thr Thr Gly Val Pro Arg Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Pro 2000	2005	2010
Phe Ser Arg Thr Glu Ser Gly Pro Gly Asp Ala Thr Leu Ser Thr 2015	2020	2025
Ile Ala Glu Ser Leu Pro Ser Ser Thr Pro Val Pro Phe Ser Ser 2030	2035	2040

Ser Thr Phe Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Ile Pro Ala Leu His	2045	2050	2055
Glu Ile Thr Ser Ser Ser Ala Thr Pro Tyr Arg Val Asp Thr Ser	2060	2065	2070
Leu Gly Thr Glu Ser Ser Thr Thr Glu Gly Arg Leu Val Met Val	2075	2080	2085
Ser Thr Leu Asp Thr Ser Ser Gln Pro Gly Arg Thr Ser Ser Ser	2090	2095	2100
Pro Ile Leu Asp Thr Arg Met Thr Glu Ser Val Glu Leu Gly Thr	2105	2110	2115
Val Thr Ser Ala Tyr Gln Val Pro Ser Leu Ser Thr Arg Leu Thr	2120	2125	2130
Arg Thr Asp Gly Ile Met Glu His Ile Thr Lys Ile Pro Asn Glu	2135	2140	2145
Ala Ala His Arg Gly Thr Ile Arg Pro Val Lys Gly Pro Gln Thr	2150	2155	2160
Ser Thr Ser Pro Ala Ser Pro Lys Gly Leu His Thr Gly Gly Thr	2165	2170	2175
Lys Arg Met Glu Thr Thr Thr Thr Ala Leu Lys Thr Thr Thr Thr	2180	2185	2190
Ala Leu Lys Thr Thr Ser Arg Ala Thr Leu Thr Thr Ser Val Tyr	2195	2200	2205
Thr Pro Thr Leu Gly Thr Leu Thr Pro Leu Asn Ala Ser Met Gln	2210	2215	2220
Met Ala Ser Thr Ile Pro Thr Glu Met Met Ile Thr Thr Pro Tyr	2225	2230	2235
Val Phe Pro Asp Val Pro Glu Thr Thr Ser Ser Leu Ala Thr Ser	2240	2245	2250
Leu Gly Ala Glu Thr Ser Thr Ala Leu Pro Arg Thr Thr Pro Ser	2255	2260	2265
Val Phe Asn Arg Glu Ser Glu Thr Thr Ala Ser Leu Val Ser Arg	2270	2275	2280
Ser Gly Ala Glu Arg Ser Pro Val Ile Gln Thr Leu Asp Val Ser	2285	2290	2295
Ser Ser Glu Pro Asp Thr Thr Ala Ser Trp Val Ile His Pro Ala	2300	2305	2310
Glu Thr Ile Pro Thr Val Ser Lys Thr Thr Pro Asn Phe Phe His	2315	2320	2325
Ser Glu Leu Asp Thr Val Ser Ser Thr Ala Thr Ser His Gly Ala	2330	2335	2340

Asp Val Ser Ser Ala Ile Pro Thr Asn Ile Ser Pro Ser Glu Leu	2345	2350	2355
Asp Ala Leu Thr Pro Leu Val Thr Ile Ser Gly Thr Asp Thr Ser	2360	2365	2370
Thr Thr Phe Pro Thr Leu Thr Lys Ser Pro His Glu Thr Glu Thr	2375	2380	2385
Arg Thr Thr Trp Leu Thr His Pro Ala Glu Thr Ser Ser Thr Ile	2390	2395	2400
Pro Arg Thr Ile Pro Asn Phe Ser His His Glu Ser Asp Ala Thr	2405	2410	2415
Pro Ser Ile Ala Thr Ser Pro Gly Ala Glu Thr Ser Ser Ala Ile	2420	2425	2430
Pro Ile Met Thr Val Ser Pro Gly Ala Glu Asp Leu Val Thr Ser	2435	2440	2445
Gln Val Thr Ser Ser Gly Thr Asp Arg Asn Met Thr Ile Pro Thr	2450	2455	2460
Leu Thr Leu Ser Pro Gly Glu Pro Lys Thr Ile Ala Ser Leu Val	2465	2470	2475
Thr His Pro Glu Ala Gln Thr Ser Ser Ala Ile Pro Thr Ser Thr	2480	2485	2490
Ile Ser Pro Ala Val Ser Arg Leu Val Thr Ser Met Val Thr Ser	2495	2500	2505
Leu Ala Ala Lys Thr Ser Thr Thr Asn Arg Ala Leu Thr Asn Ser	2510	2515	2520
Pro Gly Glu Pro Ala Thr Thr Val Ser Leu Val Thr His Ser Ala	2525	2530	2535
Gln Thr Ser Pro Thr Val Pro Trp Thr Thr Ser Ile Phe Phe His	2540	2545	2550
Ser Lys Ser Asp Thr Thr Pro Ser Met Thr Thr Ser His Gly Ala	2555	2560	2565
Glu Ser Ser Ser Ala Val Pro Thr Pro Thr Val Ser Thr Glu Val	2570	2575	2580
Pro Gly Val Val Thr Pro Leu Val Thr Ser Ser Arg Ala Val Ile	2585	2590	2595
Ser Thr Thr Ile Pro Ile Leu Thr Leu Ser Pro Gly Glu Pro Glu	2600	2605	2610
Thr Thr Pro Ser Met Ala Thr Ser His Gly Glu Glu Ala Ser Ser	2615	2620	2625
Ala Ile Pro Thr Pro Thr Val Ser Pro Gly Val Pro Gly Val Val	2630	2635	2640
Thr Ser Leu Val Thr Ser Ser Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Ile			

2645	2650	2655
Pro Ile Leu Thr Phe Ser Leu Gly Glu Pro Glu Thr Thr Pro Ser		
2660	2665	2670
Met Ala Thr Ser His Gly Thr Glu Ala Gly Ser Ala Val Pro Thr		
2675	2680	2685
Val Leu Pro Glu Val Pro Gly Met Val Thr Ser Leu Val Ala Ser		
2690	2695	2700
Ser Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Leu Pro Thr Leu Thr Leu Ser		
2705	2710	2715
Pro Gly Glu Pro Glu Thr Thr Pro Ser Met Ala Thr Ser His Gly		
2720	2725	2730
Ala Glu Ala Ser Ser Thr Val Pro Thr Val Ser Pro Glu Val Pro		
2735	2740	2745
Gly Val Val Thr Ser Leu Val Thr Ser Ser Ser Gly Val Asn Ser		
2750	2755	2760
Thr Ser Ile Pro Thr Leu Ile Leu Ser Pro Gly Glu Leu Glu Thr		
2765	2770	2775
Thr Pro Ser Met Ala Thr Ser His Gly Ala Glu Ala Ser Ser Ala		
2780	2785	2790
Val Pro Thr Pro Thr Val Ser Pro Gly Val Ser Gly Val Val Thr		
2795	2800	2805
Pro Leu Val Thr Ser Ser Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Ile Pro		
2810	2815	2820
Ile Leu Thr Leu Ser Ser Ser Glu Pro Glu Thr Thr Pro Ser Met		
2825	2830	2835
Ala Thr Ser His Gly Val Glu Ala Ser Ser Ala Val Leu Thr Val		
2840	2845	2850
Ser Pro Glu Val Pro Gly Met Val Thr Phe Leu Val Thr Ser Ser		
2855	2860	2865
Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Ile Pro Thr Leu Thr Ile Ser Ser		
2870	2875	2880
Asp Glu Pro Glu Thr Thr Thr Ser Leu Val Thr His Ser Glu Ala		
2885	2890	2895
Lys Met Ile Ser Ala Ile Pro Thr Leu Gly Val Ser Pro Thr Val		
2900	2905	2910
Gln Gly Leu Val Thr Ser Leu Val Thr Ser Ser Gly Ser Glu Thr		
2915	2920	2925
Ser Ala Phe Ser Asn Leu Thr Val Ala Ser Ser Gln Pro Glu Thr		
2930	2935	2940
Ile Asp Ser Trp Val Ala His Pro Gly Thr Glu Ala Ser Ser Val		
2945	2950	2955

Val	Pro	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Thr	Gly	Glu	Pro	Phe	Thr	Asn	Ile			
				2960					2965					2970			
Ser	Leu	Val	Thr	His	Pro	Ala	Glu	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Pro	Arg			
				2975					2980					2985			
Thr	Thr	Ser	Arg	Phe	Ser	His	Ser	Glu	Leu	Asp	Thr	Met	Pro	Ser			
				2990					2995					3000			
Thr	Val	Thr	Ser	Pro	Glu	Ala	Glu	Ser	Ser	Ser	Ala	Ile	Ser	Thr			
				3005					3010					3015			
Thr	Ile	Ser	Pro	Gly	Ile	Pro	Gly	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Val	Thr			
				3020					3025					3030			
Ser	Ser	Gly	Arg	Asp	Ile	Ser	Ala	Thr	Phe	Pro	Thr	Val	Pro	Glu			
				3035					3040					3045			
Ser	Pro	His	Glu	Ser	Glu	Ala	Thr	Ala	Ser	Trp	Val	Thr	His	Pro			
				3050					3055					3060			
Ala	Val	Thr	Ser	Thr	Thr	Val	Pro	Arg	Thr	Thr	Pro	Asn	Tyr	Ser			
				3065					3070					3075			
His	Ser	Glu	Pro	Asp	Thr	Thr	Pro	Ser	Ile	Ala	Thr	Ser	Pro	Gly			
				3080					3085					3090			
Ala	Glu	Ala	Thr	Ser	Asp	Phe	Pro	Thr	Ile	Thr	Val	Ser	Pro	Asp			
				3095					3100					3105			
Val	Pro	Asp	Met	Val	Thr	Ser	Gln	Val	Thr	Ser	Ser	Gly	Thr	Asp			
				3110					3115					3120			
Thr	Ser	Ile	Thr	Ile	Pro	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Ser	Gly	Glu	Pro			
				3125					3130					3135			
Glu	Thr	Thr	Thr	Ser	Phe	Ile	Thr	Tyr	Ser	Glu	Thr	His	Thr	Ser			
				3140					3145					3150			
Ser	Ala	Ile	Pro	Thr	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Asp	Ala	Ser	Lys	Met			
				3155					3160					3165			
Leu	Thr	Ser	Leu	Val	Ile	Ser	Ser	Gly	Thr	Asp	Ser	Thr	Thr	Thr			
				3170					3175					3180			
Phe	Pro	Thr	Leu	Thr	Glu	Thr	Pro	Tyr	Glu	Pro	Glu	Thr	Thr	Ala			
				3185					3190					3195			
Ile	Gln	Leu	Ile	His	Pro	Ala	Glu	Thr	Asn	Thr	Met	Val	Pro	Arg			
				3200					3205					3210			
Thr	Thr	Pro	Lys	Phe	Ser	His	Ser	Lys	Ser	Asp	Thr	Thr	Leu	Pro			
				3215					3220					3225			
Val	Ala	Ile	Thr	Ser	Pro	Gly	Pro	Glu	Ala	Ser	Ser	Ala	Val	Ser			
				3230					3235					3240			
Thr	Thr	Thr	Ile	Ser	Pro	Asp	Met	Ser	Asp	Leu	Val	Thr	Ser	Leu			
				3245					3250					3255			

Val Pro Ser Ser Gly Thr Asp Thr Ser Thr Thr Phe Pro Thr Leu	3260	3265	3270
Ser Glu Thr Pro Tyr Glu Pro Glu Thr Thr Ala Thr Trp Leu Thr	3275	3280	3285
His Pro Ala Glu Thr Ser Thr Thr Val Ser Gly Thr Ile Pro Asn	3290	3295	3300
Phe Ser His Arg Gly Ser Asp Thr Ala Pro Ser Met Val Thr Ser	3305	3310	3315
Pro Gly Val Asp Thr Arg Ser Gly Val Pro Thr Thr Thr Ile Pro	3320	3325	3330
Pro Ser Ile Pro Gly Val Val Thr Ser Gln Val Thr Ser Ser Ala	3335	3340	3345
Thr Asp Thr Ser Thr Ala Ile Pro Thr Leu Thr Pro Ser Pro Gly	3350	3355	3360
Glu Pro Glu Thr Thr Ala Ser Ser Ala Thr His Pro Gly Thr Gln	3365	3370	3375
Thr Gly Phe Thr Val Pro Ile Arg Thr Val Pro Ser Ser Glu Pro	3380	3385	3390
Asp Thr Met Ala Ser Trp Val Thr His Pro Pro Gln Thr Ser Thr	3395	3400	3405
Pro Val Ser Arg Thr Thr Ser Ser Phe Ser His Ser Ser Pro Asp	3410	3415	3420
Ala Thr Pro Val Met Ala Thr Ser Pro Arg Thr Glu Ala Ser Ser	3425	3430	3435
Ala Val Leu Thr Thr Ile Ser Pro Gly Ala Pro Glu Met Val Thr	3440	3445	3450
Ser Gln Ile Thr Ser Ser Gly Ala Ala Thr Ser Thr Thr Val Pro	3455	3460	3465
Thr Leu Thr His Ser Pro Gly Met Pro Glu Thr Thr Ala Leu Leu	3470	3475	3480
Ser Thr His Pro Arg Thr Glu Thr Ser Lys Thr Phe Pro Ala Ser	3485	3490	3495
Thr Val Phe Pro Gln Val Ser Glu Thr Thr Ala Ser Leu Thr Ile	3500	3505	3510
Arg Pro Gly Ala Glu Thr Ser Thr Ala Leu Pro Thr Gln Thr Thr	3515	3520	3525
Ser Ser Leu Phe Thr Leu Leu Val Thr Gly Thr Ser Arg Val Asp	3530	3535	3540
Leu Ser Pro Thr Ala Ser Pro Gly Val Ser Ala Lys Thr Ala Pro	3545	3550	3555
Leu Ser Thr His Pro Gly Thr Glu Thr Ser Thr Met Ile Pro Thr			

3560	3565	3570
Ser Thr Leu Ser Leu Gly Leu Leu Glu Thr Thr Gly Leu Leu Ala		
3575	3580	3585
Thr Ser Ser Ser Ala Glu Thr Ser Thr Ser Thr Leu Thr Leu Thr		
3590	3595	3600
Val Ser Pro Ala Val Ser Gly Leu Ser Ser Ala Ser Ile Thr Thr		
3605	3610	3615
Asp Lys Pro Gln Thr Val Thr Ser Trp Asn Thr Glu Thr Ser Pro		
3620	3625	3630
Ser Val Thr Ser Val Gly Pro Pro Glu Phe Ser Arg Thr Val Thr		
3635	3640	3645
Gly Thr Thr Met Thr Leu Ile Pro Ser Glu Met Pro Thr Pro Pro		
3650	3655	3660
Lys Thr Ser His Gly Glu Gly Val Ser Pro Thr Thr Ile Leu Arg		
3665	3670	3675
Thr Thr Met Val Glu Ala Thr Asn Leu Ala Thr Thr Gly Ser Ser		
3680	3685	3690
Pro Thr Val Ala Lys Thr Thr Thr Thr Phe Asn Thr Leu Ala Gly		
3695	3700	3705
Ser Leu Phe Thr Pro Leu Thr Thr Pro Gly Met Ser Thr Leu Ala		
3710	3715	3720
Ser Glu Ser Val Thr Ser Arg Thr Ser Tyr Asn His Arg Ser Trp		
3725	3730	3735
Ile Ser Thr Thr Ser Ser Tyr Asn Arg Arg Tyr Trp Thr Pro Ala		
3740	3745	3750
Thr Ser Thr Pro Val Thr Ser Thr Phe Ser Pro Gly Ile Ser Thr		
3755	3760	3765
Ser Ser Ile Pro Ser Ser Thr Ala Ala Thr Val Pro Phe Met Val		
3770	3775	3780
Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Glu Glu		
3785	3790	3795
Asp Met Arg His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Ala Thr Glu Arg		
3800	3805	3810
Glu Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu Phe Arg Asn Ser Ser Leu		
3815	3820	3825
Glu Tyr Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Ala Ser Leu Arg Pro Glu		
3830	3835	3840
Lys Asp Ser Ser Ala Thr Ala Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg		
3845	3850	3855
Pro Asp Pro Glu Asp Leu Gly Leu Asp Arg Glu Arg Leu Tyr Trp		
3860	3865	3870

Glu Leu Ser Asn Leu Thr Asn Gly Ile Gln Glu Leu Gly Pro Tyr	3875	3880	3885
Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg	3890	3895	3900
Ser Ser Met Pro Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser Thr Val Asp	3905	3910	3915
Val Gly Thr Ser Gly Thr Pro Ser Ser Ser Pro Ser Pro Thr Thr	3920	3925	3930
Ala Gly Pro Leu Leu Met Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr	3935	3940	3945
Asn Leu Gln Tyr Glu Glu Asp Met Arg Arg Thr Gly Ser Arg Lys	3950	3955	3960
Phe Asn Thr Met Glu Ser Val Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu	3965	3970	3975
Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu	3980	3985	3990
Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp	3995	4000	4005
Ala Ile Cys Thr His Arg Leu Asp Pro Lys Ser Pro Gly Leu Asn	4010	4015	4020
Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Lys Leu Thr Asn Asp Ile	4025	4030	4035
Glu Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val	4040	4045	4050
Asn Gly Phe Thr His Gln Ser Ser Val Ser Thr Thr Ser Thr Pro	4055	4060	4065
Gly Thr Ser Thr Val Asp Leu Arg Thr Ser Gly Thr Pro Ser Ser	4070	4075	4080
Leu Ser Ser Pro Thr Ile Met Ala Ala Gly Pro Leu Leu Val Pro	4085	4090	4095
Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Glu Asp	4100	4105	4110
Met Gly His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val	4115	4120	4125
Leu Gln Gly Leu Leu Gly Pro Ile Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly	4130	4135	4140
Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Ser Leu Arg Ser Glu Lys	4145	4150	4155
Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys Ile His His Leu	4160	4165	4170

Asp	Pro	Lys	Ser	Pro	Gly	Leu	Asn	Arg	Glu	Arg	Leu	Tyr	Trp	Glu		4175	4180	4185
Leu	Ser	Gln	Leu	Thr	Asn	Gly	Ile	Lys	Glu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Thr		4190	4195	4200
Leu	Asp	Arg	Asn	Ser	Leu	Tyr	Val	Asn	Gly	Phe	Thr	His	Arg	Thr		4205	4210	4215
Ser	Val	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Val	Asp	Leu		4220	4225	4230
Gly	Thr	Ser	Gly	Thr	Pro	Phe	Ser	Leu	Pro	Ser	Pro	Ala	Thr	Ala		4235	4240	4245
Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Phe	Thr	Leu	Asn	Phe	Thr	Ile	Thr	Asn		4250	4255	4260
Leu	Lys	Tyr	Glu	Glu	Asp	Met	His	Arg	Pro	Gly	Ser	Arg	Lys	Phe		4265	4270	4275
Asn	Thr	Thr	Glu	Arg	Val	Leu	Gln	Thr	Leu	Val	Gly	Pro	Met	Phe		4280	4285	4290
Lys	Asn	Thr	Ser	Val	Gly	Leu	Leu	Tyr	Ser	Gly	Cys	Arg	Leu	Thr		4295	4300	4305
Leu	Leu	Arg	Ser	Glu	Lys	Asp	Gly	Ala	Ala	Thr	Gly	Val	Asp	Ala		4310	4315	4320
Ile	Cys	Thr	His	Arg	Leu	Asp	Pro	Lys	Ser	Pro	Gly	Val	Asp	Arg		4325	4330	4335
Glu	Gln	Leu	Tyr	Trp	Glu	Leu	Ser	Gln	Leu	Thr	Asn	Gly	Ile	Lys		4340	4345	4350
Glu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Thr	Leu	Asp	Arg	Asn	Ser	Leu	Tyr	Val	Asn		4355	4360	4365
Gly	Phe	Thr	His	Trp	Ile	Pro	Val	Pro	Thr	Ser	Ser	Thr	Pro	Gly		4370	4375	4380
Thr	Ser	Thr	Val	Asp	Leu	Gly	Ser	Gly	Thr	Pro	Ser	Ser	Leu	Pro		4385	4390	4395
Ser	Pro	Thr	Ser	Ala	Thr	Ala	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Pro	Phe	Thr		4400	4405	4410
Leu	Asn	Phe	Thr	Ile	Thr	Asn	Leu	Lys	Tyr	Glu	Glu	Asp	Met	His		4415	4420	4425
Cys	Pro	Gly	Ser	Arg	Lys	Phe	Asn	Thr	Thr	Glu	Arg	Val	Leu	Gln		4430	4435	4440
Ser	Leu	Leu	Gly	Pro	Met	Phe	Lys	Asn	Thr	Ser	Val	Gly	Pro	Leu		4445	4450	4455
Tyr	Ser	Gly	Cys	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu	Arg	Ser	Glu	Lys	Asp	Gly		4460	4465	4470
Ala	Ala	Thr	Gly	Val	Asp	Ala	Ile	Cys	Thr	His	Arg	Leu	Asp	Pro				

4475	4480	4485
Lys Ser Pro Gly Val Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser		
4490	4495	4500
Gln Leu Thr Asn Gly Ile Lys Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp		
4505	4510	4515
Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Gln Thr Ser Ala		
4520	4525	4530
Pro Asn Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser Thr Val Asp Leu Gly Thr		
4535	4540	4545
Ser Gly Thr Pro Ser Ser Leu Pro Ser Pro Thr Ser Ala Gly Pro		
4550	4555	4560
Leu Leu Val Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln		
4565	4570	4575
Tyr Glu Glu Asp Met His His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr		
4580	4585	4590
Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Gly Pro Met Phe Lys Asn		
4595	4600	4605
Thr Ser Val Gly Leu Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu		
4610	4615	4620
Arg Pro Glu Lys Asn Gly Ala Ala Thr Gly Met Asp Ala Ile Cys		
4625	4630	4635
Ser His Arg Leu Asp Pro Lys Ser Pro Gly Leu Asn Arg Glu Gln		
4640	4645	4650
Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Gly Ile Lys Glu Leu		
4655	4660	4665
Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe		
4670	4675	4680
Thr His Arg Ser Ser Val Ala Pro Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser		
4685	4690	4695
Thr Val Asp Leu Gly Thr Ser Gly Thr Pro Ser Ser Leu Pro Ser		
4700	4705	4710
Pro Thr Thr Ala Val Pro Leu Leu Val Pro Phe Thr Leu Asn Phe		
4715	4720	4725
Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Glu Asp Met Arg His Pro Gly		
4730	4735	4740
Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu		
4745	4750	4755
Gly Pro Leu Phe Lys Asn Ser Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly		
4760	4765	4770
Cys Arg Leu Ile Ser Leu Arg Ser Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr		
4775	4780	4785

Gly Val Asp Ala Ile Cys Thr His His Leu Asn Pro Gln Ser Pro	4790	4795	4800
Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Gln Leu Ser Gln Met Thr	4805	4810	4815
Asn Gly Ile Lys Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser	4820	4825	4830
Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Ser Ser Gly Leu Thr Thr	4835	4840	4845
Ser Thr Pro Trp Thr Ser Thr Val Asp Leu Gly Thr Ser Gly Thr	4850	4855	4860
Pro Ser Pro Val Pro Ser Pro Thr Thr Ala Gly Pro Leu Leu Val	4865	4870	4875
Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Glu Glu	4880	4885	4890
Asp Met His Arg Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Ala Thr Glu Arg	4895	4900	4905
Val Leu Gln Gly Leu Leu Ser Pro Ile Phe Lys Asn Ser Ser Val	4910	4915	4920
Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Ser Leu Arg Pro Glu	4925	4930	4935
Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Met Asp Ala Val Cys Leu Tyr His	4940	4945	4950
Pro Asn Pro Lys Arg Pro Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp	4955	4960	4965
Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Asn Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr	4970	4975	4980
Ser Leu Asp Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Gln	4985	4990	4995
Asn Ser Val Pro Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser Thr Val Tyr	5000	5005	5010
Trp Ala Thr Thr Gly Thr Pro Ser Ser Phe Pro Gly His Thr Glu	5015	5020	5025
Pro Gly Pro Leu Leu Ile Pro Phe Thr Phe Asn Phe Thr Ile Thr	5030	5035	5040
Asn Leu His Tyr Glu Glu Asn Met Gln His Pro Gly Ser Arg Lys	5045	5050	5055
Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu	5060	5065	5070
Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu	5075	5080	5085

Thr	Leu	Leu	Arg	Pro	Glu	Lys	Gln	Glu	Ala	Ala	Thr	Gly	Val	Asp	5090	5095	5100
Thr	Ile	Cys	Thr	His	Arg	Val	Asp	Pro	Ile	Gly	Pro	Gly	Leu	Asp	5105	5110	5115
Arg	Glu	Arg	Leu	Tyr	Trp	Glu	Leu	Ser	Gln	Leu	Thr	Asn	Ser	Ile	5120	5125	5130
Thr	Glu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Thr	Leu	Asp	Arg	Asp	Ser	Leu	Tyr	Val	5135	5140	5145
Asn	Gly	Phe	Asn	Pro	Trp	Ser	Ser	Val	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Pro	5150	5155	5160
Gly	Thr	Ser	Thr	Val	His	Leu	Ala	Thr	Ser	Gly	Thr	Pro	Ser	Ser	5165	5170	5175
Leu	Pro	Gly	His	Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Leu	Leu	Ile	Pro	Phe	Thr	5180	5185	5190
Leu	Asn	Phe	Thr	Ile	Thr	Asn	Leu	His	Tyr	Glu	Glu	Asn	Met	Gln	5195	5200	5205
His	Pro	Gly	Ser	Arg	Lys	Phe	Asn	Thr	Thr	Glu	Arg	Val	Leu	Gln	5210	5215	5220
Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Leu	Phe	Lys	Ser	Thr	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	5225	5230	5235
Tyr	Ser	Gly	Cys	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu	Arg	Pro	Glu	Lys	His	Gly	5240	5245	5250
Ala	Ala	Thr	Gly	Val	Asp	Ala	Ile	Cys	Thr	Leu	Arg	Leu	Asp	Pro	5255	5260	5265
Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Asp	Arg	Glu	Arg	Leu	Tyr	Trp	Glu	Leu	Ser	5270	5275	5280
Gln	Leu	Thr	Asn	Ser	Val	Thr	Glu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Thr	Leu	Asp	5285	5290	5295
Arg	Asp	Ser	Leu	Tyr	Val	Asn	Gly	Phe	Thr	His	Arg	Ser	Ser	Val	5300	5305	5310
Pro	Thr	Thr	Ser	Ile	Pro	Gly	Thr	Ser	Ala	Val	His	Leu	Glu	Thr	5315	5320	5325
Ser	Gly	Thr	Pro	Ala	Ser	Leu	Pro	Gly	His	Thr	Ala	Pro	Gly	Pro	5330	5335	5340
Leu	Leu	Val	Pro	Phe	Thr	Leu	Asn	Phe	Thr	Ile	Thr	Asn	Leu	Gln	5345	5350	5355
Tyr	Glu	Glu	Asp	Met	Arg	His	Pro	Gly	Ser	Arg	Lys	Phe	Asn	Thr	5360	5365	5370
Thr	Glu	Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Leu	Phe	Lys	Ser	5375	5380	5385
Thr	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Tyr	Ser	Gly	Cys	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu			

5390	5395	5400
Arg Pro Glu Lys Arg Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp Thr Ile Cys 5405	5410	5415
Thr His Arg Leu Asp Pro Leu Asn Pro Gly Leu Asp Arg Glu Gln 5420	5425	5430
Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Lys Leu Thr Arg Gly Ile Ile Glu Leu 5435	5440	5445
Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Arg Gly Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe 5450	5455	5460
Thr His Arg Asn Phe Val Pro Ile Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser 5465	5470	5475
Thr Val His Leu Gly Thr Ser Glu Thr Pro Ser Ser Leu Pro Arg 5480	5485	5490
Pro Ile Val Pro Gly Pro Leu Leu Val Pro Phe Thr Leu Asn Phe 5495	5500	5505
Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Glu Glu Ala Met Arg His Pro Gly 5510	5515	5520
Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu 5525	5530	5535
Arg Pro Leu Phe Lys Asn Thr Ser Ile Gly Pro Leu Tyr Ser Ser 5540	5545	5550
Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Asp Lys Ala Ala Thr 5555	5560	5565
Arg Val Asp Ala Ile Cys Thr His His Pro Asp Pro Gln Ser Pro 5570	5575	5580
Gly Leu Asn Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr 5585	5590	5595
His Gly Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asp Ser 5600	5605	5610
Leu Tyr Val Asp Gly Phe Thr His Trp Ser Pro Ile Pro Thr Thr 5615	5620	5625
Ser Thr Pro Gly Thr Ser Ile Val Asn Leu Gly Thr Ser Gly Ile 5630	5635	5640
Pro Pro Ser Leu Pro Glu Thr Thr Ala Thr Gly Pro Leu Leu Val 5645	5650	5655
Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Glu Glu 5660	5665	5670
Asn Met Gly His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Ile Thr Glu Ser 5675	5680	5685
Val Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu Phe Lys Ser Thr Ser Val 5690	5695	5700

Gly	Pro	Leu	Tyr	Ser	Gly	Cys	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu	Arg	Pro	Glu	5705	5710	5715
Lys	Asp	Gly	Val	Ala	Thr	Arg	Val	Asp	Ala	Ile	Cys	Thr	His	Arg	5720	5725	5730
Pro	Asp	Pro	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Asp	Arg	Gln	Gln	Leu	Tyr	Trp	5735	5740	5745
Glu	Leu	Ser	Gln	Leu	Thr	His	Ser	Ile	Thr	Glu	Leu	Gly	Pro	Tyr	5750	5755	5760
Thr	Leu	Asp	Arg	Asp	Ser	Leu	Tyr	Val	Asn	Gly	Phe	Thr	Gln	Arg	5765	5770	5775
Ser	Ser	Val	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Pro	Gly	Thr	Phe	Thr	Val	Gln	5780	5785	5790
Pro	Glu	Thr	Ser	Glu	Thr	Pro	Ser	Ser	Leu	Pro	Gly	Pro	Thr	Ala	5795	5800	5805
Thr	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Phe	Thr	Leu	Asn	Phe	Thr	Ile	Ile	5810	5815	5820
Asn	Leu	Gln	Tyr	Glu	Glu	Asp	Met	His	Arg	Pro	Gly	Ser	Arg	Lys	5825	5830	5835
Phe	Asn	Thr	Thr	Glu	Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Leu	Met	Pro	Leu	5840	5845	5850
Phe	Lys	Asn	Thr	Ser	Val	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ser	Gly	Cys	Arg	Leu	5855	5860	5865
Thr	Leu	Leu	Arg	Pro	Glu	Lys	Asp	Gly	Ala	Ala	Thr	Arg	Val	Asp	5870	5875	5880
Ala	Val	Cys	Thr	His	Arg	Pro	Asp	Pro	Lys	Ser	Pro	Gly	Leu	Asp	5885	5890	5895
Arg	Glu	Arg	Leu	Tyr	Trp	Lys	Leu	Ser	Gln	Leu	Thr	His	Gly	Ile	5900	5905	5910
Thr	Glu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Thr	Leu	Asp	Arg	His	Ser	Leu	Tyr	Val	5915	5920	5925
Asn	Gly	Phe	Thr	His	Gln	Ser	Ser	Met	Thr	Thr	Thr	Arg	Thr	Pro	5930	5935	5940
Asp	Thr	Ser	Thr	Met	His	Leu	Ala	Thr	Ser	Arg	Thr	Pro	Ala	Ser	5945	5950	5955
Leu	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr	Ala	Ser	Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Phe	Thr	5960	5965	5970
Ile	Asn	Phe	Thr	Ile	Thr	Asn	Leu	Arg	Tyr	Glu	Glu	Asn	Met	His	5975	5980	5985
His	Pro	Gly	Ser	Arg	Lys	Phe	Asn	Thr	Thr	Glu	Arg	Val	Leu	Gln	5990	5995	6000

Gly	Leu	Leu	Arg	Pro	Val	Phe	Lys	Asn	Thr	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	6005	6010	6015
Tyr	Ser	Gly	Cys	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu	Arg	Pro	Lys	Lys	Asp	Gly	6020	6025	6030
Ala	Ala	Thr	Lys	Val	Asp	Ala	Ile	Cys	Thr	Tyr	Arg	Pro	Asp	Pro	6035	6040	6045
Lys	Ser	Pro	Gly	Leu	Asp	Arg	Glu	Gln	Leu	Tyr	Trp	Glu	Leu	Ser	6050	6055	6060
Gln	Leu	Thr	His	Ser	Ile	Thr	Glu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Thr	Leu	Asp	6065	6070	6075
Arg	Asp	Ser	Leu	Tyr	Val	Asn	Gly	Phe	Thr	Gln	Arg	Ser	Ser	Val	6080	6085	6090
Pro	Thr	Thr	Ser	Ile	Pro	Gly	Thr	Pro	Thr	Val	Asp	Leu	Gly	Thr	6095	6100	6105
Ser	Gly	Thr	Pro	Val	Ser	Lys	Pro	Gly	Pro	Ser	Ala	Ala	Ser	Pro	6110	6115	6120
Leu	Leu	Val	Leu	Phe	Thr	Leu	Asn	Phe	Thr	Ile	Thr	Asn	Leu	Arg	6125	6130	6135
Tyr	Glu	Glu	Asn	Met	Gln	His	Pro	Gly	Ser	Arg	Lys	Phe	Asn	Thr	6140	6145	6150
Thr	Glu	Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Leu	Arg	Ser	Leu	Phe	Lys	Ser	6155	6160	6165
Thr	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Tyr	Ser	Gly	Cys	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu	6170	6175	6180
Arg	Pro	Glu	Lys	Asp	Gly	Thr	Ala	Thr	Gly	Val	Asp	Ala	Ile	Cys	6185	6190	6195
Thr	His	His	Pro	Asp	Pro	Lys	Ser	Pro	Arg	Leu	Asp	Arg	Glu	Gln	6200	6205	6210
Leu	Tyr	Trp	Glu	Leu	Ser	Gln	Leu	Thr	His	Asn	Ile	Thr	Glu	Leu	6215	6220	6225
Gly	Pro	Tyr	Ala	Leu	Asp	Asn	Asp	Ser	Leu	Phe	Val	Asn	Gly	Phe	6230	6235	6240
Thr	His	Arg	Ser	Ser	Val	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Pro	Gly	Thr	Pro	6245	6250	6255
Thr	Val	Tyr	Leu	Gly	Ala	Ser	Lys	Thr	Pro	Ala	Ser	Ile	Phe	Gly	6260	6265	6270
Pro	Ser	Ala	Ala	Ser	His	Leu	Leu	Ile	Leu	Phe	Thr	Leu	Asn	Phe	6275	6280	6285
Thr	Ile	Thr	Asn	Leu	Arg	Tyr	Glu	Glu	Asn	Met	Trp	Pro	Gly	Ser	6290	6295	6300
Arg	Lys	Phe	Asn	Thr	Thr	Glu	Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Leu	Arg			

6305	6310	6315
Pro Leu Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys		
6320	6325	6330
Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Glu Ala Thr Gly		
6335	6340	6345
Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg Pro Asp Pro Thr Gly Pro Gly		
6350	6355	6360
Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Thr His		
6365	6370	6375
Ser Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asp Ser Leu		
6380	6385	6390
Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Ser Ser Val Pro Thr Thr Ser		
6395	6400	6405
Thr Gly Val Val Ser Glu Glu Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile		
6410	6415	6420
Asn Asn Leu Arg Tyr Met Ala Asp Met Gly Gln Pro Gly Ser Leu		
6425	6430	6435
Lys Phe Asn Ile Thr Asp Asn Val Met Gln His Leu Leu Ser Pro		
6440	6445	6450
Leu Phe Gln Arg Ser Ser Leu Gly Ala Arg Tyr Thr Gly Cys Arg		
6455	6460	6465
Val Ile Ala Leu Arg Ser Val Lys Asn Gly Ala Glu Thr Arg Val		
6470	6475	6480
Asp Leu Leu Cys Thr Tyr Leu Gln Pro Leu Ser Gly Pro Gly Leu		
6485	6490	6495
Pro Ile Lys Gln Val Phe His Glu Leu Ser Gln Gln Thr His Gly		
6500	6505	6510
Ile Thr Arg Leu Gly Pro Tyr Ser Leu Asp Lys Asp Ser Leu Tyr		
6515	6520	6525
Leu Asn Gly Tyr Asn Glu Pro Gly Pro Asp Glu Pro Pro Thr Thr		
6530	6535	6540
Pro Lys Pro Ala Thr Thr Phe Leu Pro Pro Leu Ser Glu Ala Thr		
6545	6550	6555
Thr Ala Met Gly Tyr His Leu Lys Thr Leu Thr Leu Asn Phe Thr		
6560	6565	6570
Ile Ser Asn Leu Gln Tyr Ser Pro Asp Met Gly Lys Gly Ser Ala		
6575	6580	6585
Thr Phe Asn Ser Thr Glu Gly Val Leu Gln His Leu Leu Arg Pro		
6590	6595	6600
Leu Phe Gln Lys Ser Ser Met Gly Pro Phe Tyr Leu Gly Cys Gln		
6605	6610	6615

Leu	Ile	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Lys	Asp	Gly	Ala	Ala	Thr	Gly	Val	6620	6625	6630
Asp	Thr	Thr	Cys	Thr	Tyr	His	Pro	Asp	Pro	Val	Gly	Pro	Gly	Leu	6635	6640	6645
Asp	Ile	Gln	Gln	Leu	Tyr	Trp	Glu	Leu	Ser	Gln	Leu	Thr	His	Gly	6650	6655	6660
Val	Thr	Gln	Leu	Gly	Phe	Tyr	Val	Leu	Asp	Arg	Asp	Ser	Leu	Phe	6665	6670	6675
Ile	Asn	Gly	Tyr	Ala	Pro	Gln	Asn	Leu	Ser	Ile	Arg	Gly	Glu	Tyr	6680	6685	6690
Gln	Ile	Asn	Phe	His	Ile	Val	Asn	Trp	Asn	Leu	Ser	Asn	Pro	Asp	6695	6700	6705
Pro	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	Ile	Thr	Leu	Leu	Arg	Asp	Ile	Gln	Asp	6710	6715	6720
Lys	Val	Thr	Thr	Leu	Tyr	Lys	Gly	Ser	Gln	Leu	His	Asp	Thr	Phe	6725	6730	6735
Arg	Phe	Cys	Leu	Val	Thr	Asn	Leu	Thr	Met	Asp	Ser	Val	Leu	Val	6740	6745	6750
Thr	Val	Lys	Ala	Leu	Phe	Ser	Ser	Asn	Leu	Asp	Pro	Ser	Leu	Val	6755	6760	6765
Glu	Gln	Val	Phe	Leu	Asp	Lys	Thr	Leu	Asn	Ala	Ser	Phe	His	Trp	6770	6775	6780
Leu	Gly	Ser	Thr	Tyr	Gln	Leu	Val	Asp	Ile	His	Val	Thr	Glu	Met	6785	6790	6795
Glu	Ser	Ser	Val	Tyr	Gln	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Gln	His	6800	6805	6810
Phe	Tyr	Leu	Asn	Phe	Thr	Ile	Thr	Asn	Leu	Pro	Tyr	Ser	Gln	Asp	6815	6820	6825
Lys	Ala	Gln	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	Tyr	Gln	Arg	Asn	Lys	Arg	Asn	6830	6835	6840
Ile	Glu	Asp	Ala	Leu	Asn	Gln	Leu	Phe	Arg	Asn	Ser	Ser	Ile	Lys	6845	6850	6855
Ser	Tyr	Phe	Ser	Asp	Cys	Gln	Val	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Pro	6860	6865	6870
Asn	Arg	His	His	Thr	Gly	Val	Asp	Ser	Leu	Cys	Asn	Phe	Ser	Pro	6875	6880	6885
Leu	Ala	Arg	Arg	Val	Asp	Arg	Val	Ala	Ile	Tyr	Glu	Glu	Phe	Leu	6890	6895	6900
Arg	Met	Thr	Arg	Asn	Gly	Thr	Gln	Leu	Gln	Asn	Phe	Thr	Leu	Asp	6905	6910	6915

```

Arg Ser Ser Val Leu Val Asp Gly Tyr Ser Pro Asn Arg Asn Glu
      6920                      6925                      6930

Pro Leu Thr Gly Asn Ser Asp Leu Pro Phe Trp Ala Val Ile Leu
      6935                      6940                      6945

Ile Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Leu Ile Thr Cys Leu Ile Cys
      6950                      6955                      6960

Gly Val Leu Val Thr Thr Arg Arg Arg Lys Lys Glu Gly Glu Tyr
      6965                      6970                      6975

Asn Val Gln Gln Gln Cys Pro Gly Tyr Tyr Gln Ser His Leu Asp
      6980                      6985                      6990

Leu Glu Asp Leu Gln
      6995

```

5

```

<210> 5
<211> 622
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 5

```

ES 2 456 325 T3

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

185										190					195				
Phe	Val	Ala	Glu	Ser	Ala	Glu	Val	Leu	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Ser					
				200					205					210					
Cys	Pro	Gly	Pro	Leu	Asp	Gln	Asp	Gln	Gln	Glu	Ala	Ala	Arg	Ala					
				215					220					225					
Ala	Leu	Gln	Gly	Gly	Gly	Pro	Pro	Tyr	Gly	Pro	Pro	Ser	Thr	Trp					
				230					235					240					
Ser	Val	Ser	Thr	Met	Asp	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Leu					
				245					250					255					
Gly	Gln	Pro	Ile	Ile	Arg	Ser	Ile	Pro	Gln	Gly	Ile	Val	Ala	Ala					
				260					265					270					
Trp	Arg	Gln	Arg	Ser	Ser	Arg	Asp	Pro	Ser	Trp	Arg	Gln	Pro	Glu					
				275					280					285					
Arg	Thr	Ile	Leu	Arg	Pro	Arg	Phe	Arg	Arg	Glu	Val	Glu	Lys	Thr					
				290					295					300					
Ala	Cys	Pro	Ser	Gly	Lys	Lys	Ala	Arg	Glu	Ile	Asp	Glu	Ser	Leu					
				305					310					315					
Ile	Phe	Tyr	Lys	Lys	Trp	Glu	Leu	Glu	Ala	Cys	Val	Asp	Ala	Ala					
				320					325					330					
Leu	Leu	Ala	Thr	Gln	Met	Asp	Arg	Val	Asn	Ala	Ile	Pro	Phe	Thr					
				335					340					345					
Tyr	Glu	Gln	Leu	Asp	Val	Leu	Lys	His	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Tyr					
				350					355					360					
Pro	Gln	Gly	Tyr	Pro	Glu	Ser	Val	Ile	Gln	His	Leu	Gly	Tyr	Leu					
				365					370					375					
Phe	Leu	Lys	Met	Ser	Pro	Glu	Asp	Ile	Arg	Lys	Trp	Asn	Val	Thr					
				380					385					390					
Ser	Leu	Glu	Thr	Leu	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu	Val	Asn	Lys	Gly	His					
				395					400					405					
Glu	Met	Ser	Pro	Gln	Val	Ala	Thr	Leu	Ile	Asp	Arg	Phe	Val	Lys					
				410					415					420					
Gly	Arg	Gly	Gln	Leu	Asp	Lys	Asp	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu	Thr	Ala					
				425					430					435					
Phe	Tyr	Pro	Gly	Tyr	Leu	Cys	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu	Glu	Leu	Ser					
				440					445					450					
Ser	Val	Pro	Pro	Ser	Ser	Ile	Trp	Ala	Val	Arg	Pro	Gln	Asp	Leu					
				455					460					465					
Asp	Thr	Cys	Asp	Pro	Arg	Gln	Leu	Asp	Val	Leu	Tyr	Pro	Lys	Ala					
				470					475					480					
Arg	Leu	Ala	Phe	Gln	Asn	Met	Asn	Gly	Ser	Glu	Tyr	Phe	Val	Lys					
				485					490					495					

```

Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala
    500                                505                                510

Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys
    515                                520                                525

Leu Arg Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln
    530                                535                                540

Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg
    545                                550                                555

His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp
    560                                565                                570

Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly
    575                                580                                585

Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr
    590                                595                                600

Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro Val Leu Thr Val Leu Ala Leu
    605                                610                                615

Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala
    620

```

<210> 6
 <211> 690
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 6

```

Met Ala Pro Trp Pro Glu Leu Gly Asp Ala Gln Pro Asn Pro Asp
  1          5          10          15

Lys Tyr Leu Glu Gly Ala Ala Gly Gln Gln Pro Thr Ala Pro Asp
          20          25          30

Lys Ser Lys Glu Thr Asn Lys Thr Asp Asn Thr Glu Ala Pro Val
          35          40          45

Thr Lys Ile Glu Leu Leu Pro Ser Tyr Ser Thr Ala Thr Leu Ile
          50          55          60

Asp Glu Pro Thr Glu Val Asp Asp Pro Trp Asn Leu Pro Thr Leu
          65          70          75

Gln Asp Ser Gly Ile Lys Trp Ser Glu Arg Asp Thr Lys Gly Lys
          80          85          90

Ile Leu Cys Phe Phe Gln Gly Ile Gly Arg Leu Ile Leu Leu Leu
          95          100          105

Gly Phe Leu Tyr Phe Phe Val Cys Ser Leu Asp Ile Leu Ser Ser
          110          115          120

Ala Phe Gln Leu Val Gly Gly Lys Met Ala Gly Gln Phe Phe Ser
          125          130          135

```

Asn	Ser	Ser	Ile	Met	Ser	Asn	Pro	Leu	Leu	Gly	Leu	Val	Ile	Gly	140	145	150
Val	Leu	Val	Thr	Val	Leu	Val	Gln	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Ser	155	160	165
Ile	Val	Val	Ser	Met	Val	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	Thr	Val	Arg	Ala	170	175	180
Ala	Ile	Pro	Ile	Ile	Met	Gly	Ala	Asn	Ile	Gly	Thr	Ser	Ile	Thr	185	190	195
Asn	Thr	Ile	Val	Ala	Leu	Met	Gln	Val	Gly	Asp	Arg	Ser	Glu	Phe	200	205	210
Arg	Arg	Ala	Phe	Ala	Gly	Ala	Thr	Val	His	Asp	Phe	Phe	Asn	Trp	215	220	225
Leu	Ser	Val	Leu	Val	Leu	Leu	Pro	Val	Glu	Val	Ala	Thr	His	Tyr	230	235	240
Leu	Glu	Ile	Ile	Thr	Gln	Leu	Ile	Val	Glu	Ser	Phe	His	Phe	Lys	245	250	255
Asn	Gly	Glu	Asp	Ala	Pro	Asp	Leu	Leu	Lys	Val	Ile	Thr	Lys	Pro	260	265	270
Phe	Thr	Lys	Leu	Ile	Val	Gln	Leu	Asp	Lys	Lys	Val	Ile	Ser	Gln	275	280	285
Ile	Ala	Met	Asn	Asp	Glu	Lys	Ala	Lys	Asn	Lys	Ser	Leu	Val	Lys	290	295	300
Ile	Trp	Cys	Lys	Thr	Phe	Thr	Asn	Lys	Thr	Gln	Ile	Asn	Val	Thr	305	310	315
Val	Pro	Ser	Thr	Ala	Asn	Cys	Thr	Ser	Pro	Ser	Leu	Cys	Trp	Thr	320	325	330
Asp	Gly	Ile	Gln	Asn	Trp	Thr	Met	Lys	Asn	Val	Thr	Tyr	Lys	Glu	335	340	345
Asn	Ile	Ala	Lys	Cys	Gln	His	Ile	Phe	Val	Asn	Phe	His	Leu	Pro	350	355	360
Asp	Leu	Ala	Val	Gly	Thr	Ile	Leu	Leu	Ile	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	365	370	375
Leu	Cys	Gly	Cys	Leu	Ile	Met	Ile	Val	Lys	Ile	Leu	Gly	Ser	Val	380	385	390
Leu	Lys	Gly	Gln	Val	Ala	Thr	Val	Ile	Lys	Lys	Thr	Ile	Asn	Thr	395	400	405
Asp	Phe	Pro	Phe	Pro	Phe	Ala	Trp	Leu	Thr	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ile	410	415	420
Leu	Val	Gly	Ala	Gly	Met	Thr	Phe	Ile	Val	Gln	Ser	Ser	Ser	Val	425	430	435
Phe	Thr	Ser	Ala	Leu	Thr	Pro	Leu	Ile	Gly	Ile	Gly	Val	Ile	Thr			

	440		445		450
Ile Glu Arg Ala	Tyr Pro Leu Thr Leu	Gly Ser Asn Ile Gly Thr			
	455	460			465
Thr Thr Thr Ala	Ile Leu Ala Ala Leu	Ala Ser Pro Gly Asn Ala			
	470	475			480
Leu Arg Ser Ser	Leu Gln Ile Ala Leu	Cys His Phe Phe Phe Asn			
	485	490			495
Ile Ser Gly Ile	Leu Leu Trp Tyr Pro	Ile Pro Phe Thr Arg Leu			
	500	505			510
Pro Ile Arg Met	Ala Lys Gly Leu Gly	Asn Ile Ser Ala Lys Tyr			
	515	520			525
Arg Trp Phe Ala	Val Phe Tyr Leu Ile	Ile Phe Phe Phe Leu Ile			
	530	535			540
Pro Leu Thr Val	Phe Gly Leu Ser Leu	Ala Gly Trp Arg Val Leu			
	545	550			555
Val Gly Val Gly	Val Pro Val Val Phe	Ile Ile Ile Leu Val Leu			
	560	565			570
Cys Leu Arg Leu	Leu Gln Ser Arg Cys	Pro Arg Val Leu Pro Lys			
	575	580			585
Lys Leu Gln Asn	Trp Asn Phe Leu Pro	Leu Trp Met Arg Ser Leu			
	590	595			600
Lys Pro Trp Asp	Ala Val Val Ser Lys	Phe Thr Gly Cys Phe Gln			
	605	610			615
Met Arg Cys Cys	Tyr Cys Cys Arg Val	Cys Cys Arg Ala Cys Cys			
	620	625			630
Leu Leu Cys Gly	Cys Pro Lys Cys Cys	Arg Cys Ser Lys Cys Cys			
	635	640			645
Glu Asp Leu Glu	Glu Ala Gln Glu Gly	Gln Asp Val Pro Val Lys			
	650	655			660
Ala Pro Glu Thr	Phe Asp Asn Ile Thr	Ile Ser Arg Glu Ala Gln			
	665	670			675
Gly Glu Val Pro	Ala Ser Asp Ser Lys	Thr Glu Cys Thr Ala Leu			
	680	685			690

<210> 7
 <211> 1093
 <212> PRT
 <213> Homo sapien
 <400> 7

ES 2 456 325 T3

Met	Val	Leu	Ala	Gly	Pro	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Leu	Leu	Pro	Ser
1				5					10					15
Leu	Thr	Leu	Leu	Val	Ser	His	Leu	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Val	Ser
				20					25					30

Ser	Glu	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Gln	Leu	Cys	Ala	Leu	Ser	Lys	His	
				35					40					45	
Pro	Thr	Val	Ala	Phe	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Trp	Val	Ser	Asn	Phe	
				50					55					60	
Thr	Tyr	Pro	Gly	Ala	Arg	Asp	Phe	Ser	Gln	Leu	Ala	Leu	Asp	Pro	
				65					70					75	
Ser	Gly	Asn	Gln	Leu	Ile	Val	Gly	Ala	Arg	Asn	Tyr	Leu	Phe	Arg	
				80					85					90	
Leu	Ser	Leu	Ala	Asn	Val	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	Thr	Glu	Trp	Ala	
				95					100					105	
Ser	Ser	Glu	Asp	Thr	Arg	Arg	Ser	Cys	Gln	Ser	Lys	Gly	Lys	Thr	
				110					115					120	
Glu	Glu	Glu	Cys	Gln	Asn	Tyr	Val	Arg	Val	Leu	Ile	Val	Ala	Gly	
				125					130					135	
Arg	Lys	Val	Phe	Met	Cys	Gly	Thr	Asn	Ala	Phe	Ser	Pro	Met	Cys	
				140					145					150	
Thr	Ser	Arg	Gln	Val	Gly	Asn	Leu	Ser	Arg	Thr	Thr	Glu	Lys	Ile	
				155					160					165	
Asn	Gly	Val	Ala	Arg	Cys	Pro	Tyr	Asp	Pro	Arg	His	Asn	Ser	Thr	
				170					175					180	
Ala	Val	Ile	Ser	Ser	Gln	Gly	Glu	Leu	Tyr	Ala	Ala	Thr	Val	Ile	
				185					190					195	
Asp	Phe	Ser	Gly	Arg	Asp	Pro	Ala	Ile	Tyr	Arg	Ser	Leu	Gly	Ser	
				200					205					210	
Gly	Pro	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala	Gln	Tyr	Asn	Ser	Lys	Trp	Leu	Asn	
				215					220					225	
Glu	Pro	Asn	Phe	Val	Ala	Ala	Tyr	Asp	Ile	Gly	Leu	Phe	Ala	Tyr	
				230					235					240	
Phe	Phe	Leu	Arg	Glu	Asn	Ala	Val	Glu	His	Asp	Cys	Gly	Arg	Thr	
				245					250					255	
Val	Tyr	Ser	Arg	Val	Ala	Arg	Val	Cys	Lys	Asn	Asp	Val	Gly	Gly	
				260					265					270	
Arg	Phe	Leu	Leu	Glu	Asp	Thr	Trp	Thr	Thr	Phe	Met	Lys	Ala	Arg	
				275					280					285	
Leu	Asn	Cys	Ser	Arg	Pro	Gly	Glu	Val	Pro	Phe	Tyr	Tyr	Asn	Glu	
				290					295					300	
Leu	Gln	Ser	Ala	Phe	His	Leu	Pro	Glu	Gln	Asp	Leu	Ile	Tyr	Gly	
				305					310					315	
Val	Phe	Thr	Thr	Asn	Val	Asn	Ser	Ile	Ala	Ala	Ser	Ala	Val	Cys	
				320					325					330	

Ala Phe Asn Leu Ser	Ala Ile Ser Gln	Ala Phe Asn Gly	Pro Phe
335		340	345
Arg Tyr Gln Glu Asn	Pro Arg Ala Ala	Trp Leu Pro Ile	Ala Asn
350		355	360
Pro Ile Pro Asn Phe	Gln Cys Gly Thr	Leu Pro Glu Thr	Gly Pro
365		370	375
Asn Glu Asn Leu Thr	Glu Arg Ser Leu	Gln Asp Ala Gln	Arg Leu
380		385	390
Phe Leu Met Ser Glu	Ala Val Gln Pro	Val Thr Pro Glu	Pro Cys
395		400	405
Val Thr Gln Asp Ser	Val Arg Phe Ser	His Leu Val Val	Asp Leu
410		415	420
Val Gln Ala Lys Asp	Thr Leu Tyr His	Val Leu Tyr Ile	Gly Thr
425		430	435
Glu Ser Gly Thr Ile	Leu Lys Ala Leu	Ser Thr Ala Ser	Arg Ser
440		445	450
Leu His Gly Cys Tyr	Leu Glu Glu Leu	His Val Leu Pro	Pro Gly
455		460	465
Arg Arg Glu Pro Leu	Arg Ser Leu Arg	Ile Leu His Ser	Ala Arg
470		475	480
Ala Leu Phe Val Gly	Leu Arg Asp Gly	Val Leu Arg Val	Pro Leu
485		490	495
Glu Arg Cys Ala Ala	Tyr Arg Ser Gln	Gly Ala Cys Leu	Gly Ala
500		505	510
Arg Asp Pro Tyr Cys	Gly Trp Asp Gly	Lys Gln Gln Arg	Cys Ser
515		520	525
Thr Leu Glu Asp Ser	Ser Asn Met Ser	Leu Trp Thr Gln	Asn Ile
530		535	540
Thr Ala Cys Pro Val	Arg Asn Val Thr	Arg Asp Gly Gly	Phe Gly
545		550	555
Pro Trp Ser Pro Trp	Gln Pro Cys Glu	His Leu Asp Gly	Asp Asn
560		565	570
Ser Gly Ser Cys Leu	Cys Arg Ala Arg	Ser Cys Asp Ser	Pro Arg
575		580	585
Pro Arg Cys Gly Gly	Leu Asp Cys Leu	Gly Pro Ala Ile	His Ile
590		595	600
Ala Asn Cys Ser Arg	Asn Gly Ala Trp	Thr Pro Trp Ser	Ser Trp
605		610	615
Ala Leu Cys Ser Thr	Ser Cys Gly Ile	Gly Phe Gln Val	Arg Gln
620		625	630
Arg Ser Cys Ser Asn	Pro Ala Pro Arg	His Gly Gly Arg	Ile Cys

635					640					645				
Val	Gly	Lys	Ser	Arg	Glu	Glu	Arg	Phe	Cys	Asn	Glu	Asn	Thr	Pro
				650					655					660
Cys	Pro	Val	Pro	Ile	Phe	Trp	Ala	Ser	Trp	Gly	Ser	Trp	Ser	Lys
				665					670					675
Cys	Ser	Ser	Asn	Cys	Gly	Gly	Gly	Met	Gln	Ser	Arg	Arg	Arg	Ala
				680					685					690
Cys	Glu	Asn	Gly	Asn	Ser	Cys	Leu	Gly	Cys	Gly	Val	Glu	Phe	Lys
				695					700					705
Thr	Cys	Asn	Pro	Glu	Gly	Cys	Pro	Glu	Val	Arg	Arg	Asn	Thr	Pro
				710					715					720
Trp	Thr	Pro	Trp	Leu	Pro	Val	Asn	Val	Thr	Gln	Gly	Gly	Ala	Arg
				725					730					735
Gln	Glu	Gln	Arg	Phe	Arg	Phe	Thr	Cys	Arg	Ala	Pro	Leu	Ala	Asp
				740					745					750
Pro	His	Gly	Leu	Gln	Phe	Gly	Arg	Arg	Arg	Thr	Glu	Thr	Arg	Thr
				755					760					765
Cys	Pro	Ala	Asp	Gly	Ser	Gly	Ser	Cys	Asp	Thr	Asp	Ala	Leu	Val
				770					775					780
Glu	Asp	Leu	Leu	Arg	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Pro	His	Thr	Val	Ser
				785					790					795
Gly	Gly	Trp	Ala	Ala	Trp	Gly	Pro	Trp	Ser	Ser	Cys	Ser	Arg	Asp
				800					805					810
Cys	Glu	Leu	Gly	Phe	Arg	Val	Arg	Lys	Arg	Thr	Cys	Thr	Asn	Pro
				815					820					825
Glu	Pro	Arg	Asn	Gly	Gly	Leu	Pro	Cys	Val	Gly	Asp	Ala	Ala	Glu
				830					835					840
Tyr	Gln	Asp	Cys	Asn	Pro	Gln	Ala	Cys	Pro	Val	Arg	Gly	Ala	Trp
				845					850					855
Ser	Cys	Trp	Thr	Ser	Trp	Ser	Pro	Cys	Ser	Ala	Ser	Cys	Gly	Gly
				860					865					870
Gly	His	Tyr	Gln	Arg	Thr	Arg	Ser	Cys	Thr	Ser	Pro	Ala	Pro	Ser
				875					880					885
Pro	Gly	Glu	Asp	Ile	Cys	Leu	Gly	Leu	His	Thr	Glu	Glu	Ala	Leu
				890					895					900
Cys	Ala	Thr	Gln	Ala	Cys	Pro	Glu	Gly	Trp	Ser	Pro	Trp	Ser	Glu
				905					910					915
Trp	Ser	Lys	Cys	Thr	Asp	Asp	Gly	Ala	Gln	Ser	Arg	Ser	Arg	His
				920					925					930
Cys	Glu	Glu	Leu	Leu	Pro	Gly	Ser	Ser	Ala	Cys	Ala	Gly	Asn	Ser
				935					940					945

Ser	Gln	Ser	Arg	Pro	Cys	Pro	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Val	Ile	Leu	950	955	960
Pro	Ala	Ser	Ser	Met	Glu	Glu	Ala	Thr	Gly	Cys	Ala	Gly	Phe	Asn	965	970	975
Leu	Ile	His	Leu	Val	Ala	Thr	Gly	Ile	Ser	Cys	Phe	Leu	Gly	Ser	980	985	990
Gly	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Val	Tyr	Leu	Ser	Cys	Gln	His	Cys	Gln	995	1000	1005
Arg	Gln	Ser	Gln	Glu	Ser	Thr	Leu	Val	His	Pro	Ala	Thr	Pro	Asn	1010	1015	1020
His	Leu	His	Tyr	Lys	Gly	Gly	Gly	Thr	Pro	Lys	Asn	Glu	Lys	Tyr	1025	1030	1035
Thr	Pro	Met	Glu	Phe	Lys	Thr	Leu	Asn	Lys	Asn	Asn	Leu	Ile	Pro	1040	1045	1050
Asp	Asp	Arg	Ala	Asn	Phe	Tyr	Pro	Leu	Gln	Gln	Thr	Asn	Val	Tyr	1055	1060	1065
Thr	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Ser	Pro	Leu	Asn	Lys	His	Ser	Phe	Arg	1070	1075	1080
Pro	Glu	Ala	Ser	Pro	Gly	Gln	Arg	Cys	Phe	Pro	Asn	Ser			1085	1090	

<210> 8
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 8

ES 2 456 325 T3

Met	Trp	Val	Leu	Gly	Ile	Ala	Ala	Thr	Phe	Cys	Gly	Leu	Phe	Leu	1	5	10	15
Leu	Pro	Gly	Phe	Ala	Leu	Gln	Ile	Gln	Cys	Tyr	Gln	Cys	Glu	Glu	20	25	30	
Phe	Gln	Leu	Asn	Asn	Asp	Cys	Ser	Ser	Pro	Glu	Phe	Ile	Val	Asn	35	40	45	
Cys	Thr	Val	Asn	Val	Gln	Asp	Met	Cys	Gln	Lys	Glu	Val	Met	Glu	50	55	60	
Gln	Ser	Ala	Gly	Ile	Met	Tyr	Arg	Lys	Ser	Cys	Ala	Ser	Ser	Ala	65	70	75	
Ala	Cys	Leu	Ile	Ala	Ser	Ala	Gly	Tyr	Gln	Ser	Phe	Cys	Ser	Pro	80	85	90	
Gly	Lys	Leu	Asn	Ser	Val	Cys	Ile	Ser	Cys	Cys	Asn	Thr	Pro	Leu	95	100	105	
Cys	Asn	Gly	Pro	Arg	Pro	Lys	Lys	Arg	Gly	Ser	Ser	Ala	Ser	Ala	110	115	120	
Leu	Arg	Pro	Gly	Leu	Arg	Thr	Thr	Ile	Leu	Phe	Leu	Lys	Leu	Ala	125	130	135	
Leu	Phe	Ser	Ala	His	Cys	140												

<210> 9
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 9

Met	Gln	Pro	Pro	Pro	Ser	Leu	Cys	Gly	Arg	Ala	Leu	Val	Ala	Leu		1	5	10	15
Val	Leu	Ala	Cys	Gly	Leu	Ser	Arg	Ile	Trp	Gly	Glu	Glu	Arg	Gly		20	25	30	
Phe	Pro	Pro	Asp	Arg	Ala	Thr	Pro	Leu	Leu	Gln	Thr	Ala	Glu	Ile		35	40	45	
Met	Thr	Pro	Pro	Thr	Lys	Thr	Leu	Trp	Pro	Lys	Gly	Ser	Asn	Ala		50	55	60	
Ser	Leu	Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Pro	Ala	Glu	Val	Pro	Lys	Gly	Asp		65	70	75	
Arg	Thr	Ala	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Thr	Ile	Ser	Pro	Pro	Pro	Cys		80	85	90	
Gln	Gly	Pro	Ile	Glu	Ile	Lys	Glu	Thr	Phe	Lys	Tyr	Ile	Asn	Thr		95	100	105	
Val	Val	Ser	Cys	Leu	Val	Phe	Val	Leu	Gly	Ile	Ile	Gly	Asn	Ser		110	115	120	
Thr	Leu	Leu	Arg	Ile	Ile	Tyr	Lys	Asn	Lys	Cys	Met	Arg	Asn	Gly		125	130	135	
Pro	Asn	Ile	Leu	Ile	Ala	Ser	Leu	Ala	Leu	Gly	Asp	Leu	Leu	His		140	145	150	
Ile	Val	Ile	Asp	Ile	Pro	Ile	Asn	Val	Tyr	Lys	Leu	Leu	Ala	Glu		155	160	165	
Asp	Trp	Pro	Phe	Gly	Ala	Glu	Met	Cys	Lys	Leu	Val	Pro	Phe	Ile		170	175	180	
Gln	Lys	Ala	Ser	Val	Gly	Ile	Thr	Val	Leu	Ser	Leu	Cys	Ala	Leu		185	190	195	
Ser	Ile	Asp	Arg	Tyr	Arg	Ala	Val	Ala	Ser	Trp	Ser	Arg	Ile	Lys		200	205	210	
Gly	Ile	Gly	Val	Pro	Lys	Trp	Thr	Ala	Val	Glu	Ile	Val	Leu	Ile		215	220	225	
Trp	Val	Val	Ser	Val	Val	Leu	Ala	Val	Pro	Glu	Ala	Ile	Gly	Phe		230	235	240	
Asp	Ile	Ile	Thr	Met	Asp	Tyr	Lys	Gly	Ser	Tyr	Leu	Arg	Ile	Cys					

	245	250	255
Leu Leu His Pro	Val Gln Lys Thr Ala	Phe Met Gln Phe Tyr	Lys
	260	265	270
Thr Ala Lys Asp	Trp Trp Leu Phe Ser	Phe Tyr Phe Cys Leu	Pro
	275	280	285
Leu Ala Ile Thr	Ala Phe Phe Tyr Thr	Leu Met Thr Cys Glu	Met
	290	295	300
Leu Arg Lys Lys	Ser Gly Met Gln Ile	Ala Leu Asn Asp His	Leu
	305	310	315
Lys Gln Arg Arg	Glu Val Ala Lys Thr	Val Phe Cys Leu Val	Leu
	320	325	330
Val Phe Ala Leu	Cys Trp Leu Pro Leu	His Leu Ser Arg Ile	Leu
	335	340	345
Lys Leu Thr Leu	Tyr Asn Gln Asn Asp	Pro Asn Arg Cys Glu	Leu
	350	355	360
Leu Ser Phe Leu	Leu Val Leu Asp Tyr	Ile Gly Ile Asn Met	Ala
	365	370	375
Ser Leu Asn Ser	Cys Ile Asn Pro Ile	Ala Leu Tyr Leu Val	Ser
	380	385	390
Lys Arg Phe Lys	Asn Cys Phe Lys Ser	Cys Leu Cys Cys Trp	Cys
	395	400	405
Gln Ser Phe Glu	Glu Lys Gln Ser Leu	Glu Glu Lys Gln Ser	Cys
	410	415	420
Leu Lys Phe Lys	Ala Asn Asp His Gly	Tyr Asp Asn Phe Arg	Ser
	425	430	435
Ser Asn Lys Tyr	Ser Ser Ser		
	440		

<210> 10
 <211> 783
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

 <400> 10

ES 2 456 325 T3

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

Thr	Pro	Ala	Glu	Gly	Lys	Leu	Met	Gln	Ser	His	Pro	Leu	Tyr	Leu	
				80					85					90	
Cys	Asn	Ala	Ser	Asp	Asp	Asp	Asn	Leu	Glu	Pro	Gly	Phe	Ile	Ser	
				95					100					105	
Ile	Val	Lys	Leu	Glu	Ser	Pro	Arg	Arg	Ala	Pro	Arg	Pro	Cys	Leu	
				110					115					120	
Ser	Leu	Ala	Ser	Lys	Ala	Arg	Met	Ala	Gly	Glu	Arg	Gly	Ala	Ser	
				125					130					135	
Ala	Val	Leu	Phe	Asp	Ile	Thr	Glu	Asp	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	
				140					145					150	
Leu	Gln	Gln	Pro	Leu	Gly	Leu	Thr	Trp	Pro	Val	Val	Leu	Ile	Trp	
				155					160					165	
Gly	Asn	Asp	Ala	Glu	Lys	Leu	Met	Glu	Phe	Val	Tyr	Lys	Asn	Gln	
				170					175					180	
Lys	Ala	His	Val	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Glu	Pro	Pro	Ala	Trp	Pro	
				185					190					195	
Asp	Tyr	Asp	Val	Trp	Ile	Leu	Met	Thr	Val	Val	Gly	Thr	Ile	Phe	
				200					205					210	
Val	Ile	Ile	Leu	Ala	Ser	Val	Leu	Arg	Ile	Arg	Cys	Arg	Pro	Arg	
				215					220					225	
His	Ser	Arg	Pro	Asp	Pro	Leu	Gln	Gln	Arg	Thr	Ala	Trp	Ala	Ile	
				230					235					240	
Ser	Gln	Leu	Ala	Thr	Arg	Arg	Tyr	Gln	Ala	Ser	Cys	Arg	Gln	Ala	
				245					250					255	
Arg	Gly	Glu	Trp	Pro	Asp	Ser	Gly	Ser	Ser	Cys	Ser	Ser	Ala	Pro	
				260					265					270	
Val	Cys	Ala	Ile	Cys	Leu	Glu	Glu	Phe	Ser	Glu	Gly	Gln	Glu	Leu	
				275					280					285	
Arg	Val	Ile	Ser	Cys	Leu	His	Glu	Phe	His	Arg	Asn	Cys	Val	Asp	
				290					295					300	
Pro	Trp	Leu	His	Gln	His	Arg	Thr	Cys	Pro	Leu	Cys	Val	Phe	Asn	
				305					310					315	
Ile	Thr	Glu	Gly	Asp	Ser	Phe	Ser	Gln	Ser	Leu	Gly	Pro	Ser	Arg	
				320					325					330	
Ser	Tyr	Gln	Glu	Pro	Gly	Arg	Arg	Leu	His	Leu	Ile	Arg	Gln	His	
				335					340					345	
Pro	Gly	His	Ala	His	Tyr	His	Leu	Pro	Ala	Ala	Tyr	Leu	Leu	Gly	
				350					355					360	
Pro	Ser	Arg	Ser	Ala	Val	Ala	Arg	Pro	Pro	Arg	Pro	Gly	Pro	Phe	
				365					370					375	

Leu	Pro	Ser	Gln	Glu	Pro	Gly	Met	Gly	Pro	Arg	His	His	Arg	Phe	380	385	390
Pro	Arg	Ala	Ala	His	Pro	Arg	Ala	Pro	Gly	Glu	Gln	Gln	Arg	Leu	395	400	405
Ala	Gly	Ala	Gln	His	Pro	Tyr	Ala	Gln	Gly	Trp	Gly	Met	Ser	His	410	415	420
Leu	Gln	Ser	Thr	Ser	Gln	His	Pro	Ala	Ala	Cys	Pro	Val	Pro	Leu	425	430	435
Arg	Arg	Ala	Arg	Pro	Pro	Asp	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Glu	Ser	Tyr	440	445	450
Cys	Thr	Glu	Arg	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ala	Asp	Gly	Pro	Ala	Ser	Asp	455	460	465
Ser	Ser	Ser	Gly	Pro	Cys	His	Gly	Ser	Ser	Ser	Asp	Ser	Val	Val	470	475	480
Asn	Cys	Thr	Asp	Ile	Ser	Leu	Gln	Gly	Val	His	Gly	Ser	Ser	Ser	485	490	495
Thr	Phe	Cys	Ser	Ser	Leu	Ser	Ser	Asp	Phe	Asp	Pro	Leu	Val	Tyr	500	505	510
Cys	Ser	Pro	Lys	Gly	Asp	Pro	Gln	Arg	Val	Asp	Met	Gln	Pro	Ser	515	520	525
Val	Thr	Ser	Arg	Pro	Arg	Ser	Leu	Asp	Ser	Val	Val	Pro	Thr	Gly	530	535	540
Glu	Thr	Gln	Val	Ser	Ser	His	Val	His	Tyr	His	Arg	His	Arg	His	545	550	555
His	His	Tyr	Lys	Lys	Arg	Phe	Gln	Trp	His	Gly	Arg	Lys	Pro	Gly	560	565	570
Pro	Glu	Thr	Gly	Val	Pro	Gln	Ser	Arg	Pro	Pro	Ile	Pro	Arg	Thr	575	580	585
Gln	Pro	Gln	Pro	Glu	Pro	Pro	Ser	Pro	Asp	Gln	Gln	Val	Thr	Gly	590	595	600
Ser	Asn	Ser	Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Arg	Leu	Ser	Asn	Pro	Gln	Cys	605	610	615
Pro	Arg	Ala	Leu	Pro	Glu	Pro	Ala	Pro	Gly	Pro	Val	Asp	Ala	Ser	620	625	630
Ser	Ile	Cys	Pro	Ser	Thr	Ser	Ser	Leu	Phe	Asn	Leu	Gln	Lys	Ser	635	640	645
Ser	Leu	Ser	Ala	Arg	His	Pro	Gln	Arg	Lys	Arg	Arg	Gly	Gly	Pro	650	655	660
Ser	Glu	Pro	Thr	Pro	Gly	Ser	Arg	Pro	Gln	Asp	Ala	Thr	Val	His	665	670	675
Pro	Ala	Cys	Gln	Ile	Phe	Pro	His	Tyr	Thr	Pro	Ser	Val	Ala	Tyr			

					680						685					690
Pro	Trp	Ser	Pro	Glu	Ala	His	Pro	Leu	Ile	Cys	Gly	Pro	Pro	Gly		
				695					700					705		
Leu	Asp	Lys	Arg	Leu	Leu	Pro	Glu	Thr	Pro	Gly	Pro	Cys	Tyr	Ser		
				710					715					720		
Asn	Ser	Gln	Pro	Val	Trp	Leu	Cys	Leu	Thr	Pro	Arg	Gln	Pro	Leu		
				725					730					735		
Glu	Pro	His	Pro	Pro	Gly	Glu	Gly	Pro	Ser	Glu	Trp	Ser	Ser	Asp		
				740					745					750		
Thr	Ala	Glu	Gly	Arg	Pro	Cys	Pro	Tyr	Pro	His	Cys	Gln	Val	Leu		
				755					760					765		
Ser	Ala	Gln	Pro	Gly	Ser	Glu	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Leu	Cys	Glu		
				770					775					780		

Gln Ala Val

<210> 11
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

5

<400> 11

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

Tyr	Ile	Cys	Ser	Asn	Asn	Ile	Gln	Ala	Arg	Gln	Gln	Val	Ile	Glu	
				170					175					180	
Leu	Ala	Arg	Gln	Leu	Asn	Phe	Ile	Pro	Ile	Asp	Leu	Gly	Ser	Leu	
				185					190					195	
Ser	Ser	Ala	Arg	Glu	Ile	Glu	Asn	Leu	Pro	Leu	Arg	Leu	Phe	Thr	
				200					205					210	
Leu	Trp	Arg	Gly	Pro	Val	Val	Val	Ala	Ile	Ser	Leu	Ala	Thr	Phe	
				215					220					225	
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Phe	Val	Arg	Asp	Val	Ile	His	Pro	Tyr	Ala	
				230					235					240	
Arg	Asn	Gln	Gln	Ser	Asp	Phe	Tyr	Lys	Ile	Pro	Ile	Glu	Ile	Val	
				245					250					255	
Asn	Lys	Thr	Leu	Pro	Ile	Val	Ala	Ile	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	
				260					265					270	
Tyr	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Gln	Leu	Tyr	Tyr	Gly	
				275					280					285	
Thr	Lys	Tyr	Arg	Arg	Phe	Pro	Pro	Trp	Leu	Glu	Thr	Trp	Leu	Gln	
				290					295					300	
Cys	Arg	Lys	Gln	Leu	Gly	Leu	Leu	Ser	Phe	Phe	Phe	Ala	Met	Val	
				305					310					315	
His	Val	Ala	Tyr	Ser	Leu	Cys	Leu	Pro	Met	Arg	Arg	Ser	Glu	Arg	
				320					325					330	
Tyr	Leu	Phe	Leu	Asn	Met	Ala	Tyr	Gln	Gln	Val	His	Ala	Asn	Ile	
				335					340					345	
Glu	Asn	Ser	Trp	Asn	Glu	Glu	Glu	Val	Trp	Arg	Ile	Glu	Met	Tyr	
				350					355					360	
Ile	Ser	Phe	Gly	Ile	Met	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	
				365					370					375	
Val	Thr	Ser	Ile	Pro	Ser	Val	Ser	Asn	Ala	Leu	Asn	Trp	Arg	Glu	
				380					385					390	
Phe	Ser	Phe	Ile	Gln	Ser	Thr	Leu	Gly	Tyr	Val	Ala	Leu	Leu	Ile	
				395					400					405	
Ser	Thr	Phe	His	Val	Leu	Ile	Tyr	Gly	Trp	Lys	Arg	Ala	Phe	Glu	
				410					415					420	
Glu	Glu	Tyr	Tyr	Arg	Phe	Tyr	Thr	Pro	Pro	Asn	Phe	Val	Leu	Ala	
				425					430					435	
Leu	Val	Leu	Pro	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Gly	Lys	Ile	Ile	Leu	Phe	
				440					445					450	
Leu	Pro	Cys	Ile	Ser	Gln	Lys	Leu	Lys	Arg	Ile	Lys	Lys	Gly	Trp	
				455					460					465	

Glu Lys Ser Gln Phe Leu Glu Glu Gly Ile Gly Gly Thr Ile Pro
 470 475 480

His Val Ser Pro Glu Arg Val Thr Val Met
 485 490

5 <210> 12
 <211> 1214
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 12

Met	Val	Val	Pro	Glu	Lys	Glu	Gln	Ser	Trp	Ile	Pro	Lys	Ile	Phe	1	5	10	15
Lys	Lys	Lys	Thr	Cys	Thr	Thr	Phe	Ile	Val	Asp	Ser	Thr	Asp	Pro	20	25	30	
Gly	Gly	Thr	Leu	Cys	Gln	Cys	Gly	Arg	Pro	Arg	Thr	Ala	His	Pro	35	40	45	
Ala	Val	Ala	Met	Glu	Asp	Ala	Phe	Gly	Ala	Ala	Val	Val	Thr	Val	50	55	60	
Trp	Asp	Ser	Asp	Ala	His	Thr	Thr	Glu	Lys	Pro	Thr	Asp	Ala	Tyr	65	70	75	
Gly	Glu	Leu	Asp	Phe	Thr	Gly	Ala	Gly	Arg	Lys	His	Ser	Asn	Phe	80	85	90	
Leu	Arg	Leu	Ser	Asp	Arg	Thr	Asp	Pro	Ala	Ala	Val	Tyr	Ser	Leu	95	100	105	
Val	Thr	Arg	Thr	Trp	Gly	Phe	Arg	Ala	Pro	Asn	Leu	Val	Val	Ser	110	115	120	
Val	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Pro	Val	Leu	Gln	Thr	Trp	Leu	Gln	125	130	135	
Asp	Leu	Leu	Arg	Arg	Gly	Leu	Val	Arg	Ala	Ala	Gln	Ser	Thr	Gly	140	145	150	
Ala	Trp	Ile	Val	Thr	Gly	Gly	Leu	His	Thr	Gly	Ile	Gly	Arg	His	155	160	165	
Val	Gly	Val	Ala	Val	Arg	Asp	His	Gln	Met	Ala	Ser	Thr	Gly	Gly	170	175	180	
Thr	Lys	Val	Val	Ala	Met	Gly	Val	Ala	Pro	Trp	Gly	Val	Val	Arg	185	190	195	
Asn	Arg	Asp	Thr	Leu	Ile	Asn	Pro	Lys	Gly	Ser	Phe	Pro	Ala	Arg	200	205	210	
Tyr	Arg	Trp	Arg	Gly	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Val	Gln	Phe	Pro	Leu	215	220	225	
Asp	Tyr	Asn	Tyr	Ser	Ala	Phe	Phe	Leu	Val	Asp	Asp	Gly	Thr	His	230	235	240	
Gly	Cys	Leu	Gly	Gly	Glu	Asn	Arg	Phe	Arg	Leu	Arg	Leu	Glu	Ser				

	245		250		255
Tyr Ile Ser Gln	Gln Lys Thr Gly Val	Gly Gly Thr Gly Ile Asp			
	260		265		270
Ile Pro Val Leu	Leu Leu Leu Ile Asp	Gly Asp Glu Lys Met Leu			
	275		280		285
Thr Arg Ile Glu	Asn Ala Thr Gln Ala	Gln Leu Pro Cys Leu Leu			
	290		295		300
Val Ala Gly Ser	Gly Gly Ala Ala Asp	Cys Leu Ala Glu Thr Leu			
	305		310		315
Glu Asp Thr Leu	Ala Pro Gly Ser Gly	Gly Ala Arg Gln Gly Glu			
	320		325		330
Ala Arg Asp Arg	Ile Arg Arg Phe Phe	Pro Lys Gly Asp Leu Glu			
	335		340		345
Val Leu Gln Ala	Gln Val Glu Arg Ile	Met Thr Arg Lys Glu Leu			
	350		355		360
Leu Thr Val Tyr	Ser Ser Glu Asp Gly	Ser Glu Glu Phe Glu Thr			
	365		370		375
Ile Val Leu Lys	Ala Leu Val Lys Ala	Cys Gly Ser Ser Glu Ala			
	380		385		390
Ser Ala Tyr Leu	Asp Glu Leu Arg Leu	Ala Val Ala Trp Asn Arg			
	395		400		405
Val Asp Ile Ala	Gln Ser Glu Leu Phe	Arg Gly Asp Ile Gln Trp			
	410		415		420
Arg Ser Phe His	Leu Glu Ala Ser Leu	Met Asp Ala Leu Leu Asn			
	425		430		435
Asp Arg Pro Glu	Phe Val Arg Leu Leu	Ile Ser His Gly Leu Ser			
	440		445		450
Leu Gly His Phe	Leu Thr Pro Met Arg	Leu Ala Gln Leu Tyr Ser			
	455		460		465
Ala Ala Pro Ser	Asn Ser Leu Ile Arg	Asn Leu Leu Asp Gln Ala			
	470		475		480
Ser His Ser Ala	Gly Thr Lys Ala Pro	Ala Leu Lys Gly Gly Ala			
	485		490		495
Ala Glu Leu Arg	Pro Pro Asp Val Gly	His Val Leu Arg Met Leu			
	500		505		510
Leu Gly Lys Met	Cys Ala Pro Arg Tyr	Pro Ser Gly Gly Ala Trp			
	515		520		525
Asp Pro His Pro	Gly Gln Gly Phe Gly	Glu Ser Met Tyr Leu Leu			
	530		535		540
Ser Asp Lys Ala	Thr Ser Pro Leu Ser	Leu Asp Ala Gly Leu Gly			
	545		550		555

Gln	Ala	Pro	Trp	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu	Trp	Ala	Leu	Leu	Leu	Asn	560	565	570
Arg	Ala	Gln	Met	Ala	Met	Tyr	Phe	Trp	Glu	Met	Gly	Ser	Asn	Ala	575	580	585
Val	Ser	Ser	Ala	Leu	Gly	Ala	Cys	Leu	Leu	Leu	Arg	Val	Met	Ala	590	595	600
Arg	Leu	Glu	Pro	Asp	Ala	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Arg	Lys	Asp	Leu	605	610	615
Ala	Phe	Lys	Phe	Glu	Gly	Met	Gly	Val	Asp	Leu	Phe	Gly	Glu	Cys	620	625	630
Tyr	Arg	Ser	Ser	Glu	Val	Arg	Ala	Ala	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Arg	635	640	645
Cys	Pro	Leu	Trp	Gly	Asp	Ala	Thr	Cys	Leu	Gln	Leu	Ala	Met	Gln	650	655	660
Ala	Asp	Ala	Arg	Ala	Phe	Phe	Ala	Gln	Asp	Gly	Val	Gln	Ser	Leu	665	670	675
Leu	Thr	Gln	Lys	Trp	Trp	Gly	Asp	Met	Ala	Ser	Thr	Thr	Pro	Ile	680	685	690
Trp	Ala	Leu	Val	Leu	Ala	Phe	Phe	Cys	Pro	Pro	Leu	Ile	Tyr	Thr	695	700	705
Arg	Leu	Ile	Thr	Phe	Arg	Lys	Ser	Glu	Glu	Glu	Pro	Thr	Arg	Glu	710	715	720
Glu	Leu	Glu	Phe	Asp	Met	Asp	Ser	Val	Ile	Asn	Gly	Glu	Gly	Pro	725	730	735
Val	Gly	Thr	Ala	Asp	Pro	Ala	Glu	Lys	Thr	Pro	Leu	Gly	Val	Pro	740	745	750
Arg	Gln	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Cys	Cys	Gly	Gly	Arg	Cys	Gly	Gly	755	760	765
Arg	Arg	Cys	Leu	Arg	Arg	Trp	Phe	His	Phe	Trp	Gly	Ala	Pro	Val	770	775	780
Thr	Ile	Phe	Met	Gly	Asn	Val	Val	Ser	Tyr	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	785	790	795
Leu	Phe	Ser	Arg	Val	Leu	Leu	Val	Asp	Phe	Gln	Pro	Ala	Pro	Pro	800	805	810
Gly	Ser	Leu	Glu	Leu	Leu	Leu	Tyr	Phe	Trp	Ala	Phe	Thr	Leu	Leu	815	820	825
Cys	Glu	Glu	Leu	Arg	Gln	Gly	Leu	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Leu	830	835	840
Ala	Ser	Gly	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	His	Ala	Ser	Leu	Ser	Gln	Arg	845	850	855

Leu Arg Leu Tyr	Leu Ala Asp Ser Trp	Asn Gln Cys Asp	Leu Val
860	865		870
Ala Leu Thr Cys	Phe Leu Leu Gly Val	Gly Cys Arg Leu Thr	Pro
875	880		885
Gly Leu Tyr His	Leu Gly Arg Thr Val	Leu Cys Ile Asp	Phe Met
890	895		900
Val Phe Thr Val	Arg Leu Leu His Ile	Phe Thr Val Asn Lys	Gln
905	910		915
Leu Gly Pro Lys	Ile Val Ile Val Ser	Lys Met Met Lys Asp	Val
920	925		930
Phe Phe Phe Leu	Phe Phe Leu Gly Val	Trp Leu Val Ala Tyr	Gly
935	940		945
Val Ala Thr Glu	Gly Leu Leu Arg Pro	Arg Asp Ser Asp	Phe Pro
950	955		960
Ser Ile Leu Arg	Arg Val Phe Tyr Arg	Pro Tyr Leu Gln Ile	Phe
965	970		975
Gly Gln Ile Pro	Gln Glu Asp Met Asp	Val Ala Leu Met Glu	His
980	985		990
Ser Asn Cys Ser	Ser Glu Pro Gly Phe	Trp Ala His Pro	Pro Gly
995	1000		1005
Ala Gln Ala Gly	Thr Cys Val Ser Gln Tyr	Ala Asn Trp Leu	Val
1010	1015		1020
Val Leu Leu Leu	Val Ile Phe Leu Leu	Val Ala Asn Ile Leu	Leu
1025	1030		1035
Val Asn Leu Leu	Ile Ala Met Phe Ser Tyr	Thr Phe Gly Lys	Val
1040	1045		1050
Gln Gly Asn Ser	Asp Leu Tyr Trp Lys	Ala Gln Arg Tyr Arg	Leu
1055	1060		1065
Ile Arg Glu Phe	His Ser Arg Pro Ala	Leu Ala Pro Pro	Phe Ile
1070	1075		1080
Val Ile Ser His	Leu Arg Leu Leu Leu	Arg Gln Leu Cys Arg	Arg
1085	1090		1095
Pro Arg Ser Pro	Gln Pro Ser Ser Pro	Ala Leu Glu His	Phe Arg
1100	1105		1110
Val Tyr Leu Ser	Lys Glu Ala Glu Arg	Lys Leu Leu Thr	Trp Glu
1115	1120		1125
Ser Val His Lys	Glu Asn Phe Leu Leu	Ala Arg Ala Arg	Asp Lys
1130	1135		1140
Arg Glu Ser Asp	Ser Glu Arg Leu Lys	Arg Thr Ser Gln	Lys Val
1145	1150		1155
Asp Leu Ala Leu	Lys Gln Leu Gly His	Ile Arg Glu Tyr	Glu Gln

1160	1165	1170
Arg Leu Lys Val Leu Glu Arg Glu Val Gln Gln Cys Ser Arg Val		
1175	1180	1185
Leu Gly Trp Val Ala Glu Ala Leu Ser Arg Ser Ala Leu Leu Pro		
1190	1195	1200
Pro Gly Gly Pro Pro Pro Pro Asp Leu Pro Gly Ser Lys Asp		
1205	1210	

<210> 13
<211> 188
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 13

[illegible]

<210> 14
<211> 1033

<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 14

5

Met	Gly	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Gly	Val	Phe	Leu	Ala	Leu	Val	Ala	1	5	10	15
Pro	Gly	Val	Leu	Gly	Ile	Ser	Cys	Gly	Ser	Pro	Pro	Pro	Ile	Leu	20	25	30	
Asn	Gly	Arg	Ile	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Pro	Ile	Ala	Val	Gly	Thr	35	40	45	
Val	Ile	Arg	Tyr	Ser	Cys	Ser	Gly	Thr	Phe	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	50	55	60	
Lys	Ser	Leu	Leu	Cys	Ile	Thr	Lys	Asp	Lys	Val	Asp	Gly	Thr	Trp	65	70	75	
Asp	Lys	Pro	Ala	Pro	Lys	Cys	Glu	Tyr	Phe	Asn	Lys	Tyr	Ser	Ser	80	85	90	
Cys	Pro	Glu	Pro	Ile	Val	Pro	Gly	Gly	Tyr	Lys	Ile	Arg	Gly	Ser	95	100	105	
Thr	Pro	Tyr	Arg	His	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	Phe	Ala	Cys	Lys	Thr	110	115	120	
Asn	Phe	Ser	Met	Asn	Gly	Asn	Lys	Ser	Val	Trp	Cys	Gln	Ala	Asn	125	130	135	
Asn	Met	Trp	Gly	Pro	Thr	Arg	Leu	Pro	Thr	Cys	Val	Ser	Val	Phe	140	145	150	
Pro	Leu	Glu	Cys	Pro	Ala	Leu	Pro	Met	Ile	His	Asn	Gly	His	His	155	160	165	
Thr	Ser	Glu	Asn	Val	Gly	Ser	Ile	Ala	Pro	Gly	Leu	Ser	Val	Thr	170	175	180	
Tyr	Ser	Cys	Glu	Ser	Gly	Tyr	Leu	Leu	Val	Gly	Glu	Lys	Ile	Ile	185	190	195	
Asn	Cys	Leu	Ser	Ser	Gly	Lys	Trp	Ser	Ala	Val	Pro	Pro	Thr	Cys	200	205	210	
Glu	Glu	Ala	Arg	Cys	Lys	Ser	Leu	Gly	Arg	Phe	Pro	Asn	Gly	Lys	215	220	225	
Val	Lys	Glu	Pro	Pro	Ile	Leu	Arg	Val	Gly	Val	Thr	Ala	Asn	Phe	230	235	240	
Phe	Cys	Asp	Glu	Gly	Tyr	Arg	Leu	Gln	Gly	Pro	Pro	Ser	Ser	Arg	245	250	255	
Cys	Val	Ile	Ala	Gly	Gln	Gly	Val	Ala	Trp	Thr	Lys	Met	Pro	Val	260	265	270	
Cys	Glu	Glu	Ile	Phe	Cys	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro	Ile	Leu	Asn	Gly	275	280	285	
Arg	His	Ile	Gly	Asn	Ser	Leu	Ala	Asn	Val	Ser	Tyr	Gly	Ser	Ile	290	295	300	

Val	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asp	Pro	Asp	Pro	Glu	Glu	Gly	Val	Asn	Phe	
				305					310					315	
Ile	Leu	Ile	Gly	Glu	Ser	Thr	Leu	Arg	Cys	Thr	Val	Asp	Ser	Gln	
				320					325					330	
Lys	Thr	Gly	Thr	Trp	Ser	Gly	Pro	Ala	Pro	Arg	Cys	Glu	Leu	Ser	
				335					340					345	
Thr	Ser	Ala	Val	Gln	Cys	Pro	His	Pro	Gln	Ile	Leu	Arg	Gly	Arg	
				350					355					360	
Met	Val	Ser	Gly	Gln	Lys	Asp	Arg	Tyr	Thr	Tyr	Asn	Asp	Thr	Val	
				365					370					375	
Ile	Phe	Ala	Cys	Met	Phe	Gly	Phe	Thr	Leu	Lys	Gly	Ser	Lys	Gln	
				380					385					390	
Ile	Arg	Cys	Asn	Ala	Gln	Gly	Thr	Trp	Glu	Pro	Ser	Ala	Pro	Val	
				395					400					405	
Cys	Glu	Lys	Glu	Cys	Gln	Ala	Pro	Pro	Asn	Ile	Leu	Asn	Gly	Gln	
				410					415					420	
Lys	Glu	Asp	Arg	His	Met	Val	Arg	Phe	Asp	Pro	Gly	Thr	Ser	Ile	
				425					430					435	
Lys	Tyr	Ser	Cys	Asn	Pro	Gly	Tyr	Val	Leu	Val	Gly	Glu	Glu	Ser	
				440					445					450	
Ile	Gln	Cys	Thr	Ser	Glu	Gly	Val	Trp	Thr	Pro	Pro	Val	Pro	Gln	
				455					460					465	
Cys	Lys	Val	Ala	Ala	Cys	Glu	Ala	Thr	Gly	Arg	Gln	Leu	Leu	Thr	
				470					475					480	
Lys	Pro	Gln	His	Gln	Phe	Val	Arg	Pro	Asp	Val	Asn	Ser	Ser	Cys	
				485					490					495	
Gly	Glu	Gly	Tyr	Lys	Leu	Ser	Gly	Ser	Val	Tyr	Gln	Glu	Cys	Gln	
				500					505					510	
Gly	Thr	Ile	Pro	Trp	Phe	Met	Glu	Ile	Arg	Leu	Cys	Lys	Glu	Ile	
				515					520					525	
Thr	Cys	Pro	Pro	Pro	Pro	Val	Ile	Tyr	Asn	Gly	Ala	His	Thr	Gly	
				530					535					540	
Ser	Ser	Leu	Glu	Asp	Phe	Pro	Tyr	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Tyr	Thr	
				545					550					555	
Cys	Asn	Pro	Gly	Pro	Glu	Arg	Gly	Val	Glu	Phe	Ser	Leu	Ile	Gly	
				560					565					570	
Glu	Ser	Thr	Ile	Arg	Cys	Thr	Ser	Asn	Asp	Gln	Glu	Arg	Gly	Thr	
				575					580					585	
Trp	Ser	Gly	Pro	Ala	Pro	Leu	Cys	Lys	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	Val	
				590					595					600	
Gln	Cys	Ser	His	Val	His	Ile	Ala	Asn	Gly	Tyr	Lys	Ile	Ser	Gly	

605										610				615			
Lys	Glu	Ala	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Asn	Asp	Thr	Val	Thr	Phe	Lys	Cys			
				620					625					630			
Tyr	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu	Lys	Gly	Ser	Ser	Gln	Ile	Arg	Cys	Lys			
				635					640					645			
Ala	Asp	Asn	Thr	Trp	Asp	Pro	Glu	Ile	Pro	Val	Cys	Glu	Lys	Glu			
				650					655					660			
Thr	Cys	Gln	His	Val	Arg	Gln	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Pro	Ala	Gly			
				665					670					675			
Ser	Arg	Val	Glu	Leu	Val	Asn	Thr	Ser	Cys	Gln	Asp	Gly	Tyr	Gln			
				680					685					690			
Leu	Thr	Gly	His	Ala	Tyr	Gln	Met	Cys	Gln	Asp	Ala	Glu	Asn	Gly			
				695					700					705			
Ile	Trp	Phe	Lys	Lys	Ile	Pro	Leu	Cys	Lys	Val	Ile	His	Cys	His			
				710					715					720			
Pro	Pro	Pro	Val	Ile	Val	Asn	Gly	Lys	His	Thr	Gly	Met	Met	Ala			
				725					730					735			
Glu	Asn	Phe	Leu	Tyr	Gly	Asn	Glu	Val	Ser	Tyr	Glu	Cys	Asp	Gln			
				740					745					750			
Gly	Phe	Tyr	Leu	Leu	Gly	Glu	Lys	Lys	Leu	Gln	Cys	Arg	Ser	Asp			
				755					760					765			
Ser	Lys	Gly	His	Gly	Ser	Trp	Ser	Gly	Pro	Ser	Pro	Gln	Cys	Leu			
				770					775					780			
Arg	Ser	Pro	Pro	Val	Thr	Arg	Cys	Pro	Asn	Pro	Glu	Val	Lys	His			
				785					790					795			
Gly	Tyr	Lys	Leu	Asn	Lys	Thr	His	Ser	Ala	Tyr	Ser	His	Asn	Asp			
				800					805					810			
Ile	Val	Tyr	Val	Asp	Cys	Asn	Pro	Gly	Phe	Ile	Met	Asn	Gly	Ser			
				815					820					825			
Arg	Val	Ile	Arg	Cys	His	Thr	Asp	Asn	Thr	Trp	Val	Pro	Gly	Val			
				830					835					840			
Pro	Thr	Cys	Ile	Lys	Lys	Ala	Phe	Ile	Gly	Cys	Pro	Pro	Pro	Pro			
				845					850					855			
Lys	Thr	Pro	Asn	Gly	Asn	His	Thr	Gly	Gly	Asn	Ile	Ala	Arg	Phe			
				860					865					870			
Ser	Pro	Gly	Met	Ser	Ile	Leu	Tyr	Ser	Cys	Asp	Gln	Gly	Tyr	Leu			
				875					880					885			
Leu	Val	Gly	Glu	Ala	Leu	Leu	Leu	Cys	Thr	His	Glu	Gly	Thr	Trp			
				890					895					900			
Ser	Gln	Pro	Ala	Pro	His	Cys	Lys	Glu	Val	Asn	Cys	Ser	Ser	Pro			
				905					910					915			

Ala	Asp	Met	Asp	Gly	Ile	Gln	Lys	Gly	Leu	Glu	Pro	Arg	Lys	Met	920	925	930
Tyr	Gln	Tyr	Gly	Ala	Val	Val	Thr	Leu	Glu	Cys	Glu	Asp	Gly	Tyr	935	940	945
Met	Leu	Glu	Gly	Ser	Pro	Gln	Ser	Gln	Cys	Gln	Ser	Asp	His	Gln	950	955	960
Trp	Asn	Pro	Pro	Leu	Ala	Val	Cys	Arg	Ser	Arg	Ser	Leu	Ala	Pro	965	970	975
Val	Leu	Cys	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly	Leu	Ile	Leu	Leu	Thr	Phe	Leu	980	985	990
Ile	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Val	Ile	Ser	Lys	His	Arg	Glu	Arg	Asn	995	1000	1005
Tyr	Tyr	Thr	Asp	Thr	Ser	Gln	Lys	Glu	Ala	Phe	His	Leu	Glu	Ala	1010	1015	1020
Arg	Glu	Val	Tyr	Ser	Val	Asp	Pro	Tyr	Asn	Pro	Ala	Ser			1025	1030	

<210> 15
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

 <400> 15

ES 2 456 325 T3

Met	Ala	Arg	Leu	Ala	Leu	Ser	Pro	Val	Pro	Ser	His	Trp	Met	Val	1	5	10	15
Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Ala	Glu	Pro	Val	Pro	Ala	Ala	Arg	20	25	30	
Ser	Glu	Asp	Arg	Tyr	Arg	Asn	Pro	Lys	Gly	Ser	Ala	Cys	Ser	Arg	35	40	45	
Ile	Trp	Gln	Ser	Pro	Arg	Phe	Ile	Ala	Arg	Lys	Arg	Gly	Phe	Thr	50	55	60	
Val	Lys	Met	His	Cys	Tyr	Met	Asn	Ser	Ala	Ser	Gly	Asn	Val	Ser	65	70	75	
Trp	Leu	Trp	Lys	Gln	Glu	Met	Asp	Glu	Asn	Pro	Gln	Gln	Leu	Lys	80	85	90	
Leu	Glu	Lys	Gly	Arg	Met	Glu	Glu	Ser	Gln	Asn	Glu	Ser	Leu	Ala	95	100	105	
Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Gly	Ile	Arg	Phe	Glu	Asp	Asn	Gly	Ile	Tyr	110	115	120	
Phe	Cys	Gln	Gln	Lys	Cys	Asn	Asn	Thr	Ser	Glu	Val	Tyr	Gln	Gly	125	130	135	
Cys	Gly	Thr	Glu	Leu	Arg	Val	Met	Gly	Phe	Ser	Thr	Leu	Ala	Gln	140	145	150	
Leu	Lys	Gln	Arg	Asn	Thr	Leu	Lys	Asp	Gly	Ile	Ile	Met	Ile	Gln	155	160	165	
Thr	Leu	Leu	Ile	Ile	Leu	Phe	Ile	Ile	Val	Pro	Ile	Phe	Leu	Leu	170	175	180	
Leu	Asp	Lys	Asp	Asp	Ser	Lys	Ala	Gly	Met	Glu	Glu	Asp	His	Thr	185	190	195	
Tyr	Glu	Gly	Leu	Asp	Ile	Asp	Gln	Thr	Ala	Thr	Tyr	Glu	Asp	Ile	200	205	210	
Val	Thr	Leu	Arg	Thr	Gly	Glu	Val	Lys	Trp	Ser	Val	Gly	Glu	His	215	220	225	
Pro	Gly	Gln	Glu															

<210> 16
 <211> 508
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

 <400> 16

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

				185					190					195
His	Val	Gln	Arg	Ile	Pro	Ile	Ser	Asn	Val	Ser	Leu	Glu	Ile	Arg
				200					205					210
Ala	Pro	Gly	Gly	Gln	Val	Thr	Glu	Gly	Gln	Lys	Leu	Ile	Leu	Leu
				215					220					225
Cys	Ser	Val	Ala	Gly	Gly	Thr	Gly	Asn	Val	Thr	Phe	Ser	Trp	Tyr
				230					235					240
Arg	Glu	Ala	Thr	Gly	Thr	Ser	Met	Gly	Lys	Lys	Thr	Gln	Arg	Ser
				245					250					255
Leu	Ser	Ala	Glu	Leu	Glu	Ile	Pro	Ala	Val	Lys	Glu	Ser	Asp	Ala
				260					265					270
Gly	Lys	Tyr	Tyr	Cys	Arg	Ala	Asp	Asn	Gly	His	Val	Pro	Ile	Gln
				275					280					285
Ser	Lys	Val	Val	Asn	Ile	Pro	Val	Arg	Ile	Pro	Val	Ser	Arg	Pro
				290					295					300
Val	Leu	Thr	Leu	Arg	Ser	Pro	Gly	Ala	Gln	Ala	Ala	Val	Gly	Asp
				305					310					315
Leu	Leu	Glu	Leu	His	Cys	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Pro	Pro	Ile
				320					325					330
Leu	Tyr	Gln	Phe	Tyr	His	Glu	Asp	Val	Thr	Leu	Gly	Asn	Ser	Ser
				335					340					345
Ala	Pro	Ser	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser	Phe	Asn	Leu	Ser	Leu	Thr	Ala
				350					355					360
Glu	His	Ser	Gly	Asn	Tyr	Ser	Cys	Glu	Ala	Asn	Asn	Gly	Leu	Gly
				365					370					375
Ala	Gln	Cys	Ser	Glu	Ala	Val	Pro	Val	Ser	Ile	Ser	Gly	Pro	Asp
				380					385					390
Gly	Tyr	Arg	Arg	Asp	Leu	Met	Thr	Ala	Gly	Val	Leu	Trp	Gly	Leu
				395					400					405
Phe	Gly	Val	Leu	Gly	Phe	Thr	Gly	Val	Ala	Leu	Leu	Leu	Tyr	Ala
				410					415					420
Leu	Phe	His	Lys	Ile	Ser	Gly	Glu	Ser	Ser	Ala	Thr	Asn	Glu	Pro
				425					430					435
Arg	Gly	Ala	Ser	Arg	Pro	Asn	Pro	Gln	Glu	Phe	Thr	Tyr	Ser	Ser
				440					445					450
Pro	Thr	Pro	Asp	Met	Glu	Glu	Leu	Gln	Pro	Val	Tyr	Val	Asn	Val
				455					460					465
Gly	Ser	Val	Asp	Val	Asp	Val	Val	Tyr	Ser	Gln	Val	Trp	Ser	Met
				470					475					480
Gln	Gln	Pro	Glu	Ser	Ser	Ala	Asn	Ile	Arg	Thr	Leu	Leu	Glu	Asn
				485					490					495

Lys Asp Ser Gln Val Ile Tyr Ser Ser Val Lys Lys Ser
500 505

5
<210> 17
<211> 1255
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 17

Met	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Cys	Arg	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	1	5	10	15
Leu	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr	Asp	20	25	30	
Met	Lys	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met	35	40	45	
Leu	Arg	His	Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	50	55	60	
Glu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	65	70	75	
Asp	Ile	Gln	Glu	Val	Gln	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln	80	85	90	
Val	Arg	Gln	Val	Pro	Leu	Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	95	100	105	
Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	110	115	120	
Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr	Pro	Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	125	130	135	
Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	140	145	150	
Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg	Asn	Pro	Gln	Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	155	160	165	
Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile	Phe	His	Lys	Asn	Asn	Gln	Leu	Ala	170	175	180	
Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg	Ala	Cys	His	Pro	Cys	185	190	195	
Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp	Gly	Glu	Ser	Ser	Glu	200	205	210	
Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Ala	215	220	225	
Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Gln	Cys	230	235	240	
Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Cys	245	250	255	

Leu	His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro	Ala	
				260					265					270	
Leu	Val	Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro	
				275					280					285	
Glu	Gly	Arg	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	
				290					295					300	
Tyr	Asn	Tyr	Leu	Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	
				305					310					315	
Pro	Leu	His	Asn	Gln	Glu	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	
				320					325					330	
Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	Lys	Pro	Cys	Ala	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	
				335					340					345	
Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	Glu	Val	Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Asn	
				350					355					360	
Ile	Gln	Glu	Phe	Ala	Gly	Cys	Lys	Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	
				365					370					375	
Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Gly	Asp	Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	
				380					385					390	
Pro	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	Val	Phe	Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	
				395					400					405	
Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	Pro	Asp	Ser	Leu	Pro	
				410					415					420	
Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Gln	Val	Ile	Arg	Gly	Arg	Ile	
				425					430					435	
Leu	His	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu	Gly	Ile	
				440					445					450	
Ser	Trp	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly	Leu	
				455					460					465	
Ala	Leu	Ile	His	His	Asn	Thr	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	Thr	Val	
				470					475					480	
Pro	Trp	Asp	Gln	Leu	Phe	Arg	Asn	Pro	His	Gln	Ala	Leu	Leu	His	
				485					490					495	
Thr	Ala	Asn	Arg	Pro	Glu	Asp	Glu	Cys	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Ala	
				500					505					510	
Cys	His	Gln	Leu	Cys	Ala	Arg	Gly	His	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	
				515					520					525	
Thr	Gln	Cys	Val	Asn	Cys	Ser	Gln	Phe	Leu	Arg	Gly	Gln	Glu	Cys	
				530					535					540	
Val	Glu	Glu	Cys	Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Pro	Arg	Glu	Tyr	Val	
				545					550					555	
Asn	Ala	Arg	His	Cys	Leu	Pro	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Gln	Pro	Gln	

560										565					570				
Asn	Gly	Ser	Val	Thr	Cys	Phe	Gly	Pro	Glu	Ala	Asp	Gln	Cys	Val					
				575					580					585					
Ala	Cys	Ala	His	Tyr	Lys	Asp	Pro	Pro	Phe	Cys	Val	Ala	Arg	Cys					
				590					595					600					
Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Pro	Asp	Leu	Ser	Tyr	Met	Pro	Ile	Trp	Lys					
				605					610					615					
Phe	Pro	Asp	Glu	Glu	Gly	Ala	Cys	Gln	Pro	Cys	Pro	Ile	Asn	Cys					
				620					625					630					
Thr	His	Ser	Cys	Val	Asp	Leu	Asp	Asp	Lys	Gly	Cys	Pro	Ala	Glu					
				635					640					645					
Gln	Arg	Ala	Ser	Pro	Leu	Thr	Ser	Ile	Ile	Ser	Ala	Val	Val	Gly					
				650					655					660					
Ile	Leu	Leu	Val	Val	Val	Leu	Gly	Val	Val	Phe	Gly	Ile	Leu	Ile					
				665					670					675					
Lys	Arg	Arg	Gln	Gln	Lys	Ile	Arg	Lys	Tyr	Thr	Met	Arg	Arg	Leu					
				680					685					690					
Leu	Gln	Glu	Thr	Glu	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly	Ala					
				695					700					705					
Met	Pro	Asn	Gln	Ala	Gln	Met	Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Thr	Glu	Leu					
				710					715					720					
Arg	Lys	Val	Lys	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Ala	Phe	Gly	Thr	Val	Tyr					
				725					730					735					
Lys	Gly	Ile	Trp	Ile	Pro	Asp	Gly	Glu	Asn	Val	Lys	Ile	Pro	Val					
				740					745					750					
Ala	Ile	Lys	Val	Leu	Arg	Glu	Asn	Thr	Ser	Pro	Lys	Ala	Asn	Lys					
				755					760					765					
Glu	Ile	Leu	Asp	Glu	Ala	Tyr	Val	Met	Ala	Gly	Val	Gly	Ser	Pro					
				770					775					780					
Tyr	Val	Ser	Arg	Leu	Leu	Gly	Ile	Cys	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln					
				785					790					795					
Leu	Val	Thr	Gln	Leu	Met	Pro	Tyr	Gly	Cys	Leu	Leu	Asp	His	Val					
				800					805					810					
Arg	Glu	Asn	Arg	Gly	Arg	Leu	Gly	Ser	Gln	Asp	Leu	Leu	Asn	Trp					
				815					820					825					
Cys	Met	Gln	Ile	Ala	Lys	Gly	Met	Ser	Tyr	Leu	Glu	Asp	Val	Arg					
				830					835					840					
Leu	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Leu	Val	Lys	Ser					
				845					850					855					
Pro	Asn	His	Val	Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Leu	Leu					
				860					865					870					

Asp	Ile	Asp	Glu	Thr	Glu	Tyr	His	Ala	Asp	Gly	Gly	Lys	Val	Pro			
				875					880					885			
Ile	Lys	Trp	Met	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	Arg	Arg	Arg	Phe	Thr			
				890					895					900			
His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Thr	Val	Trp	Glu	Leu			
				905					910					915			
Met	Thr	Phe	Gly	Ala	Lys	Pro	Tyr	Asp	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Glu			
				920					925					930			
Ile	Pro	Asp	Leu	Leu	Glu	Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro			
				935					940					945			
Ile	Cys	Thr	Ile	Asp	Val	Tyr	Met	Ile	Met	Val	Lys	Cys	Trp	Met			
				950					955					960			
Ile	Asp	Ser	Glu	Cys	Arg	Pro	Arg	Phe	Arg	Glu	Leu	Val	Ser	Glu			
				965					970					975			
Phe	Ser	Arg	Met	Ala	Arg	Asp	Pro	Gln	Arg	Phe	Val	Val	Ile	Gln			
				980					985					990			
Asn	Glu	Asp	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Pro	Leu	Asp	Ser	Thr	Phe	Tyr			
				995					1000					1005			
Arg	Ser	Leu	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Met	Gly	Asp	Leu	Val	Asp	Ala			
				1010					1015					1020			
Glu	Glu	Tyr	Leu	Val	Pro	Gln	Gln	Gly	Phe	Phe	Cys	Pro	Asp	Pro			
				1025					1030					1035			
Ala	Pro	Gly	Ala	Gly	Gly	Met	Val	His	His	Arg	His	Arg	Ser	Ser			
				1040					1045					1050			
Ser	Thr	Arg	Ser	Gly	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro			
				1055					1060					1065			
Ser	Glu	Glu	Glu	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Glu	Gly			
				1070					1075					1080			
Ala	Gly	Ser	Asp	Val	Phe	Asp	Gly	Asp	Leu	Gly	Met	Gly	Ala	Ala			
				1085					1090					1095			
Lys	Gly	Leu	Gln	Ser	Leu	Pro	Thr	His	Asp	Pro	Ser	Pro	Leu	Gln			
				1100					1105					1110			
Arg	Tyr	Ser	Glu	Asp	Pro	Thr	Val	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	Thr	Asp			
				1115					1120					1125			
Gly	Tyr	Val	Ala	Pro	Leu	Thr	Cys	Ser	Pro	Gln	Pro	Glu	Tyr	Val			
				1130					1135					1140			
Asn	Gln	Pro	Asp	Val	Arg	Pro	Gln	Pro	Pro	Ser	Pro	Arg	Glu	Gly			
				1145					1150					1155			
Pro	Leu	Pro	Ala	Ala	Arg	Pro	Ala	Gly	Ala	Thr	Leu	Glu	Arg	Pro			
				1160					1165					1170			

Lys	Thr	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Asn	Gly	Val	Val	Lys	Asp	Val	Phe
				1175					1180					1185
Ala	Phe	Gly	Gly	Ala	Val	Glu	Asn	Pro	Glu	Tyr	Leu	Thr	Pro	Gln
				1190					1195					1200
Gly	Gly	Ala	Ala	Pro	Gln	Pro	His	Pro	Pro	Pro	Ala	Phe	Ser	Pro
				1205					1210					1215
Ala	Phe	Asp	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Asp	Gln	Asp	Pro	Pro	Glu	Arg
				1220					1225					1230
Gly	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr	Phe	Lys	Gly	Thr	Pro	Thr	Ala	Glu	Asn
				1235					1240					1245
Pro	Glu	Tyr	Leu	Gly	Leu	Asp	Val	Pro	Val					
				1250					1255					

<210> 18
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Homo sapien
 <400> 18

5

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

	185	190	195
Gly Asn Met Thr	Leu Thr Leu Leu Ser	Val Lys Arg Asn Asp	Ala
	200	205	210
Gly Ser Tyr Glu	Cys Glu Ile Gln Asn	Pro Ala Ser Ala Asn	Arg
	215	220	225
Ser Asp Pro Val	Thr Leu Asn Val Leu	Tyr Gly Pro Asp Val	Pro
	230	235	240
Thr Ile Ser Pro	Ser Lys Ala Asn Tyr	Arg Pro Gly Glu Asn	Leu
	245	250	255
Asn Leu Ser Cys	His Ala Ala Ser Asn	Pro Pro Ala Gln Tyr	Ser
	260	265	270
Trp Phe Ile Asn	Gly Thr Phe Gln Gln	Ser Thr Gln Glu Leu	Phe
	275	280	285
Ile Pro Asn Ile	Thr Val Asn Asn Ser	Gly Ser Tyr Met Cys	Gln
	290	295	300
Ala His Asn Ser	Ala Thr Gly Leu Asn	Arg Thr Thr Val Thr	Met
	305	310	315
Ile Thr Val Ser	Gly Ser Ala Pro Val	Leu Ser Ala Val Ala	Thr
	320	325	330
Val Gly Ile Thr	Ile Gly Val Leu Ala	Arg Val Ala Leu Ile	
	335	340	

<210> 19
 <211> 411
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 19

ES 2 456 325 T3

Met	Trp	Ser	Gly	Trp	Trp	Leu	Trp	Pro	Leu	Val	Ala	Val	Cys	Thr
1				5					10					15
Ala	Asp	Phe	Phe	Arg	Asp	Glu	Ala	Glu	Arg	Ile	Met	Arg	Asp	Ser
				20					25					30
Pro	Val	Ile	Asp	Gly	His	Asn	Asp	Leu	Pro	Trp	Gln	Leu	Leu	Asp
				35					40					45
Met	Phe	Asn	Asn	Arg	Leu	Gln	Asp	Glu	Arg	Ala	Asn	Leu	Thr	Thr
				50					55					60
Leu	Ala	Gly	Thr	His	Thr	Asn	Ile	Pro	Lys	Leu	Arg	Ala	Gly	Phe
				65					70					75
Val	Gly	Gly	Gln	Phe	Trp	Ser	Val	Tyr	Thr	Pro	Cys	Asp	Thr	Gln
				80					85					90
Asn	Lys	Asp	Ala	Val	Arg	Arg	Thr	Leu	Glu	Gln	Met	Asp	Val	Val
				95					100					105
His	Arg	Met	Cys	Arg	Met	Tyr	Pro	Glu	Thr	Phe	Leu	Tyr	Val	Thr
				110					115					120

Ser Ser Ala Gly	Ile Arg Gln Ala Phe Arg Glu Gly Lys Val Ala	125	130	135
Ser Leu Ile Gly	Val Glu Gly Gly His Ser Ile Asp Ser Ser Leu	140	145	150
Gly Val Leu Arg	Ala Leu Tyr Gln Leu Gly Met Arg Tyr Leu Thr	155	160	165
Leu Thr His Ser	Cys Asn Thr Pro Trp Ala Asp Asn Trp Leu Val	170	175	180
Asp Thr Gly Asp	Ser Glu Pro Gln Ser Gln Gly Leu Ser Pro Phe	185	190	195
Gly Gln Arg Val	Val Lys Glu Leu Asn Arg Leu Gly Val Leu Ile	200	205	210
Asp Leu Ala His	Val Ser Val Ala Thr Met Lys Ala Thr Leu Gln	215	220	225
Leu Ser Arg Ala	Pro Val Ile Phe Ser His Ser Ser Ala Tyr Ser	230	235	240
Val Cys Ala Ser	Arg Arg Asn Val Pro Asp Asp Val Leu Arg Leu	245	250	255
Val Lys Gln Thr	Asp Ser Leu Val Met Val Asn Phe Tyr Asn Asn	260	265	270
Tyr Ile Ser Cys	Thr Asn Lys Ala Asn Leu Ser Gln Val Ala Asp	275	280	285
His Leu Asp His	Ile Lys Glu Val Ala Gly Ala Arg Ala Val Gly	290	295	300
Phe Gly Gly Asp	Phe Asp Gly Val Pro Arg Val Pro Glu Gly Leu	305	310	315
Glu Asp Val Ser	Lys Tyr Pro Asp Leu Ile Ala Glu Leu Leu Arg	320	325	330
Arg Asn Trp Thr	Glu Ala Glu Val Lys Gly Ala Leu Ala Asp Asn	335	340	345
Leu Leu Arg Val	Phe Glu Ala Val Glu Gln Ala Ser Asn Leu Thr	350	355	360
Gln Ala Pro Glu	Glu Glu Pro Ile Pro Leu Asp Gln Leu Gly Gly	365	370	375
Ser Cys Arg Thr	His Tyr Gly Tyr Ser Ser Gly Ala Ser Ser Leu	380	385	390
His Arg His Trp	Gly Leu Leu Leu Ala Ser Leu Ala Pro Leu Val	395	400	405
Leu Cys Leu Ser	Leu Leu	410		

5 <210> 20
 <211> 553
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

 <400> 20

Met	Arg	Ala	Pro	Gly	Arg	Pro	Ala	Leu	Arg	Pro	Leu	Pro	Leu	Pro	1	5	10	15
Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Pro	Trp	Gly	Arg	Ala	Val	20	25	30	
Pro	Cys	Val	Ser	Gly	Gly	Leu	Pro	Lys	Pro	Ala	Asn	Ile	Thr	Phe	35	40	45	
Leu	Ser	Ile	Asn	Met	Lys	Asn	Val	Leu	Gln	Trp	Thr	Pro	Pro	Glu	50	55	60	
Gly	Leu	Gln	Gly	Val	Lys	Val	Thr	Tyr	Thr	Val	Gln	Tyr	Phe	Ile	65	70	75	
Tyr	Gly	Gln	Lys	Lys	Trp	Leu	Asn	Lys	Ser	Glu	Cys	Arg	Asn	Ile	80	85	90	
Asn	Arg	Thr	Tyr	Cys	Asp	Leu	Ser	Ala	Glu	Thr	Ser	Asp	Tyr	Glu	95	100	105	
His	Gln	Tyr	Tyr	Ala	Lys	Val	Lys	Ala	Ile	Trp	Gly	Thr	Lys	Cys	110	115	120	
Ser	Lys	Trp	Ala	Glu	Ser	Gly	Arg	Phe	Tyr	Pro	Phe	Leu	Glu	Thr	125	130	135	
Gln	Ile	Gly	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Leu	Thr	Thr	Asp	Glu	Lys	Ser	140	145	150	
Ile	Ser	Val	Val	Leu	Thr	Ala	Pro	Glu	Lys	Trp	Lys	Arg	Asn	Pro	155	160	165	
Glu	Asp	Leu	Pro	Val	Ser	Met	Gln	Gln	Ile	Tyr	Ser	Asn	Leu	Lys	170	175	180	
Tyr	Asn	Val	Ser	Val	Leu	Asn	Thr	Lys	Ser	Asn	Arg	Thr	Trp	Ser	185	190	195	
Gln	Cys	Val	Thr	Asn	His	Thr	Leu	Val	Leu	Thr	Trp	Leu	Glu	Pro	200	205	210	
Asn	Thr	Leu	Tyr	Cys	Val	His	Val	Glu	Ser	Phe	Val	Pro	Gly	Pro	215	220	225	
Pro	Arg	Arg	Ala	Gln	Pro	Ser	Glu	Lys	Gln	Cys	Ala	Arg	Thr	Leu	230	235	240	
Lys	Asp	Gln	Ser	Ser	Glu	Phe	Lys	Ala	Lys	Ile	Ile	Phe	Trp	Tyr	245	250	255	
Val	Leu	Pro	Ile	Ser	Ile	Thr	Val	Phe	Leu	Phe	Ser	Val	Met	Gly	260	265	270	
Tyr	Ser	Ile	Tyr	Arg	Tyr	Ile	His	Val	Gly	Lys	Glu	Lys	His	Pro				

275										280					285				
Ala	Asn	Leu	Ile	Leu	Ile	Tyr	Gly	Asn	Glu	Phe	Asp	Lys	Arg	Phe					
				290					295					300					
Phe	Val	Pro	Ala	Glu	Lys	Ile	Val	Ile	Asn	Phe	Ile	Thr	Leu	Asn					
				305					310					315					
Ile	Ser	Asp	Asp	Ser	Lys	Ile	Ser	His	Gln	Asp	Met	Ser	Leu	Leu					
				320					325					330					
Gly	Lys	Ser	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Leu	Asn	Asp	Pro	Gln	Pro	Ser					
				335					340					345					
Gly	Asn	Leu	Arg	Pro	Pro	Gln	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Lys	His	Leu					
				350					355					360					
Gly	Tyr	Ala	Ser	His	Leu	Met	Glu	Ile	Phe	Cys	Asp	Ser	Glu	Glu					
				365					370					375					
Asn	Thr	Glu	Gly	Thr	Ser	Phe	Thr	Gln	Gln	Glu	Ser	Leu	Ser	Arg					
				380					385					390					
Thr	Ile	Pro	Pro	Asp	Lys	Thr	Val	Ile	Glu	Tyr	Glu	Tyr	Asp	Val					
				395					400					405					
Arg	Thr	Thr	Asp	Ile	Cys	Ala	Gly	Pro	Glu	Glu	Gln	Glu	Leu	Ser					
				410					415					420					
Leu	Gln	Glu	Glu	Val	Ser	Thr	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Glu	Ser	Gln					
				425					430					435					
Ala	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Gly	Pro	Gln	Thr	Leu	Gln	Tyr	Ser	Tyr					
				440					445					450					
Thr	Pro	Gln	Leu	Gln	Asp	Leu	Asp	Pro	Leu	Ala	Gln	Glu	His	Thr					
				455					460					465					
Asp	Ser	Glu	Glu	Gly	Pro	Glu	Glu	Glu	Pro	Ser	Thr	Thr	Leu	Val					
				470					475					480					
Asp	Trp	Asp	Pro	Gln	Thr	Gly	Arg	Leu	Cys	Ile	Pro	Ser	Leu	Ser					
				485					490					495					
Ser	Phe	Asp	Gln	Asp	Ser	Glu	Gly	Cys	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Asp					
				500					505					510					
Gly	Leu	Gly	Glu	Glu	Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Leu	Tyr	Glu	Glu	Pro					
				515					520					525					
Ala	Pro	Asp	Arg	Pro	Pro	Gly	Glu	Asn	Glu	Thr	Tyr	Leu	Met	Gln					
				530					535					540					
Phe	Met	Glu	Glu	Trp	Gly	Leu	Tyr	Val	Gln	Met	Glu	Asn							
				545					550										

<210> 21
<211> 911

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 21

5

Met	Ala	Gln	Leu	Phe	Leu	Pro	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Val	Leu	Ala	1	5	10	15
Gln	Ala	Pro	Ala	Ala	Leu	Ala	Asp	Val	Leu	Glu	Gly	Asp	Ser	Ser	20	25	30	
Glu	Asp	Arg	Ala	Phe	Arg	Val	Arg	Ile	Ala	Gly	Asp	Ala	Pro	Leu	35	40	45	
Gln	Gly	Val	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	Thr	Ile	Pro	Cys	His	Val	His	50	55	60	
Tyr	Leu	Arg	Pro	Pro	Pro	Ser	Arg	Arg	Ala	Val	Leu	Gly	Ser	Pro	65	70	75	
Arg	Val	Lys	Trp	Thr	Phe	Leu	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Ala	Glu	Val	80	85	90	
Leu	Val	Ala	Arg	Gly	Val	Arg	Val	Lys	Val	Asn	Glu	Ala	Tyr	Arg	95	100	105	
Phe	Arg	Val	Ala	Leu	Pro	Ala	Tyr	Pro	Ala	Ser	Leu	Thr	Asp	Val	110	115	120	
Ser	Leu	Ala	Leu	Ser	Glu	Leu	Arg	Pro	Asn	Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr	125	130	135	
Arg	Cys	Glu	Val	Gln	His	Gly	Ile	Asp	Asp	Ser	Ser	Asp	Ala	Val	140	145	150	
Glu	Val	Lys	Val	Lys	Gly	Val	Val	Phe	Leu	Tyr	Arg	Glu	Gly	Ser	155	160	165	
Ala	Arg	Tyr	Ala	Phe	Ser	Phe	Ser	Gly	Ala	Gln	Glu	Ala	Cys	Ala	170	175	180	
Arg	Ile	Gly	Ala	His	Ile	Ala	Thr	Pro	Glu	Gln	Leu	Tyr	Ala	Ala	185	190	195	
Tyr	Leu	Gly	Gly	Tyr	Glu	Gln	Cys	Asp	Ala	Gly	Trp	Leu	Ser	Asp	200	205	210	
Gln	Thr	Val	Arg	Tyr	Pro	Ile	Gln	Thr	Pro	Arg	Glu	Ala	Cys	Tyr	215	220	225	
Gly	Asp	Met	Asp	Gly	Phe	Pro	Gly	Val	Arg	Asn	Tyr	Gly	Val	Val	230	235	240	
Asp	Pro	Asp	Asp	Leu	Tyr	Asp	Val	Tyr	Cys	Tyr	Ala	Glu	Asp	Leu	245	250	255	
Asn	Gly	Glu	Leu	Phe	Leu	Gly	Asp	Pro	Pro	Glu	Lys	Leu	Thr	Leu	260	265	270	
Glu	Glu	Ala	Arg	Ala	Tyr	Cys	Gln	Glu	Arg	Gly	Ala	Glu	Ile	Ala	275	280	285	
Thr	Thr	Gly	Gln	Leu	Tyr	Ala	Ala	Trp	Asp	Gly	Gly	Leu	Asp	His	290	295	300	

Cys	Ser	Pro	Gly	Trp	Leu	Ala	Asp	Gly	Ser	Val	Arg	Tyr	Pro	Ile	305	310	315
Val	Thr	Pro	Ser	Gln	Arg	Cys	Gly	Gly	Gly	Leu	Pro	Gly	Val	Lys	320	325	330
Thr	Leu	Phe	Leu	Phe	Pro	Asn	Gln	Thr	Gly	Phe	Pro	Asn	Lys	His	335	340	345
Ser	Arg	Phe	Asn	Val	Tyr	Cys	Phe	Arg	Asp	Ser	Ala	Gln	Pro	Ser	350	355	360
Ala	Ile	Pro	Glu	Ala	Ser	Asn	Pro	Ala	Ser	Asn	Pro	Ala	Ser	Asp	365	370	375
Gly	Leu	Glu	Ala	Ile	Val	Thr	Val	Thr	Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Leu	380	385	390
Gln	Leu	Pro	Gln	Glu	Ala	Thr	Glu	Ser	Glu	Ser	Arg	Gly	Ala	Ile	395	400	405
Tyr	Ser	Ile	Pro	Ile	Met	Glu	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Thr	410	415	420
Pro	Glu	Asp	Pro	Ala	Glu	Ala	Pro	Arg	Thr	Leu	Leu	Glu	Phe	Glu	425	430	435
Thr	Gln	Ser	Met	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	Phe	Ser	Glu	Glu	Glu	Gly	440	445	450
Lys	Ala	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	Lys	Tyr	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Lys	455	460	465
Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Glu	Asp	Glu	Ala	Leu	Trp	470	475	480
Ala	Trp	Pro	Ser	Glu	Leu	Ser	Ser	Pro	Gly	Pro	Glu	Ala	Ser	Leu	485	490	495
Pro	Thr	Glu	Pro	Ala	Ala	Gln	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	Gln	Ala	Pro	500	505	510
Ala	Arg	Ala	Val	Leu	Gln	Pro	Gly	Ala	Ser	Pro	Leu	Pro	Asp	Gly	515	520	525
Glu	Ser	Glu	Ala	Ser	Arg	Pro	Pro	Arg	Val	His	Gly	Pro	Pro	Thr	530	535	540
Glu	Thr	Leu	Pro	Thr	Pro	Arg	Glu	Arg	Asn	Leu	Ala	Ser	Pro	Ser	545	550	555
Pro	Ser	Thr	Leu	Val	Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Gly	Glu	Ala	Thr	Gly	560	565	570
Gly	Pro	Glu	Leu	Ser	Gly	Val	Pro	Arg	Gly	Glu	Ser	Glu	Glu	Thr	575	580	585
Gly	Ser	Ser	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Leu	Leu	Pro	Ala	Thr	Arg	Ala	590	595	600
Pro	Glu	Gly	Thr	Arg	Glu	Leu	Glu	Ala	Pro	Ser	Glu	Asp	Asn	Ser			

605					610					615				
Gly	Arg	Thr	Ala	Pro	Ala	Gly	Thr	Ser	Val	Gln	Ala	Gln	Pro	Val
				620					625					630
Leu	Pro	Thr	Asp	Ser	Ala	Ser	Arg	Gly	Gly	Val	Ala	Val	Val	Pro
				635					640					645
Ala	Ser	Gly	Asp	Cys	Val	Pro	Ser	Pro	Cys	His	Asn	Gly	Gly	Thr
				650					655					660
Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Val	Arg	Cys	Leu	Cys	Leu	Pro	Gly
				665					670					675
Tyr	Gly	Gly	Asp	Leu	Cys	Asp	Val	Gly	Leu	Arg	Phe	Cys	Asn	Pro
				680					685					690
Gly	Trp	Asp	Ala	Phe	Gln	Gly	Ala	Cys	Tyr	Lys	His	Phe	Ser	Thr
				695					700					705
Arg	Arg	Ser	Trp	Glu	Glu	Ala	Glu	Thr	Gln	Cys	Arg	Met	Tyr	Gly
				710					715					720
Ala	His	Leu	Ala	Ser	Ile	Ser	Thr	Pro	Glu	Glu	Gln	Asp	Phe	Ile
				725					730					735
Asn	Asn	Arg	Tyr	Arg	Glu	Tyr	Gln	Trp	Ile	Gly	Leu	Asn	Asp	Arg
				740					745					750
Thr	Ile	Glu	Gly	Asp	Phe	Leu	Trp	Ser	Asp	Gly	Val	Pro	Leu	Leu
				755					760					765
Tyr	Glu	Asn	Trp	Asn	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp	Ser	Tyr	Phe	Leu	Ser
				770					775					780
Gly	Glu	Asn	Cys	Val	Val	Met	Val	Trp	His	Asp	Gln	Gly	Gln	Trp
				785					790					795
Ser	Asp	Val	Pro	Cys	Asn	Tyr	His	Leu	Ser	Tyr	Thr	Cys	Lys	Met
				800					805					810
Gly	Leu	Val	Ser	Cys	Gly	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	Gln
				815					820					825
Val	Phe	Gly	Arg	Pro	Arg	Leu	Arg	Tyr	Glu	Val	Asp	Thr	Val	Leu
				830					835					840
Arg	Tyr	Arg	Cys	Arg	Glu	Gly	Leu	Ala	Gln	Arg	Asn	Leu	Pro	Leu
				845					850					855
Ile	Arg	Cys	Gln	Glu	Asn	Gly	Arg	Trp	Glu	Ala	Pro	Gln	Ile	Ser
				860					865					870
Cys	Val	Pro	Arg	Arg	Pro	Ala	Arg	Ala	Leu	His	Pro	Glu	Glu	Asp
				875					880					885
Pro	Glu	Gly	Arg	Gln	Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Arg	Trp	Lys	Ala	Leu
				890					895					900
Leu	Ile	Pro	Pro	Ser	Ser	Pro	Met	Pro	Gly	Pro				
				905					910					

<210> 22
 <211> 987
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapien

<400> 22

Met	Ala	Leu	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	1	5	10	15
Leu	Ala	Ala	Val	Glu	Glu	Thr	Leu	Met	Asp	Ser	Thr	Thr	Ala	Thr	20	25	30	
Ala	Glu	Leu	Gly	Trp	Met	Val	His	Pro	Pro	Ser	Gly	Trp	Glu	Glu	35	40	45	
Val	Ser	Gly	Tyr	Asp	Glu	Asn	Met	Asn	Thr	Ile	Arg	Thr	Tyr	Gln	50	55	60	
Val	Cys	Asn	Val	Phe	Glu	Ser	Ser	Gln	Asn	Asn	Trp	Leu	Arg	Thr	65	70	75	
Lys	Phe	Ile	Arg	Arg	Arg	Gly	Ala	His	Arg	Ile	His	Val	Glu	Met	80	85	90	
Lys	Phe	Ser	Val	Arg	Asp	Cys	Ser	Ser	Ile	Pro	Ser	Val	Pro	Gly	95	100	105	
Ser	Cys	Lys	Glu	Thr	Phe	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Glu	Ala	Asp	Phe	110	115	120	
Asp	Ser	Ala	Thr	Lys	Thr	Phe	Pro	Asn	Trp	Met	Glu	Asn	Pro	Trp	125	130	135	
Val	Lys	Val	Asp	Thr	Ile	Ala	Ala	Asp	Glu	Ser	Phe	Ser	Gln	Val	140	145	150	
Asp	Leu	Gly	Gly	Arg	Val	Met	Lys	Ile	Asn	Thr	Glu	Val	Arg	Ser	155	160	165	
Phe	Gly	Pro	Val	Ser	Arg	Ser	Gly	Phe	Tyr	Leu	Ala	Phe	Gln	Asp	170	175	180	
Tyr	Gly	Gly	Cys	Met	Ser	Leu	Ile	Ala	Val	Arg	Val	Phe	Tyr	Arg	185	190	195	
Lys	Cys	Pro	Arg	Ile	Ile	Gln	Asn	Gly	Ala	Ile	Phe	Gln	Glu	Thr	200	205	210	
Leu	Ser	Gly	Ala	Glu	Ser	Thr	Ser	Leu	Val	Ala	Ala	Arg	Gly	Ser	215	220	225	
Cys	Ile	Ala	Asn	Ala	Glu	Glu	Val	Asp	Val	Pro	Ile	Lys	Leu	Tyr	230	235	240	
Cys	Asn	Gly	Asp	Gly	Glu	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Arg	Cys	Met	245	250	255	
Cys	Lys	Ala	Gly	Phe	Glu	Ala	Val	Glu	Asn	Gly	Thr	Val	Cys	Arg	260	265	270	

Gly Cys Pro Ser	Gly Thr Phe Lys Ala	Asn Gln Gly Asp Glu Ala	275	280	285
Cys Thr His Cys	Pro Ile Asn Ser Arg Thr	Thr Ser Glu Gly Ala	290	295	300
Thr Asn Cys Val	Cys Arg Asn Gly Tyr Tyr	Arg Ala Asp Leu Asp	305	310	315
Pro Leu Asp Met	Pro Cys Thr Thr Ile	Pro Ser Ala Pro Gln Ala	320	325	330
Val Ile Ser Ser	Val Asn Glu Thr Ser	Leu Met Leu Glu Trp Thr	335	340	345
Pro Pro Arg Asp	Ser Gly Gly Arg Glu Asp	Leu Val Tyr Asn Ile	350	355	360
Ile Cys Lys Ser	Cys Gly Ser Gly Arg Gly	Ala Cys Thr Arg Cys	365	370	375
Gly Asp Asn Val	Gln Tyr Ala Pro Arg Gln	Leu Gly Leu Thr Glu	380	385	390
Pro Arg Ile Tyr	Ile Ser Asp Leu Leu Ala	His Thr Gln Tyr Thr	395	400	405
Phe Glu Ile Gln	Ala Val Asn Gly Val Thr	Asp Gln Ser Pro Phe	410	415	420
Ser Pro Gln Phe	Ala Ser Val Asn Ile Thr	Thr Asn Gln Ala Ala	425	430	435
Pro Ser Ala Val	Ser Ile Met His Gln Val	Ser Arg Thr Val Asp	440	445	450
Ser Ile Thr Leu	Ser Trp Ser Gln Pro Asp	Gln Pro Asn Gly Val	455	460	465
Ile Leu Asp Tyr	Glu Leu Gln Tyr Tyr Glu	Lys Glu Leu Ser Glu	470	475	480
Tyr Asn Ala Thr	Ala Ile Lys Ser Pro Thr	Asn Thr Val Thr Val	485	490	495
Gln Gly Leu Lys	Ala Gly Ala Ile Tyr Val	Phe Gln Val Arg Ala	500	505	510
Arg Thr Val Ala	Gly Tyr Gly Arg Tyr Ser	Gly Lys Met Tyr Phe	515	520	525
Gln Thr Met Thr	Glu Ala Glu Tyr Gln Thr	Ser Ile Gln Glu Lys	530	535	540
Leu Pro Leu Ile	Ile Gly Ser Ser Ala Ala	Gly Leu Val Phe Leu	545	550	555
Ile Ala Val Val	Val Ile Ala Ile Val Cys	Asn Arg Arg Arg Gly	560	565	570
Phe Glu Arg Ala	Asp Ser Glu Tyr Thr Asp	Lys Leu Gln His Tyr			

					575						580					585
Thr	Ser	Gly	His	Met	Thr	Pro	Gly	Met	Lys	Ile	Tyr	Ile	Asp	Pro		
				590					595					600		
Phe	Thr	Tyr	Glu	Asp	Pro	Asn	Glu	Ala	Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Lys		
				605					610					615		
Glu	Ile	Asp	Ile	Ser	Cys	Val	Lys	Ile	Glu	Gln	Val	Ile	Gly	Ala		
				620					625					630		
Gly	Glu	Phe	Gly	Glu	Val	Cys	Ser	Gly	His	Leu	Lys	Leu	Pro	Gly		
				635					640					645		
Lys	Arg	Glu	Ile	Phe	Val	Ala	Ile	Lys	Thr	Leu	Lys	Ser	Gly	Tyr		
				650					655					660		
Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	Arg	Asp	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Ser	Ile	Met		
				665					670					675		
Gly	Gln	Phe	Asp	His	Pro	Asn	Val	Ile	His	Leu	Glu	Gly	Val	Val		
				680					685					690		
Thr	Lys	Ser	Thr	Pro	Val	Met	Ile	Ile	Thr	Glu	Phe	Met	Glu	Asn		
				695					700					705		
Gly	Ser	Leu	Asp	Ser	Phe	Leu	Arg	Gln	Asn	Asp	Gly	Gln	Phe	Thr		
				710					715					720		
Val	Ile	Gln	Leu	Val	Gly	Met	Leu	Arg	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly	Met		
				725					730					735		
Lys	Tyr	Leu	Ala	Asp	Met	Asn	Tyr	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala		
				740					745					750		
Arg	Asn	Ile	Leu	Val	Asn	Ser	Asn	Leu	Val	Cys	Lys	Val	Ser	Asp		
				755					760					765		
Phe	Gly	Leu	Ser	Arg	Phe	Leu	Glu	Asp	Asp	Thr	Ser	Asp	Pro	Thr		
				770					775					780		
Tyr	Thr	Ser	Ala	Leu	Gly	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Arg	Trp	Thr	Ala		
				785					790					795		
Pro	Glu	Ala	Ile	Gln	Tyr	Arg	Lys	Phe	Thr	Ser	Ala	Ser	Asp	Val		
				800					805					810		
Trp	Ser	Tyr	Gly	Ile	Val	Met	Trp	Glu	Val	Met	Ser	Tyr	Gly	Glu		
				815					820					825		
Arg	Pro	Tyr	Trp	Asp	Met	Thr	Asn	Gln	Asp	Val	Ile	Asn	Ala	Ile		
				830					835					840		
Glu	Gln	Asp	Tyr	Arg	Leu	Pro	Pro	Pro	Met	Asp	Cys	Pro	Ser	Ala		
				845					850					855		
Leu	His	Gln	Leu	Met	Leu	Asp	Cys	Trp	Gln	Lys	Asp	Arg	Asn	His		
				860					865					870		
Arg	Pro	Lys	Phe	Gly	Gln	Ile	Val	Asn	Thr	Leu	Asp	Lys	Met	Ile		
				875					880					885		

Arg	Asn	Pro	Asn	Ser	Leu	Lys	Ala	Met	Ala	Pro	Leu	Ser	Ser	Gly
				890					895					900
Ile	Asn	Leu	Pro	Leu	Leu	Asp	Arg	Thr	Ile	Pro	Asp	Tyr	Thr	Ser
				905					910					915
Phe	Asn	Thr	Val	Asp	Glu	Trp	Leu	Glu	Ala	Ile	Lys	Met	Gly	Gln
				920					925					930
Tyr	Lys	Glu	Ser	Phe	Ala	Asn	Ala	Gly	Phe	Thr	Ser	Phe	Asp	Val
				935					940					945
Val	Ser	Gln	Met	Met	Met	Glu	Asp	Ile	Leu	Arg	Val	Gly	Val	Thr
				950					955					960
Leu	Ala	Gly	His	Gln	Lys	Lys	Ile	Leu	Asn	Ser	Ile	Gln	Val	Met
				965					970					975
Arg	Ala	Gln	Met	Asn	Gln	Ile	Gln	Ser	Val	Glu	Val			
				980					985					

<210> 23
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> Homo sapien
 <400> 23

5

Met	Ala	Ser	Leu	Gly	Gln	Ile	Leu	Phe	Trp	Ser	Ile	Ile	Ser	Ile	1	5	10	15
Ile	Ile	Ile	Leu	Ala	Gly	Ala	Ile	Ala	Leu	Ile	Ile	Gly	Phe	Gly	20	25	30	
Ile	Ser	Gly	Arg	His	Ser	Ile	Thr	Val	Thr	Thr	Val	Ala	Ser	Ala	35	40	45	
Gly	Asn	Ile	Gly	Glu	Asp	Gly	Ile	Leu	Ser	Cys	Thr	Phe	Glu	Pro	50	55	60	
Asp	Ile	Lys	Leu	Ser	Asp	Ile	Val	Ile	Gln	Trp	Leu	Lys	Glu	Gly	65	70	75	
Val	Leu	Gly	Leu	Val	His	Glu	Phe	Lys	Glu	Gly	Lys	Asp	Glu	Leu	80	85	90	
Ser	Glu	Gln	Asp	Glu	Met	Phe	Arg	Gly	Arg	Thr	Ala	Val	Phe	Ala	95	100	105	
Asp	Gln	Val	Ile	Val	Gly	Asn	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Lys	Asn	Val	110	115	120	
Gln	Leu	Thr	Asp	Ala	Gly	Thr	Tyr	Lys	Cys	Tyr	Ile	Ile	Thr	Ser	125	130	135	
Lys	Gly	Lys	Lys	Asn	Ala	Asn	Leu	Glu	Tyr	Lys	Thr	Gly	Ala	Phe	140	145	150	
Ser	Met	Pro	Glu	Val	Asn	Val	Asp	Tyr	Asn	Ala	Ser	Ser	Glu	Thr	155	160	165	
Leu	Arg	Cys	Glu	Ala	Pro	Arg	Trp	Phe	Pro	Gln	Pro	Thr	Val	Val	170	175	180	
Trp	Ala	Ser	Gln	Val	Asp	Gln	Gly	Ala	Asn	Phe	Ser	Glu	Val	Ser	185	190	195	
Asn	Thr	Ser	Phe	Glu	Leu	Asn	Ser	Glu	Asn	Val	Thr	Met	Lys	Val	200	205	210	
Val	Ser	Val	Leu	Tyr	Asn	Val	Thr	Ile	Asn	Asn	Thr	Tyr	Ser	Cys	215	220	225	
Met	Ile	Glu	Asn	Asp	Ile	Ala	Lys	Ala	Thr	Gly	Asp	Ile	Lys	Val	230	235	240	
Thr	Glu	Ser	Glu	Ile	Lys	Arg	Arg	Ser	His	Leu	Gln	Leu	Leu	Asn	245	250	255	
Ser	Lys	Ala	Ser	Leu	Cys	Val	Ser	Ser	Phe	Phe	Ala	Ile	Ser	Trp	260	265	270	
Ala	Leu	Leu	Pro	Leu	Ser	Pro	Tyr	Leu	Met	Leu	Lys	275	280					

<210> 24
 <211> 123
 <212> PRT

ES 2 456 325 T3

<213> Homo sapien

<400> 24

```

Met Lys Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Met Ala Gly Leu Ala Leu
 1          5          10          15
Gln Pro Gly Thr Ala Leu Leu Cys Tyr Ser Cys Lys Ala Gln Val
          20          25          30
Ser Asn Glu Asp Cys Leu Gln Val Glu Asn Cys Thr Gln Leu Gly
          35          40          45
Glu Gln Cys Trp Thr Ala Arg Ile Arg Ala Val Gly Leu Leu Thr
          50          55          60
Val Ile Ser Lys Gly Cys Ser Leu Asn Cys Val Asp Asp Ser Gln
          65          70          75
Asp Tyr Tyr Val Gly Lys Lys Asn Ile Thr Cys Cys Asp Thr Asp
          80          85          90
Leu Cys Asn Ala Ser Gly Ala His Ala Leu Gln Pro Ala Ala Ala
          95          100          105
Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala Leu Gly Leu Leu Leu Trp Gly Pro
          110          115          120

```

5

Gly Gln Leu

<210> 25

<211> 236

<212> PRT

10

<213> Homo sapien

<400> 25

Met	Pro	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Met	1	5	10	15
Leu	Pro	Ala	Gln	Glu	Ala	Ala	Lys	Leu	Tyr	His	Thr	Asn	Tyr	Val		20	25	30	
Arg	Asn	Ser	Arg	Ala	Ile	Gly	Val	Leu	Trp	Ala	Ile	Phe	Thr	Ile		35	40	45	
Cys	Phe	Ala	Ile	Val	Asn	Val	Val	Cys	Phe	Ile	Gln	Pro	Tyr	Trp		50	55	60	
Ile	Gly	Asp	Gly	Val	Asp	Thr	Pro	Gln	Ala	Gly	Tyr	Phe	Gly	Leu		65	70	75	
Phe	His	Tyr	Cys	Ile	Gly	Asn	Gly	Phe	Ser	Arg	Glu	Leu	Thr	Cys		80	85	90	
Arg	Gly	Ser	Phe	Thr	Asp	Phe	Ser	Thr	Leu	Pro	Ser	Gly	Ala	Phe		95	100	105	
Lys	Ala	Ala	Ser	Phe	Phe	Ile	Gly	Leu	Ser	Met	Met	Leu	Ile	Ile		110	115	120	
Ala	Cys	Ile	Ile	Cys	Phe	Thr	Leu	Phe	Phe	Phe	Cys	Asn	Thr	Ala		125	130	135	
Thr	Val	Tyr	Lys	Ile	Cys	Ala	Trp	Met	Gln	Leu	Thr	Ser	Ala	Ala		140	145	150	
Cys	Leu	Val	Leu	Gly	Cys	Met	Ile	Phe	Pro	Asp	Gly	Trp	Asp	Ser		155	160	165	
Asp	Glu	Val	Lys	Arg	Met	Cys	Gly	Glu	Lys	Thr	Asp	Lys	Tyr	Thr		170	175	180	
Leu	Gly	Ala	Cys	Ser	Val	Arg	Trp	Ala	Tyr	Ile	Leu	Ala	Ile	Ile		185	190	195	
Gly	Ile	Leu	Asp	Ala	Leu	Ile	Leu	Ser	Phe	Leu	Ala	Phe	Val	Leu		200	205	210	
Gly	Asn	Arg	Gln	Asp	Ser	Leu	Met	Ala	Glu	Glu	Leu	Lys	Ala	Glu		215	220	225	
Asn	Lys	Val	Leu	Leu	Ser	Gln	Tyr	Ser	Leu	Glu						230	235		

<210> 26
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> Homo sapien
 <400> 26

ES 2 456 325 T3

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

<210> 27
 <211> 847
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

 <400> 27

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

Ile	His	Pro	Val	His	Leu	Asn	Asp	Ser	Gly	Gln	Leu	Gly	Leu	Arg	
				110					115					120	
Met	Glu	Ser	Lys	Thr	Glu	Lys	Trp	Met	Glu	Arg	Ile	His	Leu	Asn	
				125					130					135	
Val	Ser	Glu	Arg	Pro	Phe	Pro	Pro	His	Ile	Gln	Leu	Pro	Pro	Glu	
				140					145					150	
Ile	Gln	Glu	Ser	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Leu	Leu	Asn	Phe	
				155					160					165	
Ser	Cys	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Ile	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Leu	Glu	Gly	
				170					175					180	
Val	Pro	Met	Arg	Gln	Ala	Ala	Val	Thr	Ser	Thr	Ser	Leu	Thr	Ile	
				185					190					195	
Lys	Ser	Val	Phe	Thr	Arg	Ser	Glu	Leu	Lys	Phe	Ser	Pro	Gln	Trp	
				200					205					210	
Ser	His	His	Gly	Lys	Ile	Val	Thr	Cys	Gln	Leu	Gln	Asp	Ala	Asp	
				215					220					225	
Gly	Lys	Phe	Leu	Ser	Asn	Asp	Thr	Val	Gln	Leu	Asn	Val	Lys	His	
				230					235					240	
Thr	Pro	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Val	Thr	Pro	Ser	Asp	Ala	Ile	Val	
				245					250					255	
Arg	Glu	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Glu	Val	Ser	Ser	Ser	
				260					265					270	
Asn	Pro	Glu	Tyr	Thr	Thr	Val	Ser	Trp	Leu	Lys	Asp	Gly	Thr	Ser	
				275					280					285	
Leu	Lys	Lys	Gln	Asn	Thr	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Arg	Glu	Val	Thr	
				290					295					300	
Lys	Asp	Gln	Ser	Gly	Lys	Tyr	Cys	Cys	Gln	Val	Ser	Asn	Asp	Val	
				305					310					315	
Gly	Pro	Gly	Arg	Ser	Glu	Glu	Val	Phe	Leu	Gln	Val	Gln	Tyr	Ala	
				320					325					330	
Pro	Glu	Pro	Ser	Thr	Val	Gln	Ile	Leu	His	Ser	Pro	Ala	Val	Glu	
				335					340					345	
Gly	Ser	Gln	Val	Glu	Phe	Leu	Cys	Met	Ser	Leu	Ala	Asn	Pro	Leu	
				350					355					360	
Pro	Thr	Asn	Tyr	Thr	Trp	Tyr	His	Asn	Gly	Lys	Glu	Met	Gln	Gly	
				365					370					375	
Arg	Thr	Glu	Glu	Lys	Val	His	Ile	Pro	Lys	Ile	Leu	Pro	Trp	His	
				380					385					390	
Ala	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Val	Ala	Glu	Asn	Ile	Leu	Gly	Thr	Gly	
				395					400					405	
Gln	Arg	Gly	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Asp	Val	Gln	Tyr	Pro	Pro	Lys	

				410						415					420
Lys	Val	Thr	Thr	Val	Ile	Gln	Asn	Pro	Met	Pro	Ile	Arg	Glu	Gly	
				425					430					435	
Asp	Thr	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ser	Asn	Pro	Ser	
				440					445					450	
Val	Thr	Arg	Tyr	Glu	Trp	Lys	Pro	His	Gly	Ala	Trp	Glu	Glu	Pro	
				455					460					465	
Ser	Leu	Gly	Val	Leu	Lys	Ile	Gln	Asn	Val	Gly	Trp	Asp	Asn	Thr	
				470					475					480	
Thr	Ile	Ala	Cys	Ala	Arg	Cys	Asn	Ser	Trp	Cys	Ser	Trp	Ala	Ser	
				485					490					495	
Pro	Val	Ala	Leu	Asn	Val	Gln	Tyr	Ala	Pro	Arg	Asp	Val	Arg	Val	
				500					505					510	
Arg	Lys	Ile	Lys	Pro	Leu	Ser	Glu	Ile	His	Ser	Gly	Asn	Ser	Val	
				515					520					525	
Ser	Leu	Gln	Cys	Asp	Phe	Ser	Ser	Ser	His	Pro	Lys	Glu	Val	Gln	
				530					535					540	
Phe	Phe	Trp	Glu	Lys	Asn	Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Lys	Glu	Ser	Gln	
				545					550					555	
Leu	Asn	Phe	Asp	Ser	Ile	Ser	Pro	Glu	Asp	Ala	Gly	Ser	Tyr	Ser	
				560					565					570	
Cys	Trp	Val	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Gln	Thr	Ala	Ser	Lys	Ala	Trp	
				575					580					585	
Thr	Leu	Glu	Val	Leu	Tyr	Ala	Pro	Arg	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Met	
				590					595					600	
Ser	Pro	Gly	Asp	Gln	Val	Met	Glu	Gly	Lys	Ser	Ala	Thr	Leu	Thr	
				605					610					615	
Cys	Glu	Ser	Asp	Ala	Asn	Pro	Pro	Val	Ser	His	Tyr	Thr	Trp	Phe	
				620					625					630	
Asp	Trp	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	His	His	Ser	Gln	Lys	Leu	Arg	
				635					640					645	
Leu	Glu	Pro	Val	Lys	Val	Gln	His	Ser	Gly	Ala	Tyr	Trp	Cys	Gln	
				650					655					660	
Gly	Thr	Asn	Ser	Val	Gly	Lys	Gly	Arg	Ser	Pro	Leu	Ser	Thr	Leu	
				665					670					675	
Thr	Val	Tyr	Tyr	Ser	Pro	Glu	Thr	Ile	Gly	Arg	Arg	Val	Ala	Val	
				680					685					690	
Gly	Leu	Gly	Ser	Cys	Leu	Ala	Ile	Leu	Ile	Leu	Ala	Ile	Cys	Gly	
				695					700					705	
Leu	Lys	Leu	Gln	Arg	Arg	Trp	Lys	Arg	Thr	Gln	Ser	Gln	Gln	Gly	
				710					715					720	

Leu	Gln	Glu	Asn	Ser	Ser	Gly	Gln	Ser	Phe	Phe	Val	Arg	Asn	Lys	
				725					730					735	
Lys	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Leu	Ser	Glu	Gly	Pro	His	Ser	Leu	Gly	
				740					745					750	
Cys	Tyr	Asn	Pro	Met	Met	Glu	Asp	Gly	Ile	Ser	Tyr	Thr	Thr	Leu	
				755					760					765	
Arg	Phe	Pro	Glu	Met	Asn	Ile	Pro	Arg	Thr	Gly	Asp	Ala	Glu	Ser	
				770					775					780	
Ser	Glu	Met	Gln	Arg	Pro	Pro	Arg	Thr	Cys	Asp	Asp	Thr	Val	Thr	
				785					790					795	
Tyr	Ser	Ala	Leu	His	Lys	Arg	Gln	Val	Gly	Asp	Tyr	Glu	Asn	Val	
				800					805					810	
Ile	Pro	Asp	Phe	Pro	Glu	Asp	Glu	Gly	Ile	His	Tyr	Ser	Glu	Leu	
				815					820					825	
Ile	Gln	Phe	Gly	Val	Gly	Glu	Arg	Pro	Gln	Ala	Gln	Glu	Asn	Val	
				830					835					840	
Asp	Tyr	Val	Ile	Leu	Lys	His									
				845											

<210> 28
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 28

Met	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly	Val	Leu	Gln	Ala	Leu	Pro	Ala	Thr	Ile	1	5	10	15
Phe	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Ala	Val	Tyr	Leu	Gly	Pro	Gly	Cys	20	25	30	
Gln	Ala	Leu	Trp	Met	His	Lys	Val	Pro	Ala	Ser	Leu	Met	Val	Ser	35	40	45	
Leu	Gly	Glu	Asp	Ala	His	Phe	Gln	Cys	Pro	His	Asn	Ser	Ser	Asn	50	55	60	
Asn	Ala	Asn	Val	Thr	Trp	Trp	Arg	Val	Leu	His	Gly	Asn	Tyr	Thr	65	70	75	
Trp	Pro	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Pro	Asn	Gly	Thr	80	85	90	
Leu	Ile	Ile	Gln	Asn	Val	Asn	Lys	Ser	His	Gly	Gly	Ile	Tyr	Val	95	100	105	
Cys	Arg	Val	Gln	Glu	Gly	Asn	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Ser	Cys	Gly	110	115	120	
Thr	Tyr	Leu	Arg	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Pro	Arg	Pro	Phe	Leu	Asp	125	130	135	
Met	Gly	Glu	Gly	Thr	Lys	Asn	Arg	Ile	Ile	Thr	Ala	Glu	Gly	Ile	140	145	150	
Ile	Leu	Leu	Phe	Cys	Ala	Val	Val	Pro	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Phe	155	160	165	
Arg	Lys	Arg	Trp	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Gly	Leu	Asp	Ala	Gly	Asp	170	175	180	
Glu	Tyr	Glu	Asp	Glu	Asn	Leu	Tyr	Glu	Gly	Leu	Asn	Leu	Asp	Asp	185	190	195	
Cys	Ser	Met	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Arg	Gly	Leu	Gln	Gly	Thr	Tyr	200	205	210	
Gln	Asp	Val	Gly	Ser	Leu	Asn	Ile	Gly	Asp	Val	Gln	Leu	Glu	Lys	215	220	225	

Pro

<210> 29
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

 <400> 29

ES 2 456 325 T3

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

170										175				180	
Ala	Leu	Pro	Glu	Ile	Leu	Phe	Ala	Lys	Val	Ser	Gln	Gly	His	His	
				185					190					195	
Asn	Asn	Ser	Leu	Pro	Arg	Cys	Thr	Phe	Ser	Gln	Glu	Asn	Gln	Ala	
				200					205					210	
Glu	Thr	His	Ala	Trp	Phe	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Tyr	His	Val	Ala	
				215					220					225	
Gly	Phe	Leu	Leu	Pro	Met	Leu	Val	Met	Gly	Trp	Cys	Tyr	Val	Gly	
				230					235					240	
Val	Val	His	Arg	Leu	Arg	Gln	Ala	Gln	Arg	Arg	Pro	Gln	Arg	Gln	
				245					250					255	
Lys	Ala	Val	Arg	Val	Ala	Ile	Leu	Val	Thr	Ser	Ile	Phe	Phe	Leu	
				260					265					270	
Cys	Trp	Ser	Pro	Tyr	His	Ile	Val	Ile	Phe	Leu	Asp	Thr	Leu	Ala	
				275					280					285	
Arg	Leu	Lys	Ala	Val	Asp	Asn	Thr	Cys	Lys	Leu	Asn	Gly	Ser	Leu	
				290					295					300	
Pro	Val	Ala	Ile	Thr	Met	Cys	Glu	Phe	Leu	Gly	Leu	Ala	His	Cys	
				305					310					315	
Cys	Leu	Asn	Pro	Met	Leu	Tyr	Thr	Phe	Ala	Gly	Val	Lys	Phe	Arg	
				320					325					330	
Ser	Asp	Leu	Ser	Arg	Leu	Leu	Thr	Lys	Leu	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	
				335					340					345	
Ala	Ser	Leu	Cys	Gln	Leu	Phe	Pro	Ser	Trp	Arg	Arg	Ser	Ser	Leu	
				350					355					360	
Ser	Glu	Ser	Glu	Asn	Ala	Thr	Ser	Leu	Thr	Thr	Phe				
				365					370						

<210> 30
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 30

Met	Gly	Ser	Gly	Trp	Val	Pro	Trp	Val	Val	Ala	Leu	Leu	Val	Asn	1	5	10	15
Leu	Thr	Arg	Leu	Asp	Ser	Ser	Met	Thr	Gln	Gly	Thr	Asp	Ser	Pro	20	25	30	
Glu	Asp	Phe	Val	Ile	Gln	Ala	Lys	Ala	Asp	Cys	Tyr	Phe	Thr	Asn	35	40	45	
Gly	Thr	Glu	Lys	Val	Gln	Phe	Val	Val	Arg	Phe	Ile	Phe	Asn	Leu	50	55	60	
Glu	Glu	Tyr	Val	Arg	Phe	Asp	Ser	Asp	Val	Gly	Met	Phe	Val	Ala	65	70	75	
Leu	Thr	Lys	Leu	Gly	Gln	Pro	Asp	Ala	Glu	Gln	Trp	Asn	Ser	Arg	80	85	90	
Leu	Asp	Leu	Leu	Glu	Arg	Ser	Arg	Gln	Ala	Val	Asp	Gly	Val	Cys	95	100	105	
Arg	His	Asn	Tyr	Arg	Leu	Gly	Ala	Pro	Phe	Thr	Val	Gly	Arg	Lys	110	115	120	
Val	Gln	Pro	Glu	Val	Thr	Val	Tyr	Pro	Glu	Arg	Thr	Pro	Leu	Leu	125	130	135	
His	Gln	His	Asn	Leu	Leu	His	Cys	Ser	Val	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	140	145	150	
Gly	Asp	Ile	Lys	Ile	Lys	Trp	Phe	Leu	Asn	Gly	Gln	Glu	Glu	Arg	155	160	165	
Ala	Gly	Val	Met	Ser	Thr	Gly	Pro	Ile	Arg	Asn	Gly	Asp	Trp	Thr	170	175	180	
Phe	Gln	Thr	Val	Val	Met	Leu	Glu	Met	Thr	Pro	Glu	Leu	Gly	His	185	190	195	
Val	Tyr	Thr	Cys	Leu	Val	Asp	His	Ser	Ser	Leu	Leu	Ser	Pro	Val	200	205	210	
Ser	Val	Glu	Trp	Arg	Ala	Gln	Ser	Glu	Tyr	Ser	Trp	Arg	Lys	Met	215	220	225	
Leu	Ser	Gly	Ile	Ala	Ala	Phe	Leu	Leu	Gly	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu	230	235	240	
Val	Gly	Ile	Val	Ile	Gln	Leu	Arg	Ala	Gln	Lys	Gly	Tyr	Val	Arg	245	250	255	
Thr	Gln	Met	Ser	Gly	Asn	Glu	Val	Ser	Arg	Ala	Val	Leu	Leu	Pro	260	265	270	
Gln Ser Cys																		

<210> 31
<211> 422

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 31

5

Met	Gly	Gln	Ala	Gly	Cys	Lys	Gly	Leu	Cys	Leu	Ser	Leu	Phe	Asp
1				5					10					15
Tyr	Lys	Thr	Glu	Lys	Tyr	Val	Ile	Ala	Lys	Asn	Lys	Lys	Val	Gly
				20					25					30
Leu	Leu	Tyr	Arg	Leu	Leu	Gln	Ala	Ser	Ile	Leu	Ala	Tyr	Leu	Val
				35					40					45
Val	Trp	Val	Phe	Leu	Ile	Lys	Lys	Gly	Tyr	Gln	Asp	Val	Asp	Thr
				50					55					60

Ser	Leu	Gln	Ser	Ala	Val	Ile	Thr	Lys	Val	Lys	Gly	Val	Ala	Phe	
				65					70					75	
Thr	Asn	Thr	Ser	Asp	Leu	Gly	Gln	Arg	Ile	Trp	Asp	Val	Ala	Asp	
				80					85					90	
Tyr	Val	Ile	Pro	Ala	Gln	Gly	Glu	Asn	Val	Phe	Phe	Val	Val	Thr	
				95					100					105	
Asn	Leu	Ile	Val	Thr	Pro	Asn	Gln	Arg	Gln	Asn	Val	Cys	Ala	Glu	
				110					115					120	
Asn	Glu	Gly	Ile	Pro	Asp	Gly	Ala	Cys	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Cys	
				125					130					135	
His	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Thr	Ala	Gly	Asn	Gly	Val	Lys	Thr	Gly	
				140					145					150	
Arg	Cys	Leu	Arg	Arg	Glu	Asn	Leu	Ala	Arg	Gly	Thr	Cys	Glu	Ile	
				155					160					165	
Phe	Ala	Trp	Cys	Pro	Leu	Glu	Thr	Ser	Ser	Arg	Pro	Glu	Glu	Pro	
				170					175					180	
Phe	Leu	Lys	Glu	Ala	Glu	Asp	Phe	Thr	Ile	Phe	Ile	Lys	Asn	His	
				185					190					195	
Ile	Arg	Phe	Pro	Lys	Phe	Asn	Phe	Ser	Lys	Ser	Asn	Val	Met	Asp	
				200					205					210	
Val	Lys	Asp	Arg	Ser	Phe	Leu	Lys	Ser	Cys	His	Phe	Gly	Pro	Lys	
				215					220					225	
Asn	His	Tyr	Cys	Pro	Ile	Phe	Arg	Leu	Gly	Ser	Val	Ile	Arg	Trp	
				230					235					240	
Ala	Gly	Ser	Asp	Phe	Gln	Asp	Ile	Ala	Leu	Glu	Gly	Gly	Val	Ile	
				245					250					255	
Gly	Ile	Asn	Ile	Glu	Trp	Asn	Cys	Asp	Leu	Asp	Lys	Ala	Ala	Ser	
				260					265					270	
Glu	Cys	His	Pro	His	Tyr	Ser	Phe	Ser	Arg	Leu	Asp	Asn	Lys	Leu	
				275					280					285	
Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Ser	Gly	Tyr	Asn	Phe	Arg	Phe	Ala	Arg	Tyr	
				290					295					300	
Tyr	Arg	Asp	Ala	Ala	Gly	Val	Glu	Phe	Arg	Thr	Leu	Met	Lys	Ala	
				305					310					315	
Tyr	Gly	Ile	Arg	Phe	Asp	Val	Met	Val	Asn	Gly	Lys	Gly	Ala	Phe	
				320					325					330	
Phe	Cys	Asp	Leu	Val	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ile	Lys	Lys	Arg	Glu	Phe	
				335					340					345	
Tyr	Arg	Asp	Lys	Lys	Tyr	Glu	Glu	Val	Arg	Gly	Leu	Glu	Asp	Ser	
				350					355					360	
Ser	Gln	Glu	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Ser	Gly	Leu	Gly	Leu	Ser	Glu	

					365					370					375
Gln	Leu	Thr	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Met	Pro	Glu	Gln	Gln	
				380					385					390	
Glu	Leu	Gln	Glu	Pro	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Gly	Ser	Ser	Ser	Gln	
				395					400					405	
Lys	Gly	Asn	Gly	Ser	Val	Cys	Pro	Gln	Leu	Leu	Glu	Pro	His	Arg	
				410					415					420	
Ser	Thr														

5 <210> 32
 <211> 359
 <212> PRT
 <213> Homo sapien
 <400> 32

Met	Ala	Glu	Ala	Ile	Thr	Tyr	Ala	Asp	Leu	Arg	Phe	Val	Lys	Ala	1	5	10	15
Pro	Leu	Lys	Lys	Ser	Ile	Ser	Ser	Arg	Leu	Gly	Gln	Asp	Pro	Gly	20	25	30	
Ala	Asp	Asp	Asp	Gly	Glu	Ile	Thr	Tyr	Glu	Asn	Val	Gln	Val	Pro	35	40	45	
Ala	Val	Leu	Gly	Val	Pro	Ser	Ser	Leu	Ala	Ser	Ser	Val	Leu	Gly	50	55	60	
Asp	Lys	Ala	Ala	Val	Lys	Ser	Glu	Gln	Pro	Thr	Ala	Ser	Trp	Arg	65	70	75	
Ala	Val	Thr	Ser	Pro	Ala	Val	Gly	Arg	Ile	Leu	Pro	Cys	Arg	Thr	80	85	90	
Thr	Cys	Leu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Cys	Leu	95	100	105	
Leu	Leu	Gly	Val	Thr	Ala	Ile	Cys	Leu	Gly	Val	Arg	Tyr	Leu	Gln	110	115	120	
Val	Ser	Gln	Gln	Leu	Gln	Gln	Thr	Asn	Arg	Val	Leu	Glu	Val	Thr	125	130	135	
Asn	Ser	Ser	Leu	Arg	Gln	Gln	Leu	Arg	Leu	Lys	Ile	Thr	Gln	Leu	140	145	150	
Gly	Gln	Ser	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Gly	Ser	Arg	Arg	Glu	Leu	Ala	155	160	165	
Gln	Ser	Gln	Glu	Ala	Leu	Gln	Val	Glu	Gln	Arg	Ala	His	Gln	Ala	170	175	180	
Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Ala	Cys	Gln	Ala	Asp	Arg	Gln	Lys	Thr	185	190	195	
Lys	Glu	Thr	Leu	Gln	Ser	Glu	Glu	Gln	Gln	Arg	Arg	Ala	Leu	Glu	200	205	210	

Gln	Lys	Leu	Ser	Asn	Met	Glu	Asn	Arg	Leu	Lys	Pro	Phe	Phe	Thr
				215					220					225
Cys	Gly	Ser	Ala	Asp	Thr	Cys	Cys	Pro	Ser	Gly	Trp	Ile	Met	His
				230					235					240
Gln	Lys	Ser	Cys	Phe	Tyr	Ile	Ser	Leu	Thr	Ser	Lys	Asn	Trp	Gln
				245					250					255
Glu	Ser	Gln	Lys	Gln	Cys	Glu	Thr	Leu	Ser	Ser	Lys	Leu	Ala	Thr
				260					265					270
Phe	Ser	Glu	Ile	Tyr	Pro	Gln	Ser	His	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Leu	Asn
				275					280					285
Ser	Leu	Leu	Pro	Asn	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Ser	Tyr	Trp	Thr	Gly
				290					295					300
Leu	Ser	Ser	Asn	Lys	Asp	Trp	Lys	Leu	Thr	Asp	Asp	Thr	Gln	Arg
				305					310					315
Thr	Arg	Thr	Tyr	Ala	Gln	Ser	Ser	Lys	Cys	Asn	Lys	Val	His	Lys
				320					325					330
Thr	Trp	Ser	Trp	Trp	Thr	Leu	Glu	Ser	Glu	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser
				335					340					345
Leu	Pro	Tyr	Ile	Cys	Glu	Met	Thr	Ala	Phe	Arg	Phe	Pro	Asp	
				350					355					

<210> 33
 <211> 661
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 33

ES 2 456 325 T3

Met	Ala	Phe	Asp	Val	Ser	Cys	Phe	Phe	Trp	Val	Val	Leu	Phe	Ser	1	5	10	15
Ala	Gly	Cys	Lys	Val	Ile	Thr	Ser	Trp	Asp	Gln	Met	Cys	Ile	Glu	20	25	30	
Lys	Glu	Ala	Asn	Lys	Thr	Tyr	Asn	Cys	Glu	Asn	Leu	Gly	Leu	Ser	35	40	45	
Glu	Ile	Pro	Asp	Thr	Leu	Pro	Asn	Thr	Thr	Glu	Phe	Leu	Glu	Phe	50	55	60	
Ser	Phe	Asn	Phe	Leu	Pro	Thr	Ile	His	Asn	Arg	Thr	Phe	Ser	Arg	65	70	75	
Leu	Met	Asn	Leu	Thr	Phe	Leu	Asp	Leu	Thr	Arg	Cys	Gln	Ile	Asn	80	85	90	
Trp	Ile	His	Glu	Asp	Thr	Phe	Gln	Ser	His	His	Gln	Leu	Ser	Thr	95	100	105	
Leu	Val	Leu	Thr	Gly	Asn	Pro	Leu	Ile	Phe	Met	Ala	Glu	Thr	Ser	110	115	120	

Leu	Asn	Gly	Pro	Lys	Ser	Leu	Lys	His	Leu	Phe	Leu	Ile	Gln	Thr	125	130	135
Gly	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Phe	Ile	Pro	Val	His	Asn	Leu	Glu	Asn	140	145	150
Leu	Glu	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gly	Ser	Asn	His	Ile	Ser	Ser	Ile	Lys	155	160	165
Phe	Pro	Lys	Asp	Phe	Pro	Ala	Arg	Asn	Leu	Lys	Val	Leu	Asp	Phe	170	175	180
Gln	Asn	Asn	Ala	Ile	His	Tyr	Ile	Ser	Arg	Glu	Asp	Met	Arg	Ser	185	190	195
Leu	Glu	Gln	Ala	Ile	Asn	Leu	Ser	Leu	Asn	Phe	Asn	Gly	Asn	Asn	200	205	210
Val	Lys	Gly	Ile	Glu	Leu	Gly	Ala	Phe	Asp	Ser	Thr	Val	Phe	Gln	215	220	225
Ser	Leu	Asn	Phe	Gly	Gly	Thr	Pro	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Phe	Asn	230	235	240
Gly	Leu	Gln	Asn	Ser	Thr	Thr	Gln	Ser	Leu	Trp	Leu	Gly	Thr	Phe	245	250	255
Glu	Asp	Ile	Asp	Asp	Glu	Asp	Ile	Ser	Ser	Ala	Met	Leu	Lys	Gly	260	265	270
Leu	Cys	Glu	Met	Ser	Val	Glu	Ser	Leu	Asn	Leu	Gln	Glu	His	Arg	275	280	285
Phe	Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	Thr	Phe	Gln	Cys	Phe	Thr	Gln	Leu	290	295	300
Gln	Glu	Leu	Asp	Leu	Thr	Ala	Thr	His	Leu	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	305	310	315
Gly	Met	Lys	Gly	Leu	Asn	Leu	Leu	Lys	Lys	Leu	Val	Leu	Ser	Val	320	325	330
Asn	His	Phe	Asp	Gln	Leu	Cys	Gln	Ile	Ser	Ala	Ala	Asn	Phe	Pro	335	340	345
Ser	Leu	Thr	His	Leu	Tyr	Ile	Arg	Gly	Asn	Val	Lys	Lys	Leu	His	350	355	360
Leu	Gly	Val	Gly	Cys	Leu	Glu	Lys	Leu	Gly	Asn	Leu	Gln	Thr	Leu	365	370	375
Asp	Leu	Ser	His	Asn	Asp	Ile	Glu	Ala	Ser	Asp	Cys	Cys	Ser	Leu	380	385	390
Gln	Leu	Lys	Asn	Leu	Ser	His	Leu	Gln	Thr	Leu	Asn	Leu	Ser	His	395	400	405
Asn	Glu	Pro	Leu	Gly	Leu	Gln	Ser	Gln	Ala	Phe	Lys	Glu	Cys	Pro	410	415	420
Gln	Leu	Glu	Leu	Leu	Asp	Leu	Ala	Phe	Thr	Arg	Leu	His	Ile	Asn			

425					430					435				
Ala	Pro	Gln	Ser	Pro	Phe	Gln	Asn	Leu	His	Phe	Leu	Gln	Val	Leu
				440					445					450
Asn	Leu	Thr	Tyr	Cys	Phe	Leu	Asp	Thr	Ser	Asn	Gln	His	Leu	Leu
				455					460					465
Ala	Gly	Leu	Pro	Val	Leu	Arg	His	Leu	Asn	Leu	Lys	Gly	Asn	His
				470					475					480
Phe	Gln	Asp	Gly	Thr	Ile	Thr	Lys	Thr	Asn	Leu	Leu	Gln	Thr	Val
				485					490					495
Gly	Ser	Leu	Glu	Val	Leu	Ile	Leu	Ser	Ser	Cys	Gly	Leu	Leu	Ser
				500					505					510
Ile	Asp	Gln	Gln	Ala	Phe	His	Ser	Leu	Gly	Lys	Met	Ser	His	Val
				515					520					525
Asp	Leu	Ser	His	Asn	Ser	Leu	Thr	Cys	Asp	Ser	Ile	Asp	Ser	Leu
				530					535					540
Ser	His	Leu	Lys	Gly	Ile	Tyr	Leu	Asn	Leu	Ala	Ala	Asn	Ser	Ile
				545					550					555
Asn	Ile	Ile	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Pro	Ile	Leu	Ser	Gln	Gln	Ser
				560					565					570
Thr	Ile	Asn	Leu	Ser	His	Asn	Pro	Leu	Asp	Cys	Thr	Cys	Ser	Asn
				575					580					585
Ile	His	Phe	Leu	Thr	Trp	Tyr	Lys	Glu	Asn	Leu	His	Lys	Leu	Glu
				590					595					600
Gly	Ser	Glu	Glu	Thr	Thr	Cys	Ala	Asn	Pro	Pro	Ser	Leu	Arg	Gly
				605					610					615
Val	Lys	Leu	Ser	Asp	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Gly	Ile	Thr	Ala	Ile
				620					625					630
Gly	Ile	Phe	Phe	Leu	Ile	Val	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ile	Leu
				635					640					645
Leu	Phe	Phe	Ala	Val	Lys	Tyr	Leu	Leu	Arg	Trp	Lys	Tyr	Gln	His
				650					655					660

Ile

<210> 34
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> Sarcophaga bullata

<400> 34

ES 2 456 325 T3

Met	Leu	Pro	Arg	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile	Cys	Ala	Pro	Leu	Cys	Glu
1				5					10					15
Pro	Ala	Glu	Leu	Phe	Leu	Ile	Ala	Ser	Pro	Ser	His	Pro	Thr	Glu
				20					25					30

Gly	Ser	Pro	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Lys	Met	Pro	Phe	Leu	Gln	Ser	35	40	45
Ser	Asp	Ala	Gln	Phe	Gln	Phe	Cys	Phe	Phe	Arg	Asp	Thr	Arg	Ala	50	55	60
Leu	Gly	Pro	Gly	Trp	Ser	Ser	Ser	Pro	Lys	Leu	Gln	Ile	Ala	Ala	65	70	75
Met	Trp	Lys	Glu	Asp	Thr	Gly	Ser	Tyr	Trp	Cys	Glu	Ala	Gln	Thr	80	85	90
Met	Ala	Ser	Lys	Val	Leu	Arg	Ser	Arg	Arg	Ser	Gln	Ile	Asn	Val	95	100	105
His	Arg	Val	Pro	Val	Ala	Asp	Val	Ser	Leu	Glu	Thr	Gln	Pro	Pro	110	115	120
Gly	Gly	Gln	Val	Met	Glu	Gly	Asp	Arg	Leu	Val	Leu	Ile	Cys	Ser	125	130	135
Val	Ala	Met	Gly	Thr	Gly	Asp	Ile	Thr	Phe	Leu	Trp	Tyr	Lys	Gly	140	145	150
Ala	Val	Gly	Leu	Asn	Leu	Gln	Ser	Lys	Thr	Gln	Arg	Ser	Leu	Thr	155	160	165
Ala	Glu	Tyr	Glu	Ile	Pro	Ser	Val	Arg	Glu	Ser	Asp	Ala	Glu	Gln	170	175	180
Tyr	Tyr	Cys	Val	Ala	Glu	Asn	Gly	Tyr	Gly	Pro	Ser	Pro	Ser	Gly	185	190	195
Leu	Val	Ser	Ile	Thr	Val	Arg	Ile	Pro	Val	Ser	Arg	Pro	Ile	Leu	200	205	210
Met	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ala	Gln	Ala	Ala	Val	Glu	Asp	Val	Leu	215	220	225
Glu	Leu	His	Cys	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Pro	Pro	Ile	Leu	Tyr	230	235	240
Trp	Phe	Tyr	His	Glu	Asp	Ile	Thr	Leu	Gly	Ser	Arg	Ser	Ala	Pro	245	250	255
Ser	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser	Phe	Asn	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu	Glu	His	260	265	270
Ser	Gly	Asn	Tyr	Ser	Cys	Glu	Ala	Asn	Asn	Gly	Leu	Gly	Ala	Gln	275	280	285
Arg	Ser	Glu	Ala	Val	Thr	Leu	Asn	Phe	Thr	Val	Pro	Thr	Gly	Ala	290	295	300
Arg	Ser	Asn	His	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	Ile	Glu	Gly	Leu	Leu	Ser	305	310	315
Thr	Leu	Gly	Pro	Ala	Thr	Val	Ala	Leu	Leu	Phe	Cys	Tyr	Gly	Leu	320	325	330

Lys	Arg	Lys	Ile	Gly	Arg	Arg	Ser	Ala	Arg	Asp	Pro	Leu	Arg	Ser
				335					340					345
Leu	Pro	Ser	Pro	Leu	Pro	Gln	Glu	Phe	Thr	Tyr	Leu	Asn	Ser	Pro
				350					355					360
Thr	Pro	Gly	Gln	Leu	Gln	Pro	Ile	Tyr	Glu	Asn	Val	Asn	Val	Val
				365					370					375
Ser	Gly	Asp	Glu	Val	Tyr	Ser	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Asn	Gln	Pro	Glu
				380					385					390
Gln	Glu	Ser	Val	Ala	Ala	Glu	Thr	Leu	Gly	Thr	His	Met	Glu	Asp
				395					400					405
Lys	Val	Ser	Leu	Asp	Ile	Tyr	Ser	Arg	Leu	Arg	Lys	Ala	Asn	Ile
				410					415					420
Thr	Asp	Val	Asp	Tyr	Glu	Asp	Ala	Met						
				425										

<210> 35
 <211> 977
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 35

ES 2 456 325 T3

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

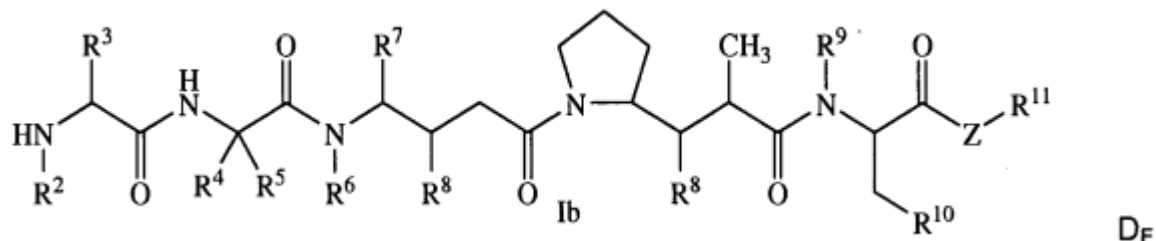
	170		175		180
Val Lys Ile Gln	Val Gln Glu Pro Phe	Thr Arg Pro Val Leu Arg			
	185	190			195
Ala Ser Ser Phe	Gln Pro Ile Ser Gly	Asn Pro Val Thr Leu Thr			
	200	205			210
Cys Glu Thr Gln	Leu Ser Leu Glu Arg	Ser Asp Val Pro Leu Arg			
	215	220			225
Phe Arg Phe Phe	Arg Asp Asp Gln Thr	Leu Gly Leu Gly Trp Ser			
	230	235			240
Leu Ser Pro Asn	Phe Gln Ile Thr Ala	Met Trp Ser Lys Asp Ser			
	245	250			255
Gly Phe Tyr Trp	Cys Lys Ala Ala Thr	Met Pro His Ser Val Ile			
	260	265			270
Ser Asp Ser Pro	Arg Ser Trp Ile Gln	Val Gln Ile Pro Ala Ser			
	275	280			285
His Pro Val Leu	Thr Leu Ser Pro Glu	Lys Ala Leu Asn Phe Glu			
	290	295			300
Gly Thr Lys Val	Thr Leu His Cys Glu	Thr Gln Glu Asp Ser Leu			
	305	310			315
Arg Thr Leu Tyr	Arg Phe Tyr His Glu	Gly Val Pro Leu Arg His			
	320	325			330
Lys Ser Val Arg	Cys Glu Arg Gly Ala	Ser Ile Ser Phe Ser Leu			
	335	340			345
Thr Thr Glu Asn	Ser Gly Asn Tyr Tyr	Cys Thr Ala Asp Asn Gly			
	350	355			360
Leu Gly Ala Lys	Pro Ser Lys Ala Val	Ser Leu Ser Val Thr Val			
	365	370			375
Pro Val Ser His	Pro Val Leu Asn Leu	Ser Ser Pro Glu Asp Leu			
	380	385			390
Ile Phe Glu Gly	Ala Lys Val Thr Leu	His Cys Glu Ala Gln Arg			
	395	400			405
Gly Ser Leu Pro	Ile Leu Tyr Gln Phe	His His Glu Asp Ala Ala			
	410	415			420
Leu Glu Arg Arg	Ser Ala Asn Ser Ala	Gly Gly Val Ala Ile Ser			
	425	430			435
Phe Ser Leu Thr	Ala Glu His Ser Gly	Asn Tyr Tyr Cys Thr Ala			
	440	445			450
Asp Asn Gly Phe	Gly Pro Gln Arg Ser	Lys Ala Val Ser Leu Ser			
	455	460			465
Ile Thr Val Pro	Val Ser His Pro Val	Leu Thr Leu Ser Ser Ala			
	470	475			480

Glu	Ala	Leu	Thr	Phe	Glu	Gly	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	His	Cys	Glu	485	490	495
Val	Gln	Arg	Gly	Ser	Pro	Gln	Ile	Leu	Tyr	Gln	Phe	Tyr	His	Glu	500	505	510
Asp	Met	Pro	Leu	Trp	Ser	Ser	Ser	Thr	Pro	Ser	Val	Gly	Arg	Val	515	520	525
Ser	Phe	Ser	Phe	Ser	Leu	Thr	Glu	Gly	His	Ser	Gly	Asn	Tyr	Tyr	530	535	540
Cys	Thr	Ala	Asp	Asn	Gly	Phe	Gly	Pro	Gln	Arg	Ser	Glu	Val	Val	545	550	555
Ser	Leu	Phe	Val	Thr	Val	Pro	Val	Ser	Arg	Pro	Ile	Leu	Thr	Leu	560	565	570
Arg	Val	Pro	Arg	Ala	Gln	Ala	Val	Val	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Leu	575	580	585
His	Cys	Glu	Ala	Pro	Arg	Gly	Ser	Pro	Pro	Ile	Leu	Tyr	Trp	Phe	590	595	600
Tyr	His	Glu	Asp	Val	Thr	Leu	Gly	Ser	Ser	Ser	Ala	Pro	Ser	Gly	605	610	615
Gly	Glu	Ala	Ser	Phe	Asn	Leu	Ser	Leu	Thr	Ala	Glu	His	Ser	Gly	620	625	630
Asn	Tyr	Ser	Cys	Glu	Ala	Asn	Asn	Gly	Leu	Val	Ala	Gln	His	Ser	635	640	645
Asp	Thr	Ile	Ser	Leu	Ser	Val	Ile	Val	Pro	Val	Ser	Arg	Pro	Ile	650	655	660
Leu	Thr	Phe	Arg	Ala	Pro	Arg	Ala	Gln	Ala	Val	Val	Gly	Asp	Leu	665	670	675
Leu	Glu	Leu	His	Cys	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Ser	Pro	Ile	Leu	680	685	690
Tyr	Trp	Phe	Tyr	His	Glu	Asp	Val	Thr	Leu	Gly	Lys	Ile	Ser	Ala	695	700	705
Pro	Ser	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser	Phe	Asn	Leu	Ser	Leu	Thr	Thr	Glu	710	715	720
His	Ser	Gly	Ile	Tyr	Ser	Cys	Glu	Ala	Asp	Asn	Gly	Pro	Glu	Ala	725	730	735
Gln	Arg	Ser	Glu	Met	Val	Thr	Leu	Lys	Val	Ala	Val	Pro	Val	Ser	740	745	750
Arg	Pro	Val	Leu	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Gly	Thr	His	Ala	Ala	Val	755	760	765
Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Leu	His	Cys	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Pro	770	775	780

Leu	Ile	Leu	Tyr	Arg	Phe	Phe	His	Glu	Asp	Val	Thr	Leu	Gly	Asn	
				785					790					795	
Arg	Ser	Ser	Pro	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Leu	Asn	Leu	Ser	Leu	Thr	
				800					805					810	
Ala	Glu	His	Ser	Gly	Asn	Tyr	Ser	Cys	Glu	Ala	Asp	Asn	Gly	Leu	
				815					820					825	
Gly	Ala	Gln	Arg	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	Gly	Leu	
				830					835					840	
Thr	Ala	Asn	Arg	Ser	Gly	Pro	Phe	Ala	Thr	Gly	Val	Ala	Gly	Gly	
				845					850					855	
Leu	Leu	Ser	Ile	Ala	Gly	Leu	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Tyr	
				860					865					870	
Cys	Trp	Leu	Ser	Arg	Lys	Ala	Gly	Arg	Lys	Pro	Ala	Ser	Asp	Pro	
				875					880					885	
Ala	Arg	Ser	Pro	Pro	Asp	Ser	Asp	Ser	Gln	Glu	Pro	Thr	Tyr	His	
				890					895					900	
Asn	Val	Pro	Ala	Trp	Glu	Glu	Leu	Gln	Pro	Val	Tyr	Thr	Asn	Ala	
				905					910					915	
Asn	Pro	Arg	Gly	Glu	Asn	Val	Val	Tyr	Ser	Glu	Val	Arg	Ile	Ile	
				920					925					930	
Gln	Glu	Lys	Lys	Lys	His	Ala	Val	Ala	Ser	Asp	Pro	Arg	His	Leu	
				935					940					945	
Arg	Asn	Lys	Gly	Ser	Pro	Ile	Ile	Tyr	Ser	Glu	Val	Lys	Val	Ala	
				950					955					960	
Ser	Thr	Pro	Val	Ser	Gly	Ser	Leu	Phe	Leu	Ala	Ser	Ser	Ala	Pro	
				965					970					975	
His	Arg														

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la siguiente fórmula:



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo en el que:

independientemente de cada posición:

R² se selecciona entre H y alquilo C₁-C₈;

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

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

R⁵ se selecciona entre H y metilo;

o:

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

R⁶ se selecciona entre H y alquilo C₁-C₈;

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

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

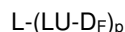
R⁹ se selecciona entre H y alquilo C₁-C₈;

R¹⁰ se selecciona entre arilo y heterociclo C₃-C₈;

Z es O; y

R¹¹ es H.

2. Un conjugado que tiene la fórmula:



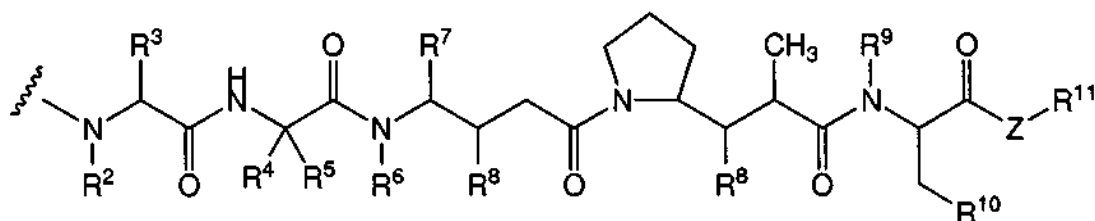
o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo en el que:

L- es una unidad de Ligando,

LU es una unidad de Conector que puede estar presente o ausente,

p varía de 1 a 20, y

D_F es un grupo con la siguiente fórmula:



en el que independientemente en cada posición:

R² se selecciona entre H y alquilo C₁-C₈;

R^3 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquil-arilo C_1-C_8 , alquil C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 y alquil C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

R^4 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquil-arilo C_1-C_8 , alquil C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 y alquil C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

R^5 se selecciona entre H y metilo; o:

R^4 y R^5 forman de manera conjunta un anillo carbocíclico y tienen la fórmula $-(CR^aR^b)_n-$, en la que R^a y R^b se seleccionan independientemente entre H, alquilo C_1-C_8 y carbociclo C_3-C_8 , y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6;

R^6 se selecciona entre H y alquilo C_1-C_8 ;

R^7 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquil-arilo C_1-C_8 , alquil C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 y alquil C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

cada R^8 se selecciona independientemente entre H, OH, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 y O-(alquilo C_1-C_8);

R^9 se selecciona entre H y alquilo C_1-C_8 ;

R^{10} se selecciona entre arilo y heterociclo C_3-C_8 ;

Z es O; y

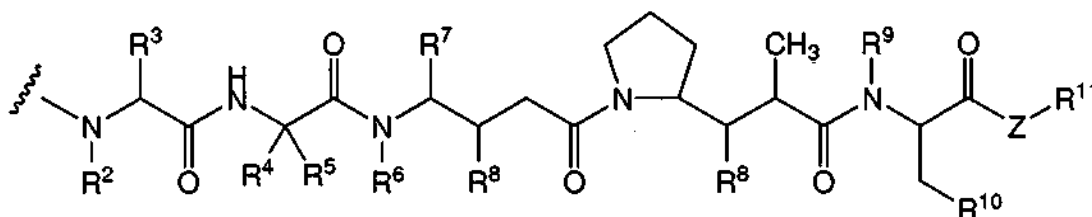
R^{11} es H.

3. Un conjugado que tiene la fórmula:

LU-D_F

o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo en el que:

LU- es una unidad de Conector que comprende un grupo funcional capaz de unirse a una unidad de ligando, y D_F es un grupo de la siguiente fórmula:



en la que:

independientemente en cada posición:

R^2 se selecciona entre H y alquilo C_1-C_8 ;

R^3 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquil-arilo C_1-C_8 , alquil C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 y alquil C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

R^4 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquil-arilo C_1-C_8 , alquil C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 y alquil C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

R^5 se selecciona entre H y metilo;

o:

R^4 y R^5 forman de manera conjunta un anillo carbocíclico y tienen la fórmula $-(CR^aR^b)_n-$, en la que R^a y R^b se seleccionan independientemente entre H, alquilo C_1-C_8 y carbociclo C_3-C_8 , y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6;

R^6 se selecciona entre H y alquilo C_1-C_8 ;

R^7 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, alquil-arilo C_1-C_8 , alquil C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 y alquil C_1-C_8 -(heterociclo C_3-C_8);

cada R^8 se selecciona independientemente entre H, OH, alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 y O-(alquilo C_1-C_8);

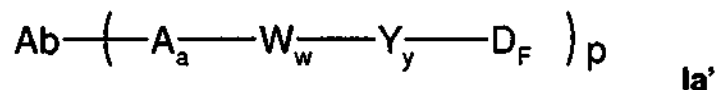
R^9 se selecciona entre H y alquilo C_1-C_8 ;

R^{10} se selecciona entre arilo y heterociclo C_3-C_8 ;

Z es O; y

R^{11} es H.

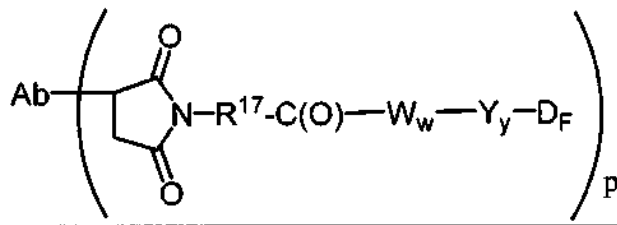
4. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el conjugado es un conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene la Fórmula la':



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo en la que:

Ab es un anticuerpo,
 -A_a-W_w-Y_y- es una unidad de Conector,
 A es una unidad Bastidor,
 a es 0 o 1,
 cada W es independientemente una unidad de Aminoácido,
 w es un número entero que varía de 0 a 12,
 Y es una unidad Espaciadora,
 y es 0, 1 o 2, y
 p varía de 1 a 20.

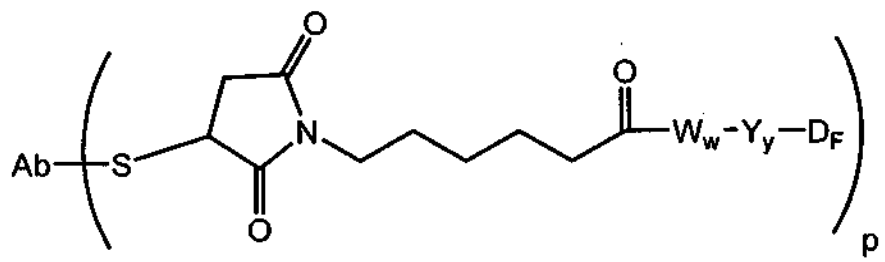
5. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 4, que tiene la fórmula:



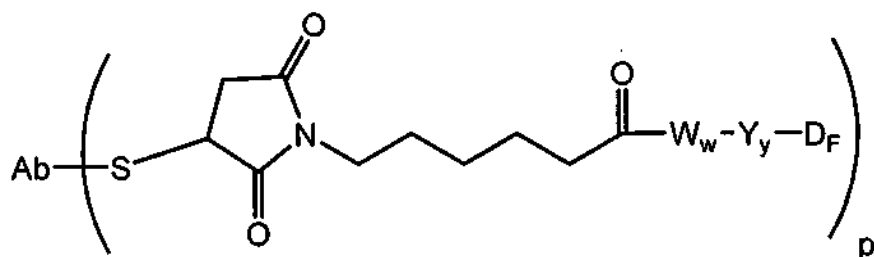
o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo en la que:

R¹⁷ es alquileo C₁-C₁₀-, -carbociclo C₃-C₈-, -O-(alquilo C₁-C₈)-, -arileno-, -alquilen C₁-C₁₀-arileno=, -arilen-
 alquileo C₁=C₁₀-, -alquileo C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -heterociclo C₃-C₈-,
 -alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-, -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -(CH₂CH₂O)_r- o -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; y
 r es un número entero que varía de 1 a 10.

6. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 5, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, que tiene la fórmula:



7. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 5, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, que tiene la fórmula:



en la que: w e y son cada uno 0.

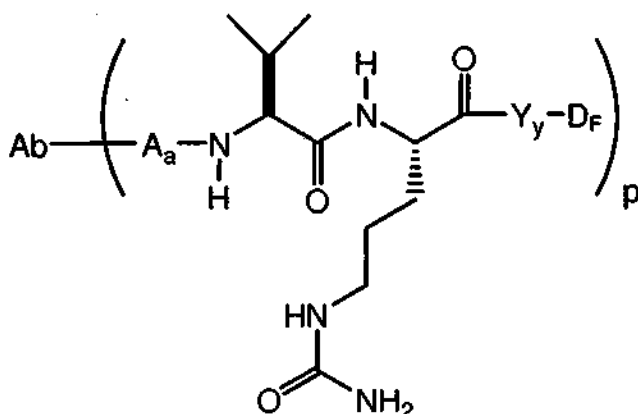
5 8. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 4, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que: w es un número entero que varía de 2 a 12.

9. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 8, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que : w es 2.

10 10. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 9, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que : Ww es -valina-citrulina- o -fenilalanina-lisina-.

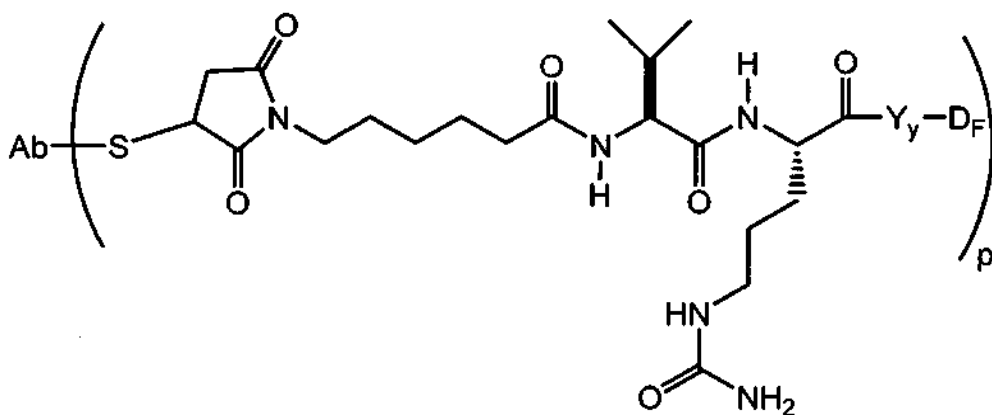
11. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 10, que tiene la fórmula:

15



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

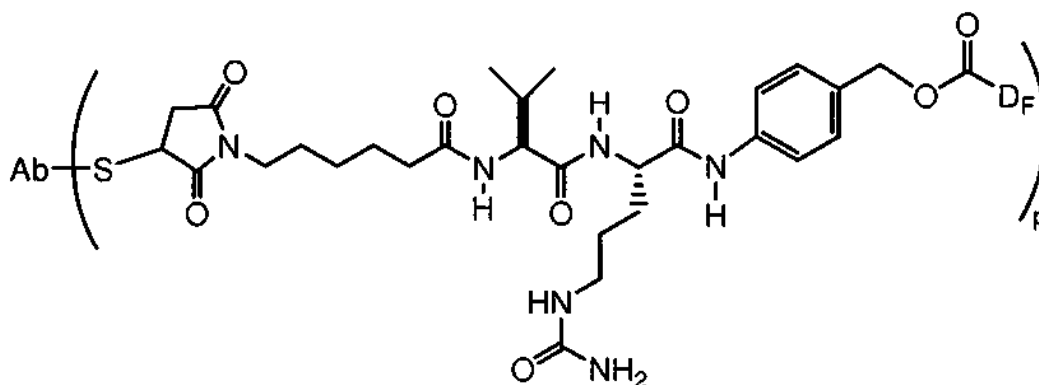
20 12. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 10, que tiene la fórmula:



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

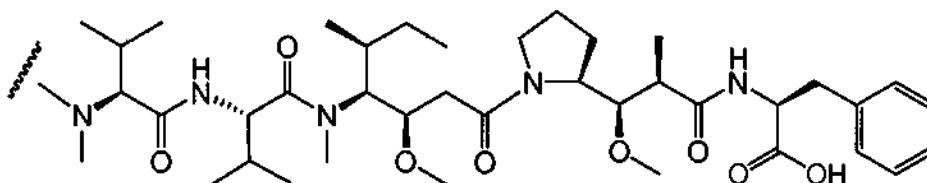
25

13. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 10, que tiene la fórmula:



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

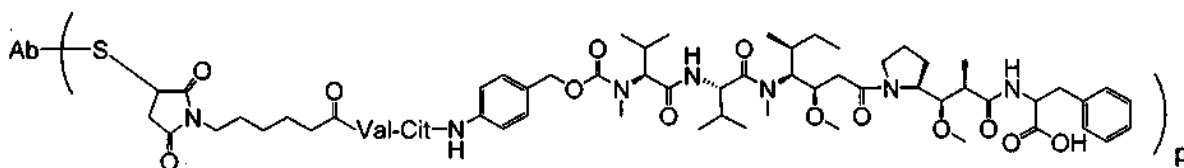
14. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, en el que D_F es:



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

15. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 14, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que el anticuerpo se selecciona entre: un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un diacuerpo y un fragmento de anticuerpo.

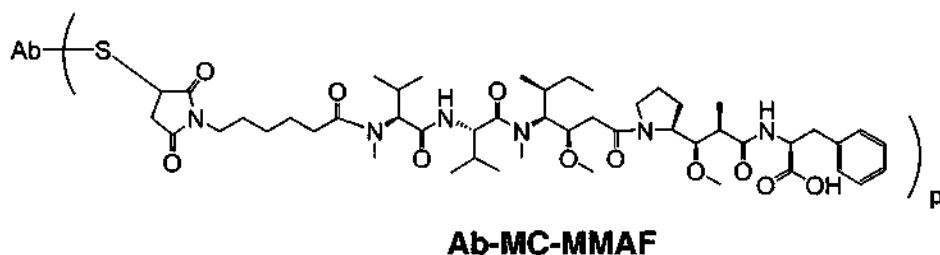
16. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 4, que tiene la fórmula:



Ab-MC-vc-PAB-MMAF

o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo en la que: Ab es un anticuerpo, Val es valina y Cit es citrulina.

17. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 4, que tiene la fórmula:



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo en la que: Ab es un anticuerpo.

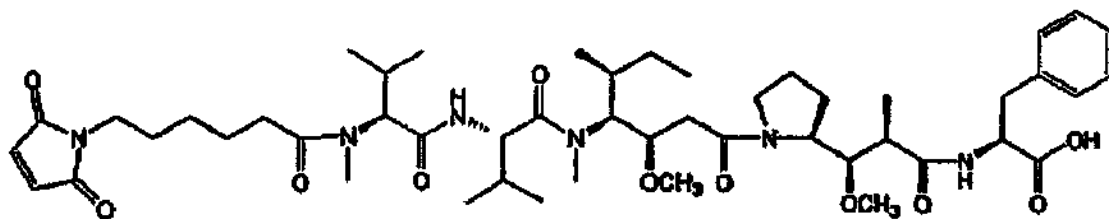
- 5 18. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 17, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que el anticuerpo se une al antígeno CD70.
- 10 19. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con las reivindicaciones 16 o 17, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 10 20. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 19, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que el anticuerpo se une al antígeno CD70.
- 15 21. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 4, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que está presente cada uno de A, W, e Y.
- 20 22. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 5, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que w e y son cada uno 0.
- 20 23. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 22, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que p es de 3 a 5.
- 25 24. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 22, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que el anticuerpo se une al antígeno CD70.
- 25 25. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 24, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que p es de 3 a 5.
- 30 26. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 16 o la reivindicación 17, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que el anticuerpo se une a CD30, CD20, CD33, o al antígeno Lewis Y.
- 35 27. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 4, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo en el que: el anticuerpo se une a la unidad de Conector o a D_F a través de un resto de cisteína del anticuerpo.
- 40 28. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 25, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, y un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.
- 40 29. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 25, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, para uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
- 45 30. Uso de un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 25, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento del cáncer.
- 50 31. Uso de acuerdo con la reivindicación 30, en el que el tratamiento del cáncer comprende adicionalmente tratamiento con un agente anticáncer, un agente inmunosupresor, o un agente antiinfeccioso adicionales.
- 55 32. Uso de un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 25, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune o de una enfermedad infecciosa.
33. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que la unidad de Conector (LU) tiene la fórmula:



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo en la que:

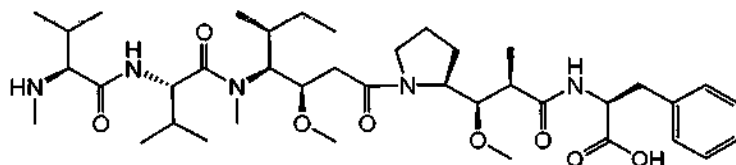
-A- es una unidad Bastidor,
a es 0 o 1,
cada -W- es independientemente una unidad de Aminoácido,
w es un número entero que varía de 0 a 12,
-Y- es una unidad Espaciadora, e
y es 0, 1 o 2.

34. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 3, que tiene la fórmula:



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

35. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la siguiente fórmula, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo:



36. Un compuesto o un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 y 33 a 35, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables de los mismos, que están en forma aislada y purificada.

37. Un compuesto o un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, 15, 21 a 25 y 33, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables de los mismos, en los que R² y R⁶ son cada uno metilo, y R⁹ es -H.

38. Un compuesto o un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, 15, 21 a 25 y 33, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables de los mismos, en los que R³ y R⁴ son cada uno isopropilo, R² y R⁶ son cada uno metilo, R⁵ es -H, R⁷ es sec-butilo, cada aparición de R⁸ es -OCH₃ y R⁹ es -H.

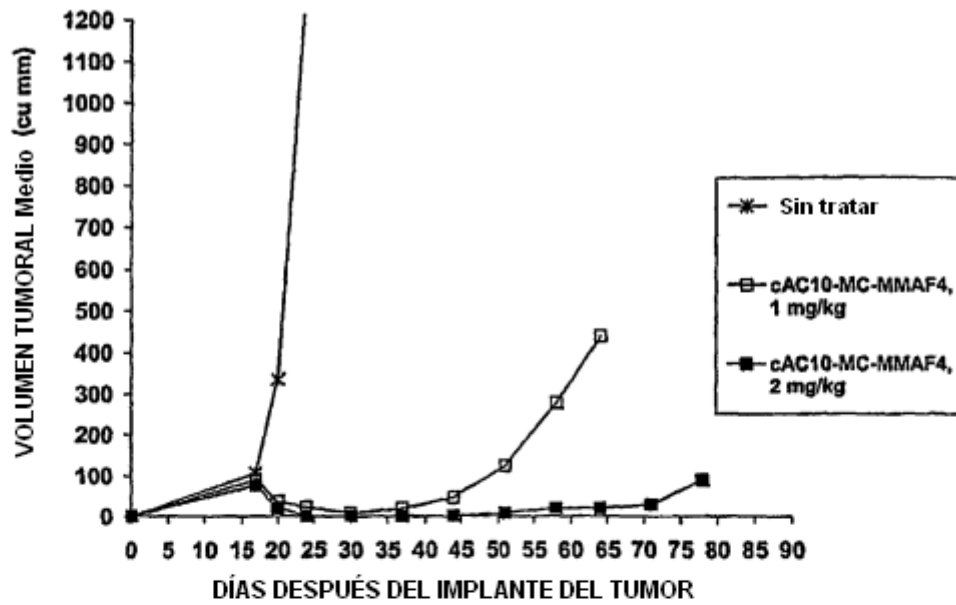


FIGURA 1

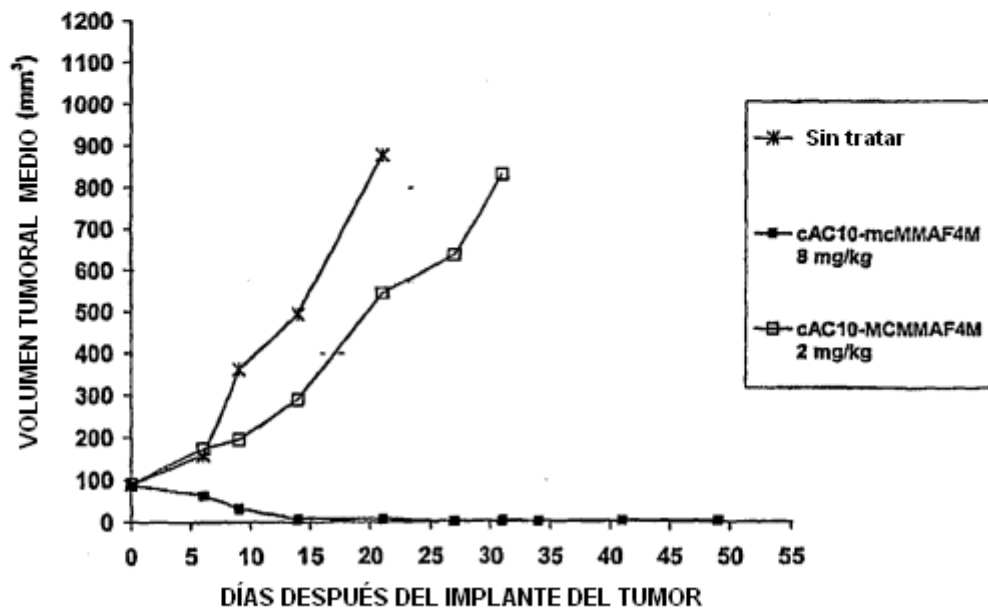


FIGURA 2

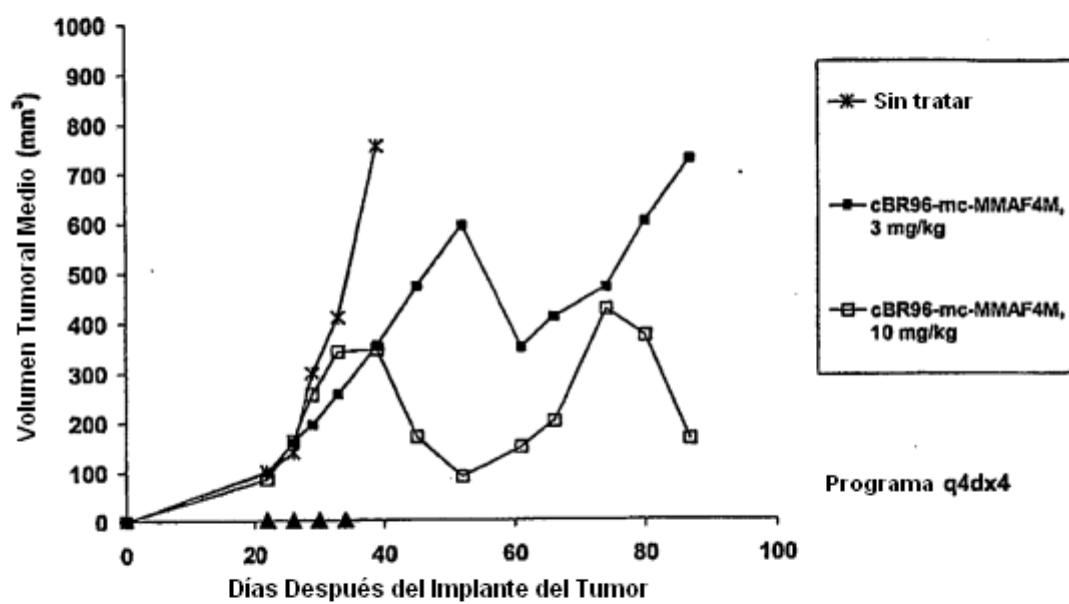


FIGURA 3a

Eficacia de mAb-mc-MMAF en Carcinoma de Pulmón L2987

L2987-AO1

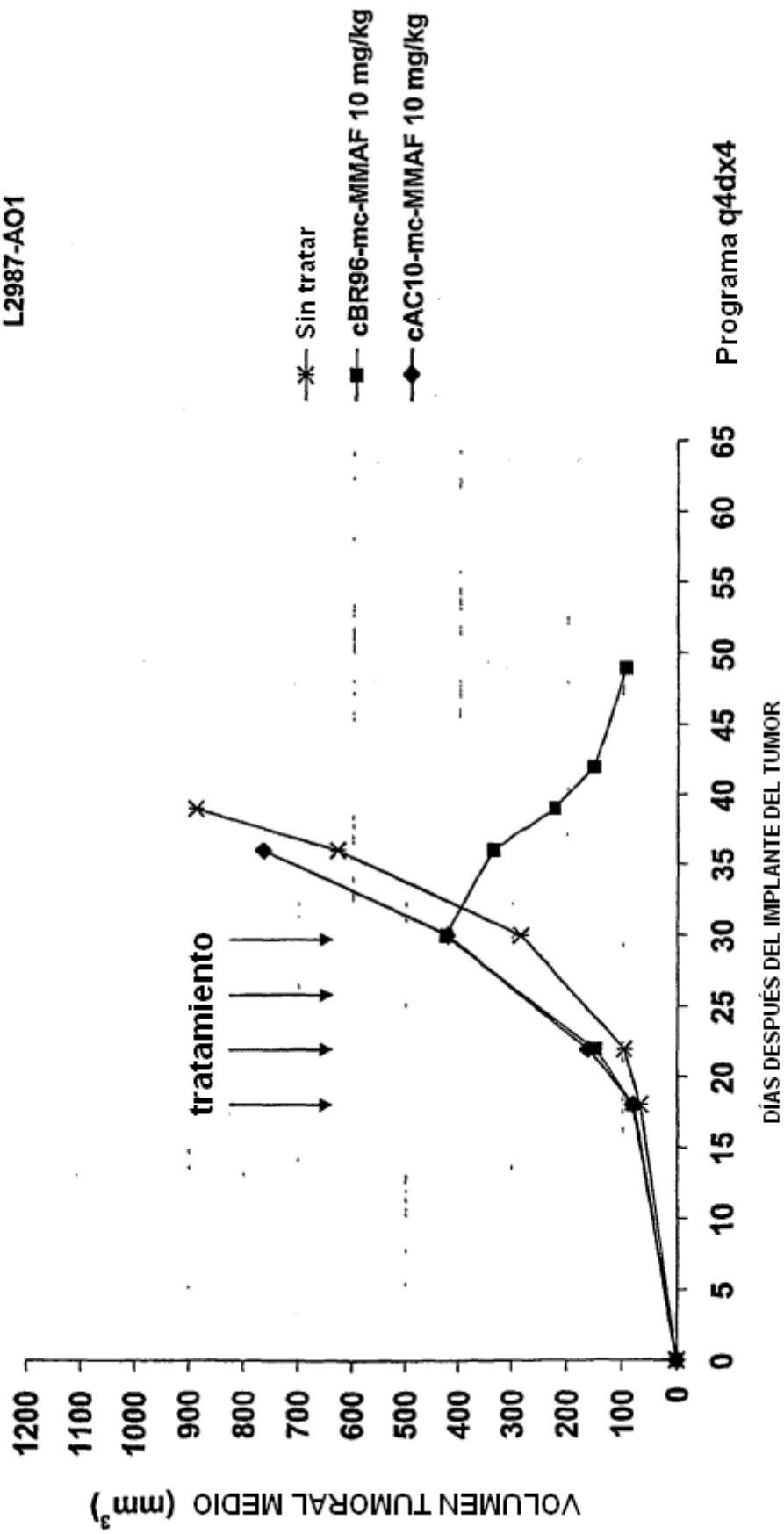


Figura 3b

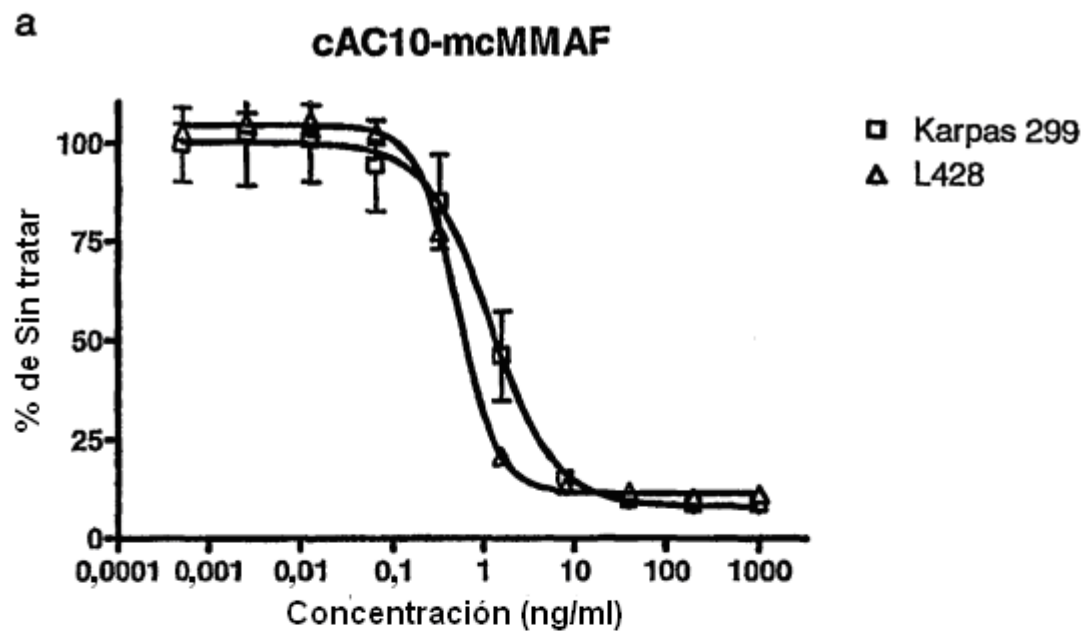


FIGURA 4a

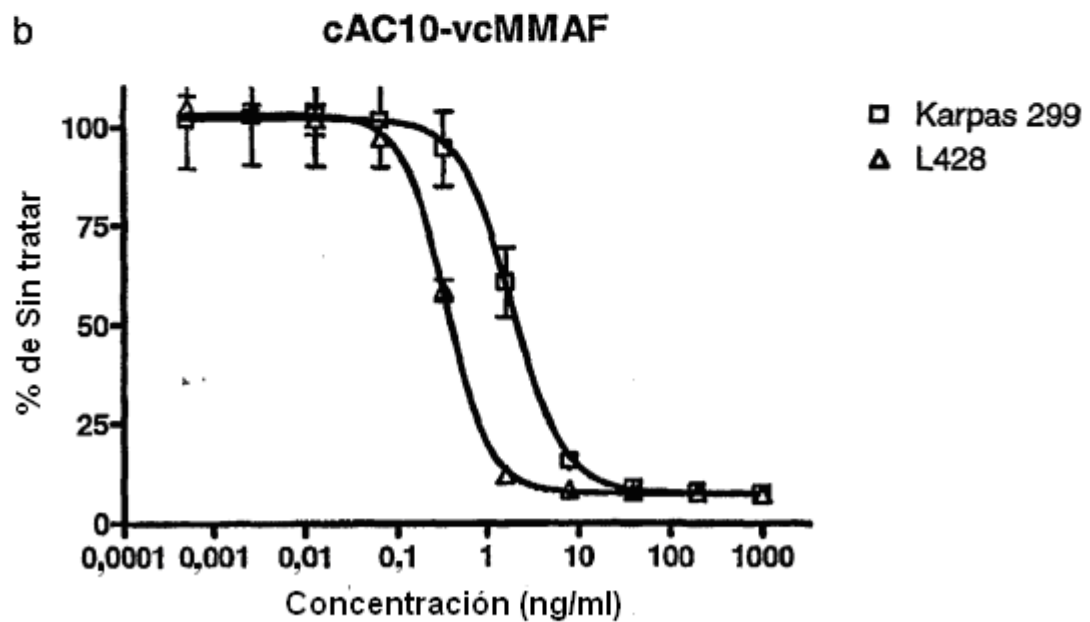


FIGURA 4b

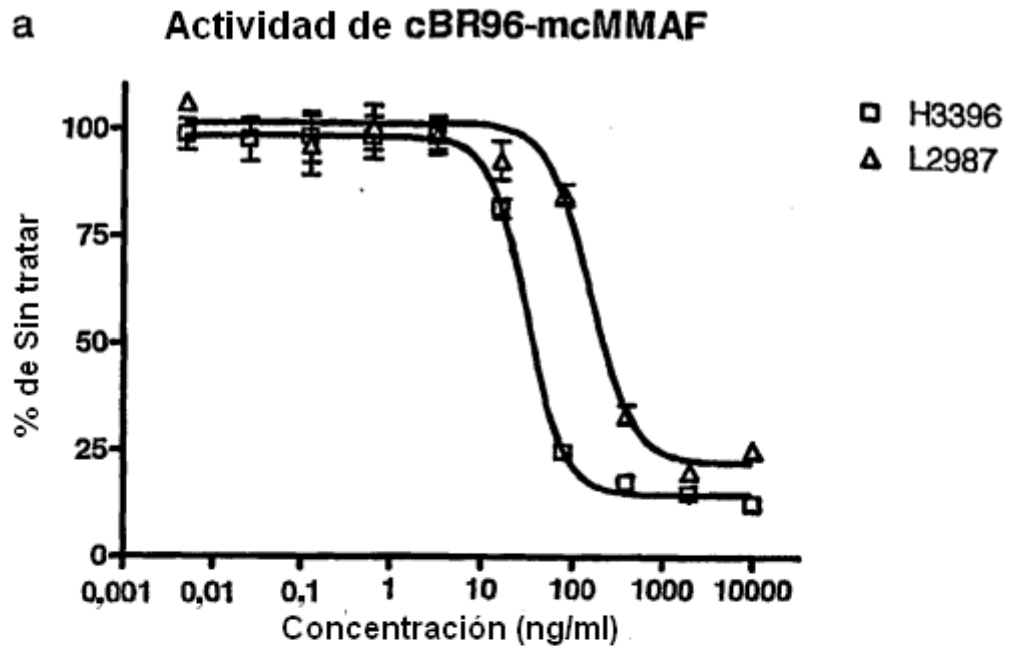


FIGURA 5a

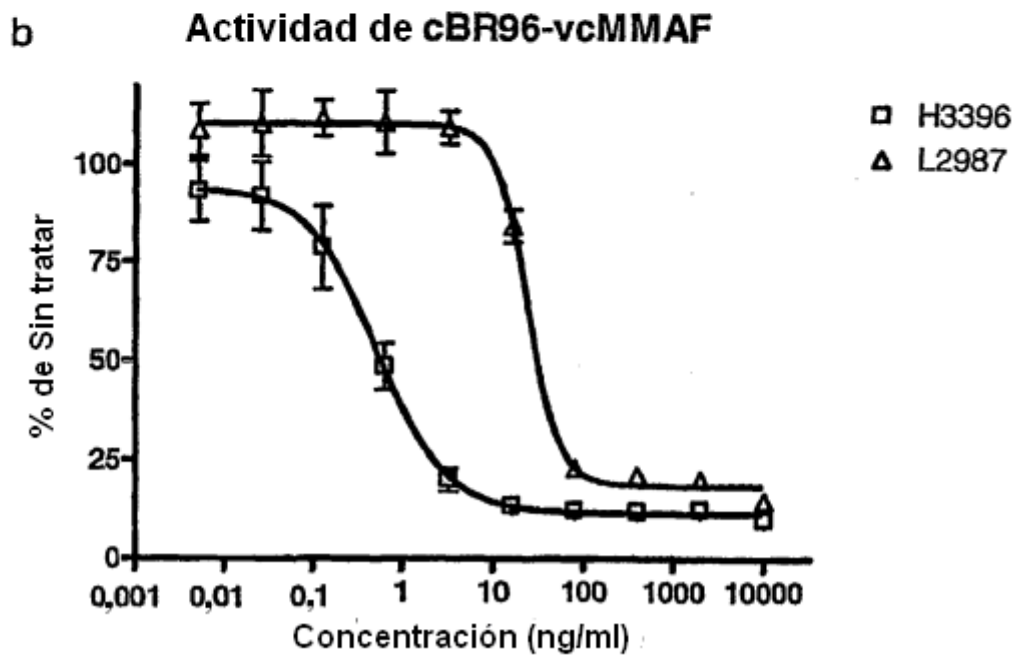


FIGURA 5b

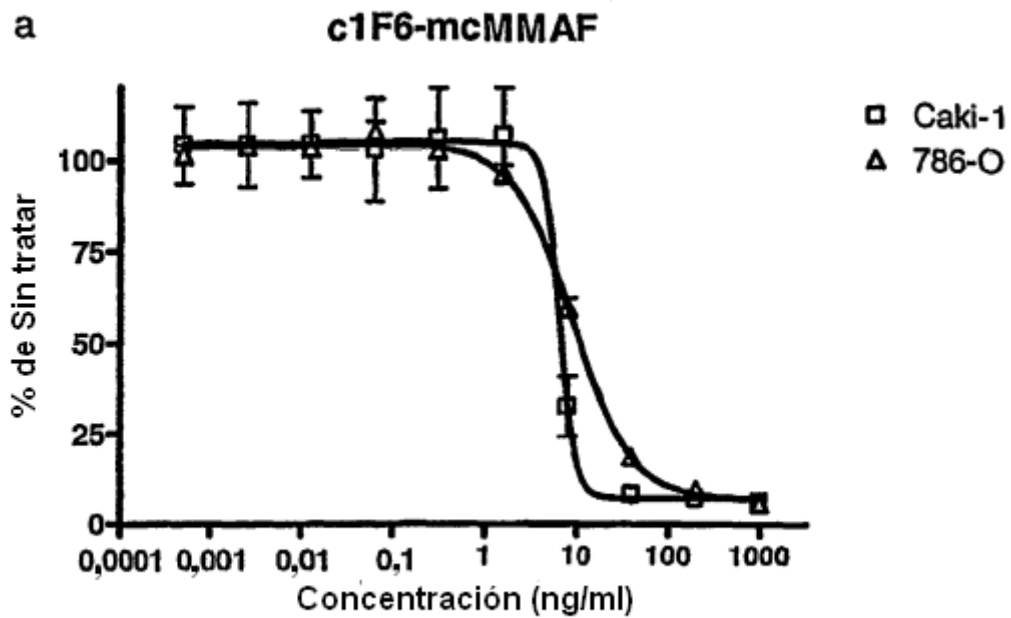


FIGURA 6a

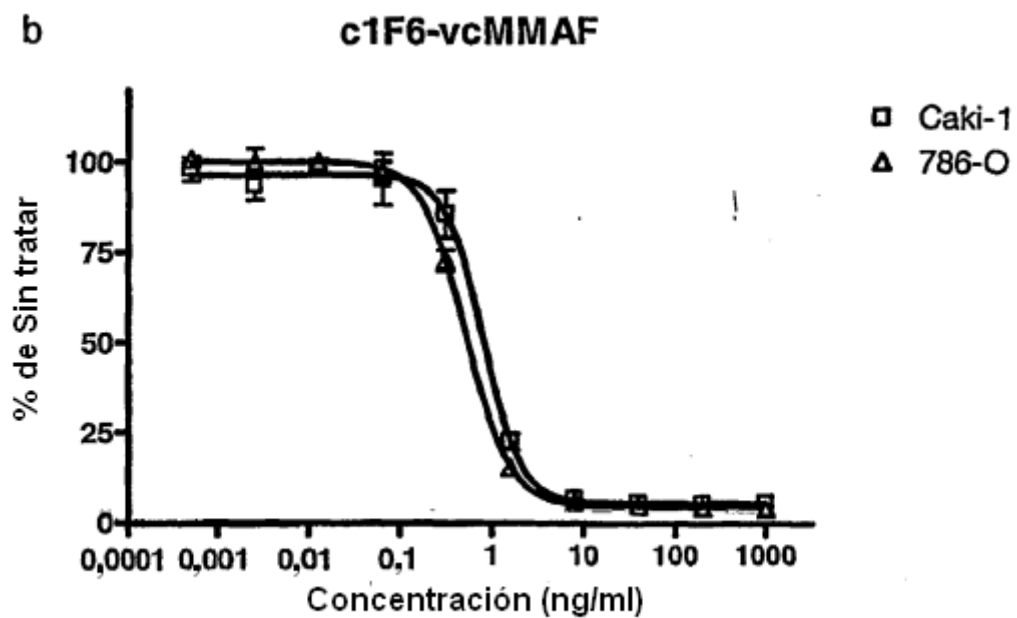


FIGURA 6b

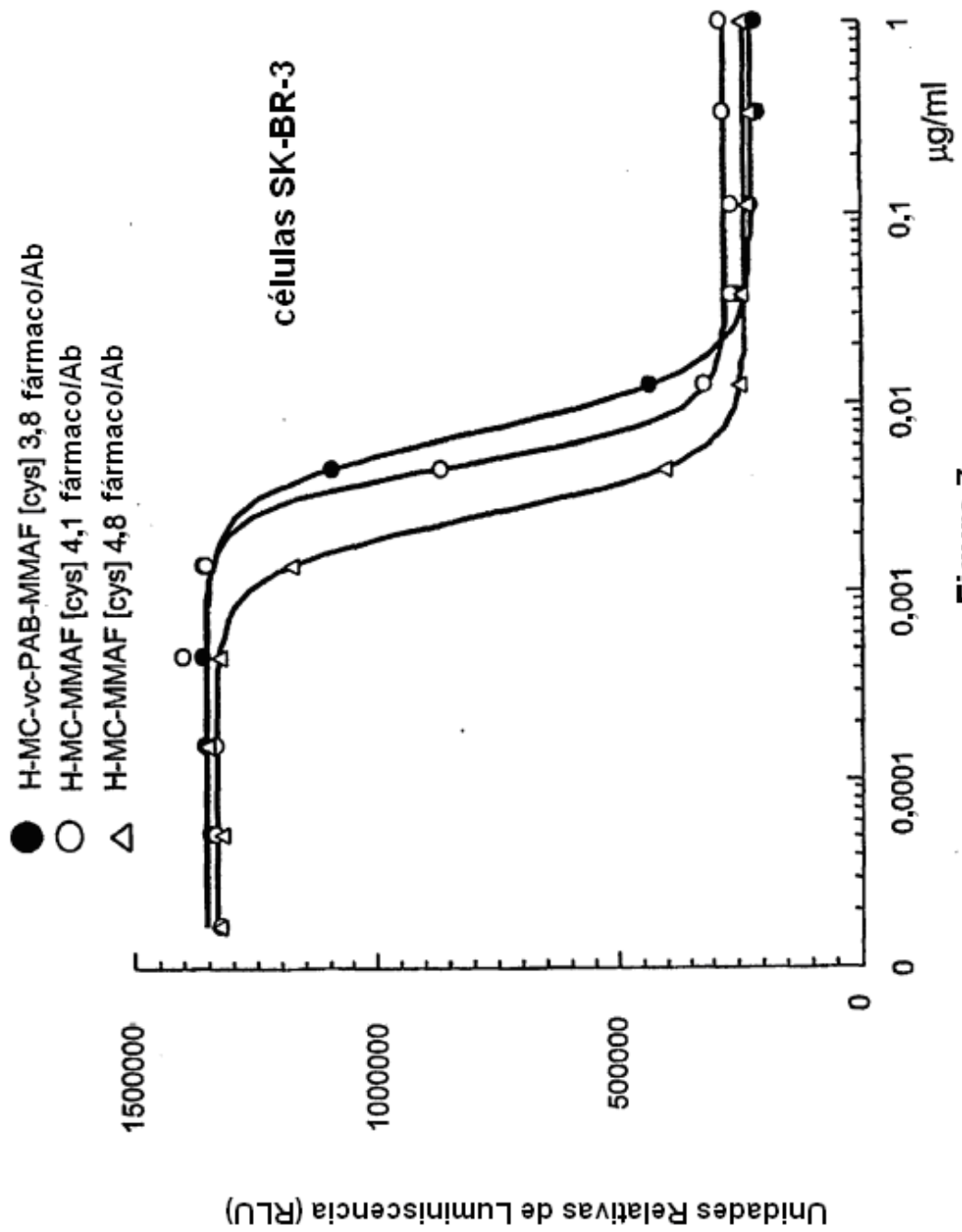
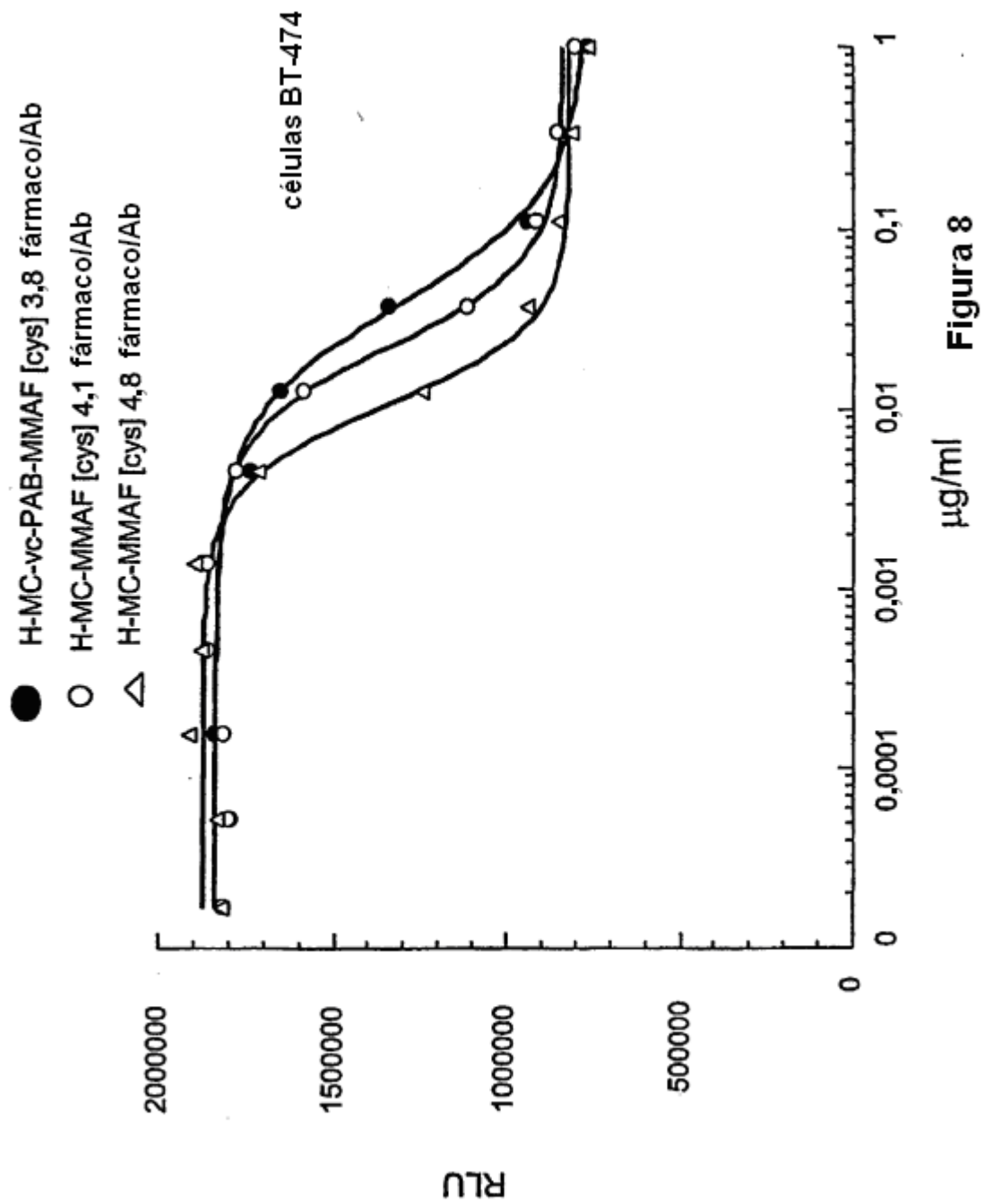


Figura 7



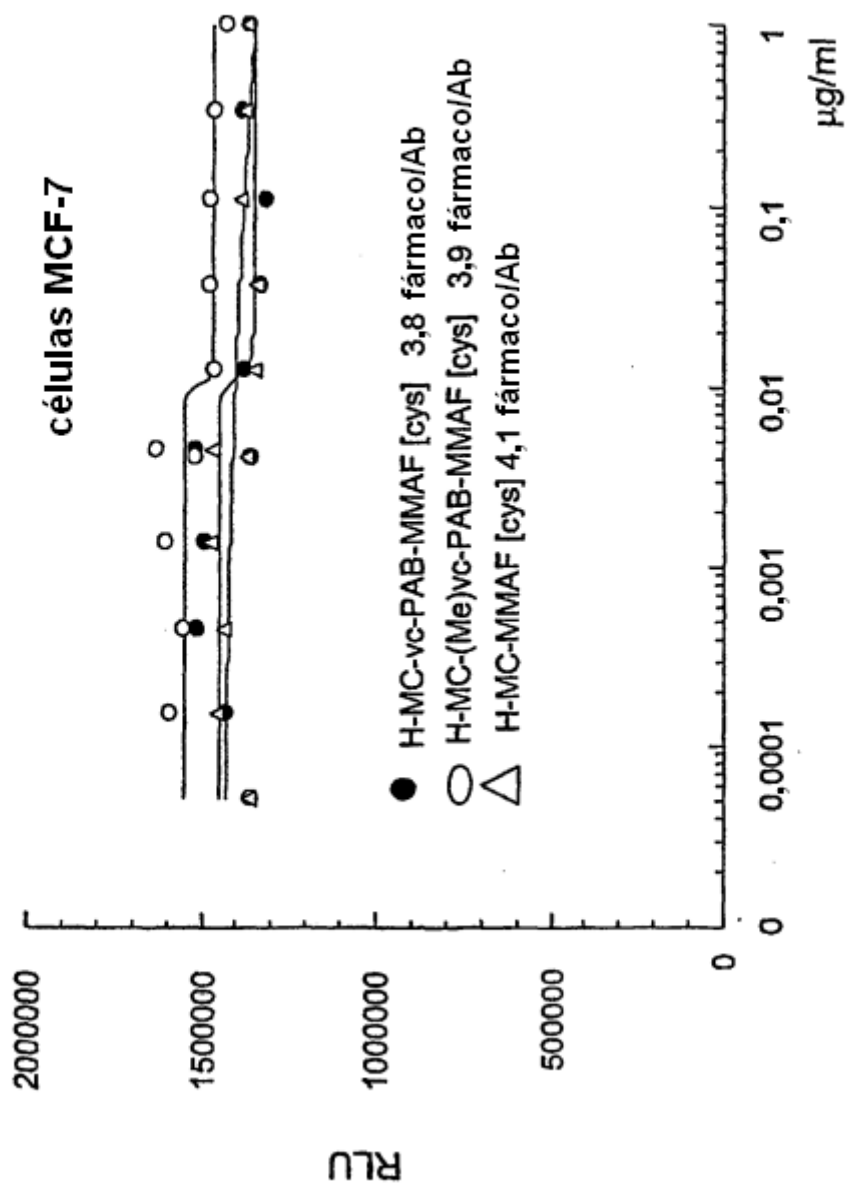
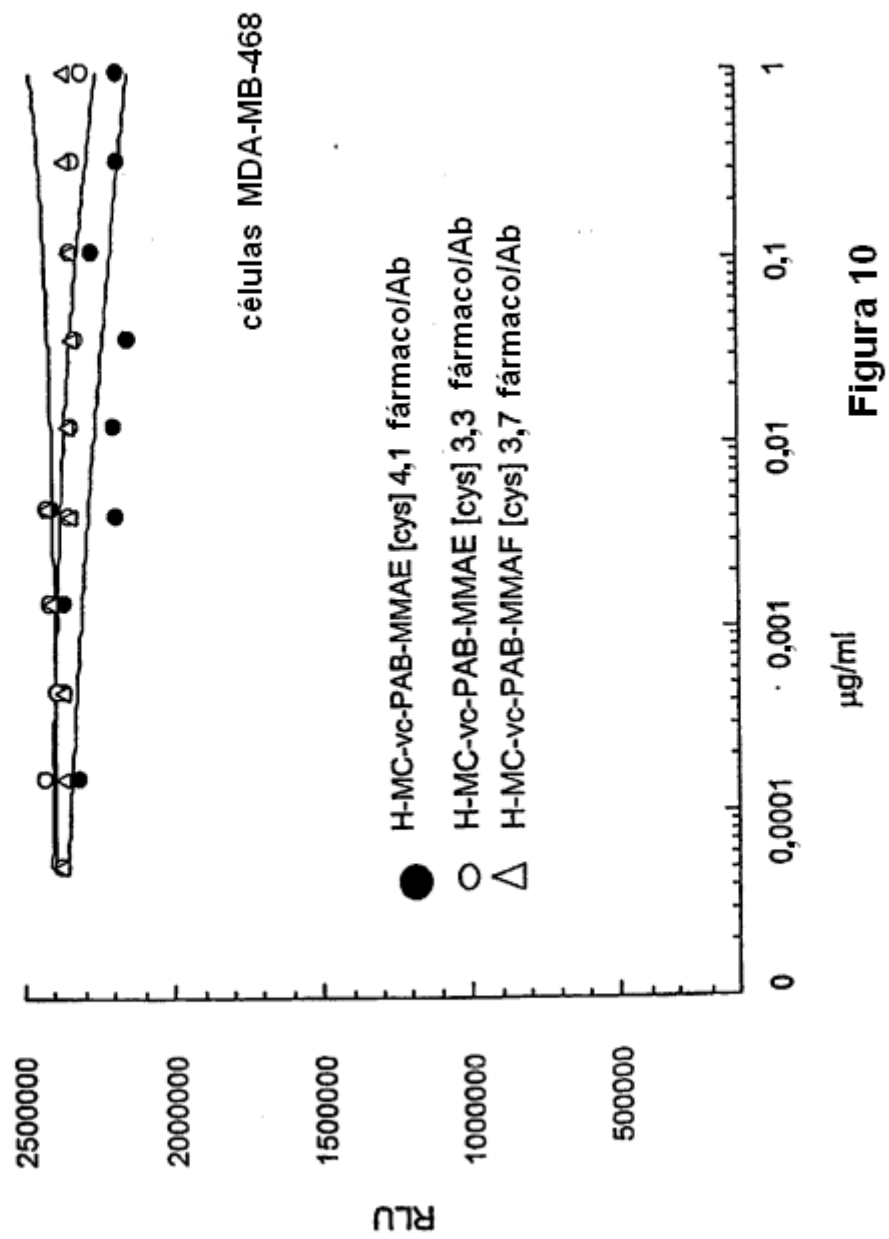


Figura 9



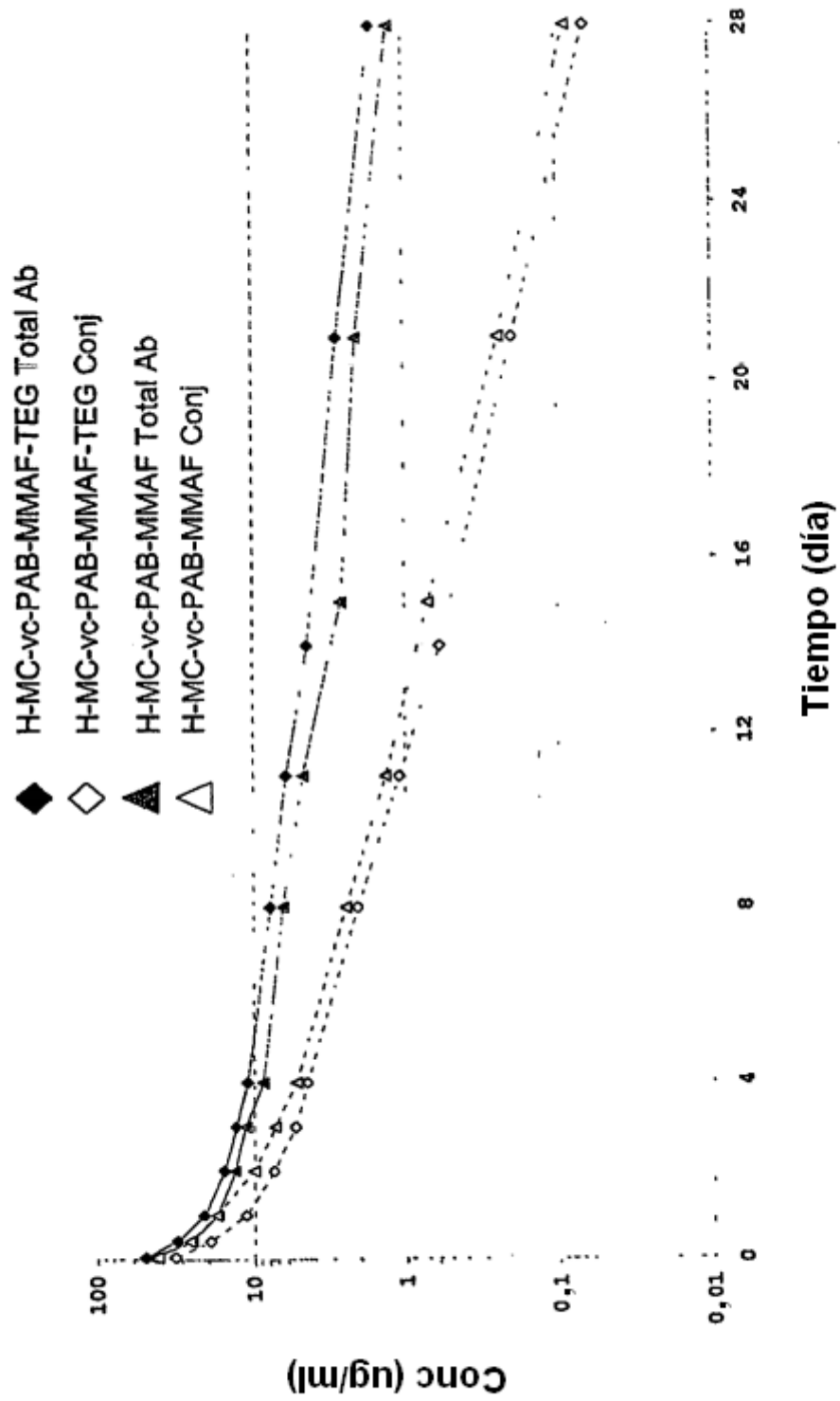


Figura 11

H-MC-vc-PAB-MMAE en monos Cynomolgus

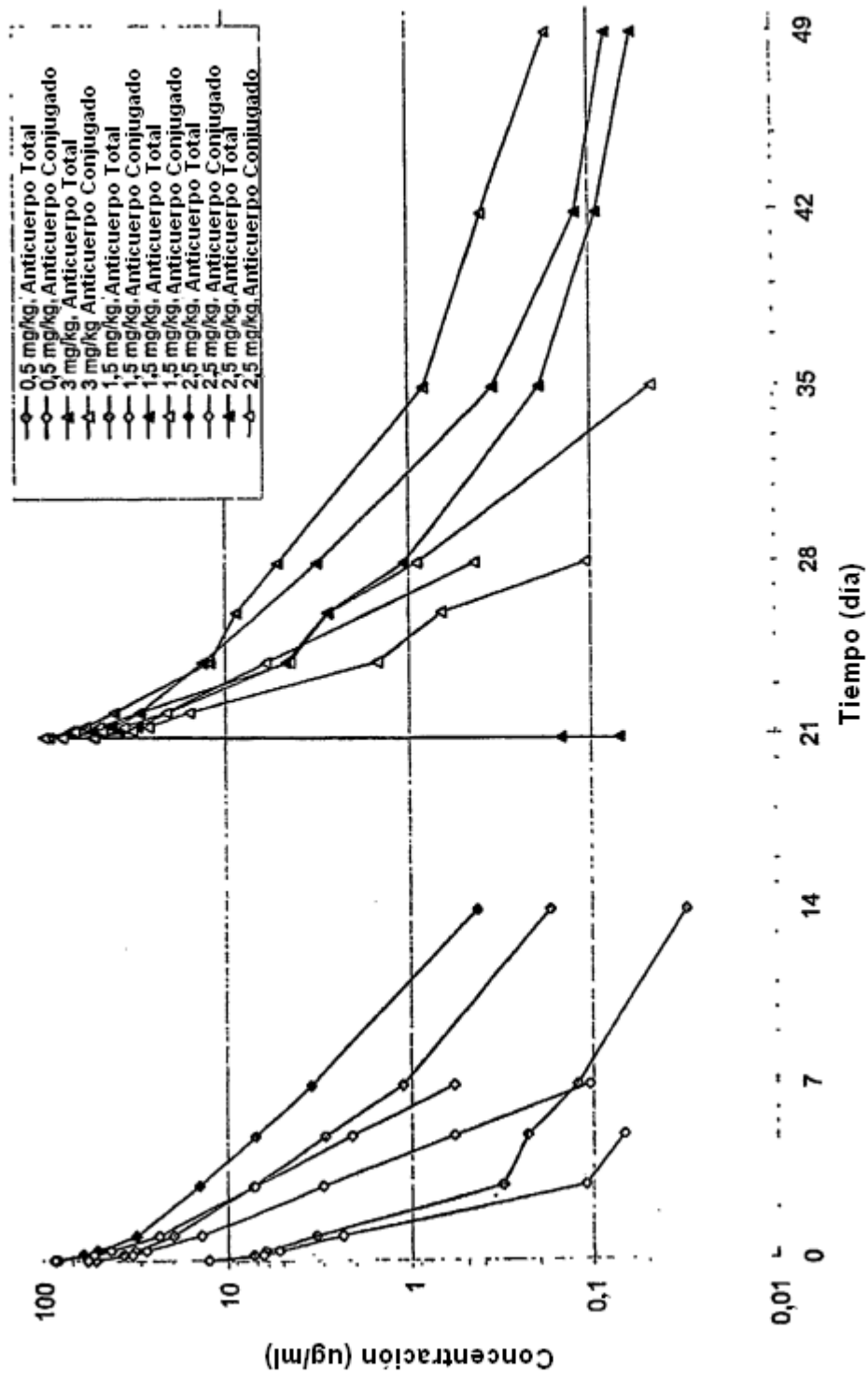


Figura 12

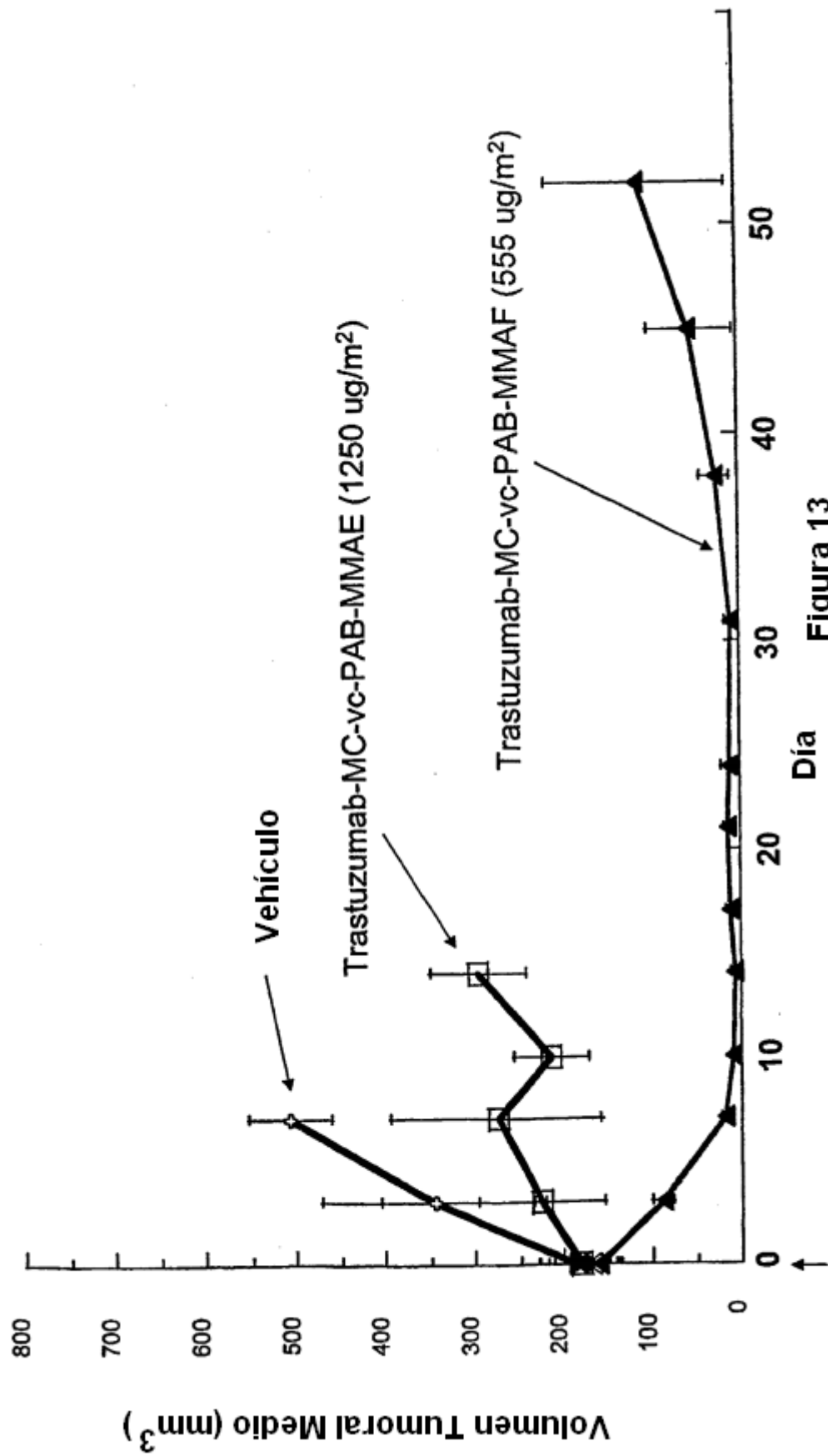


Figura 13

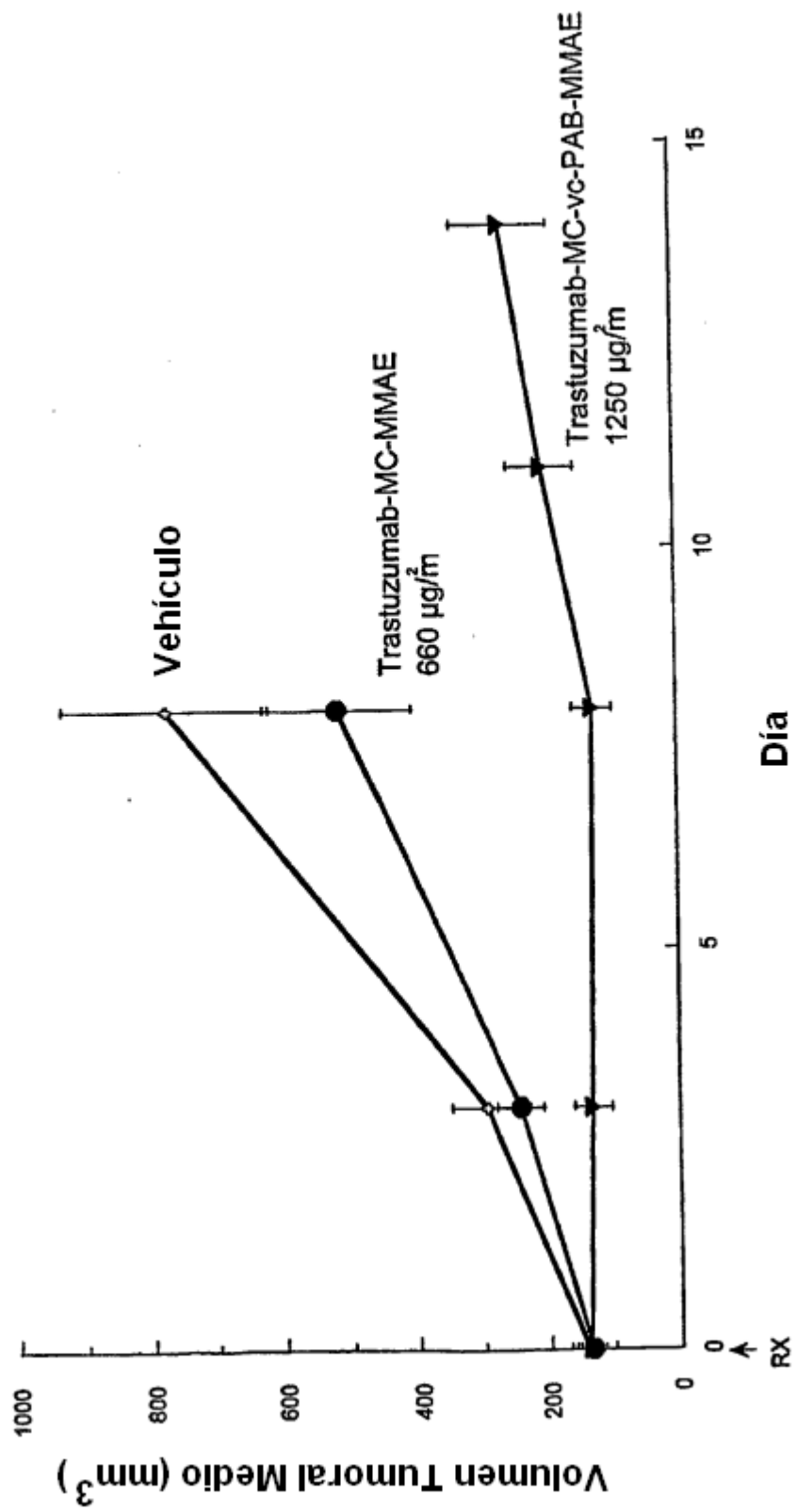


Figura 14

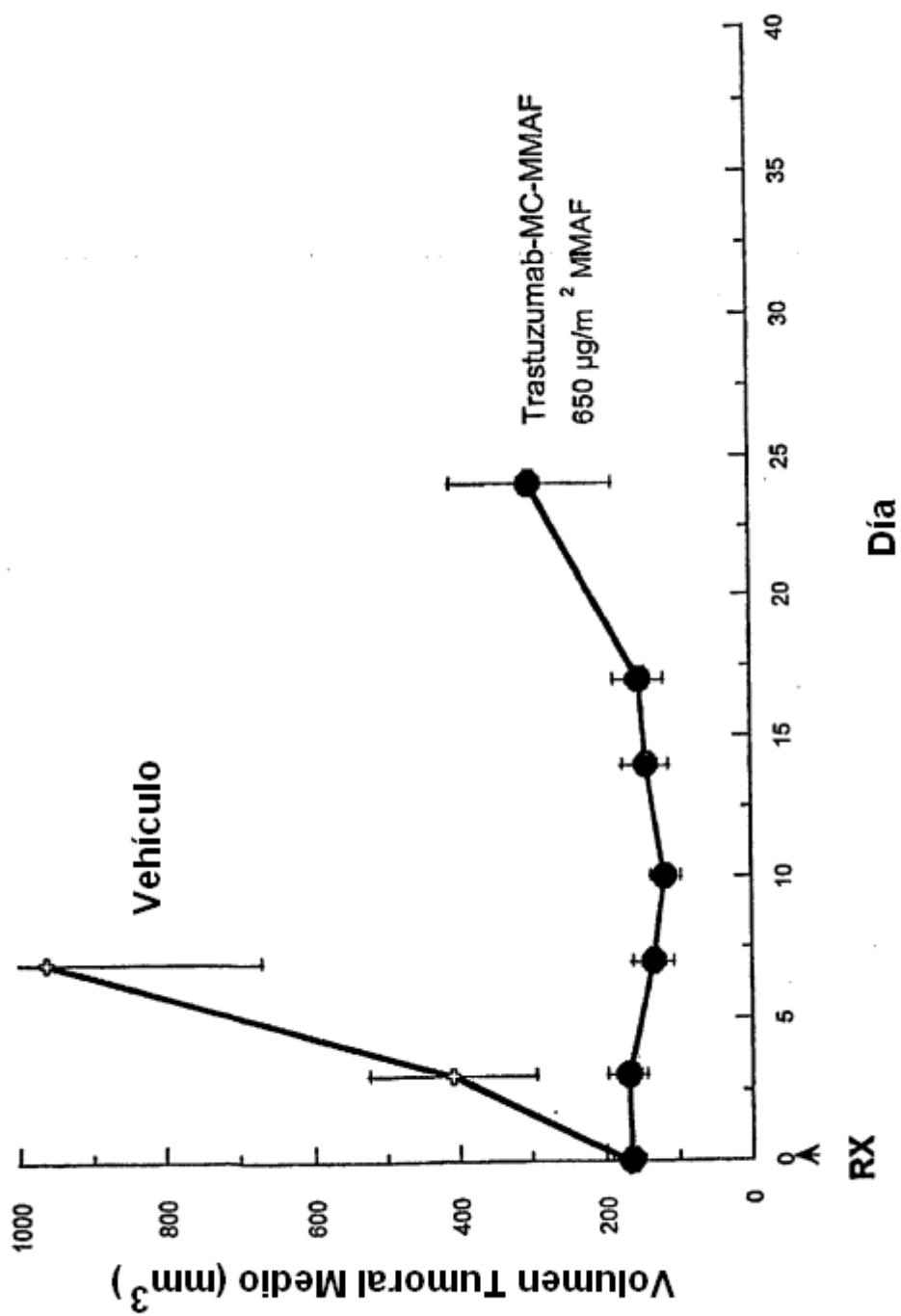
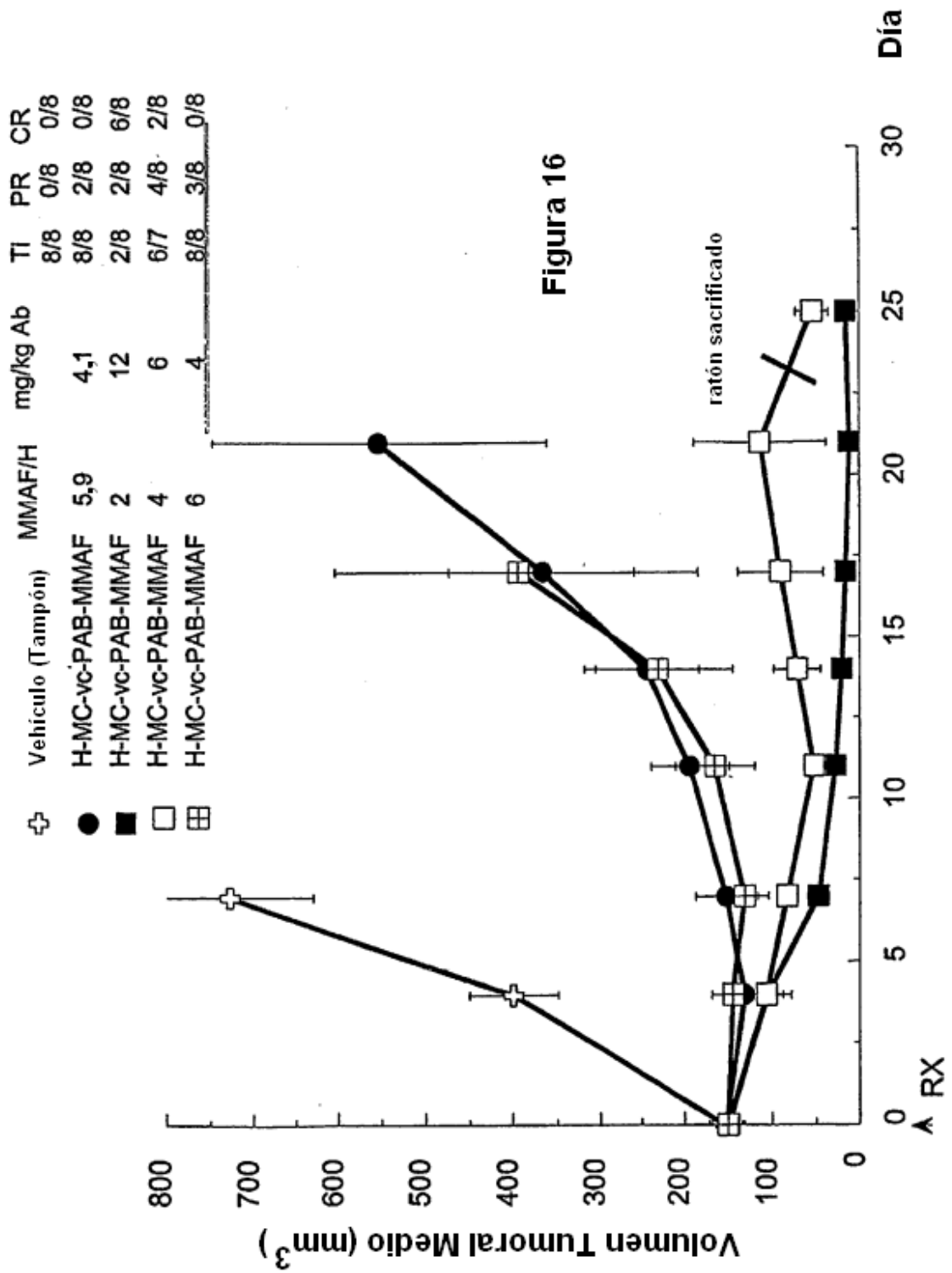


Figura 15



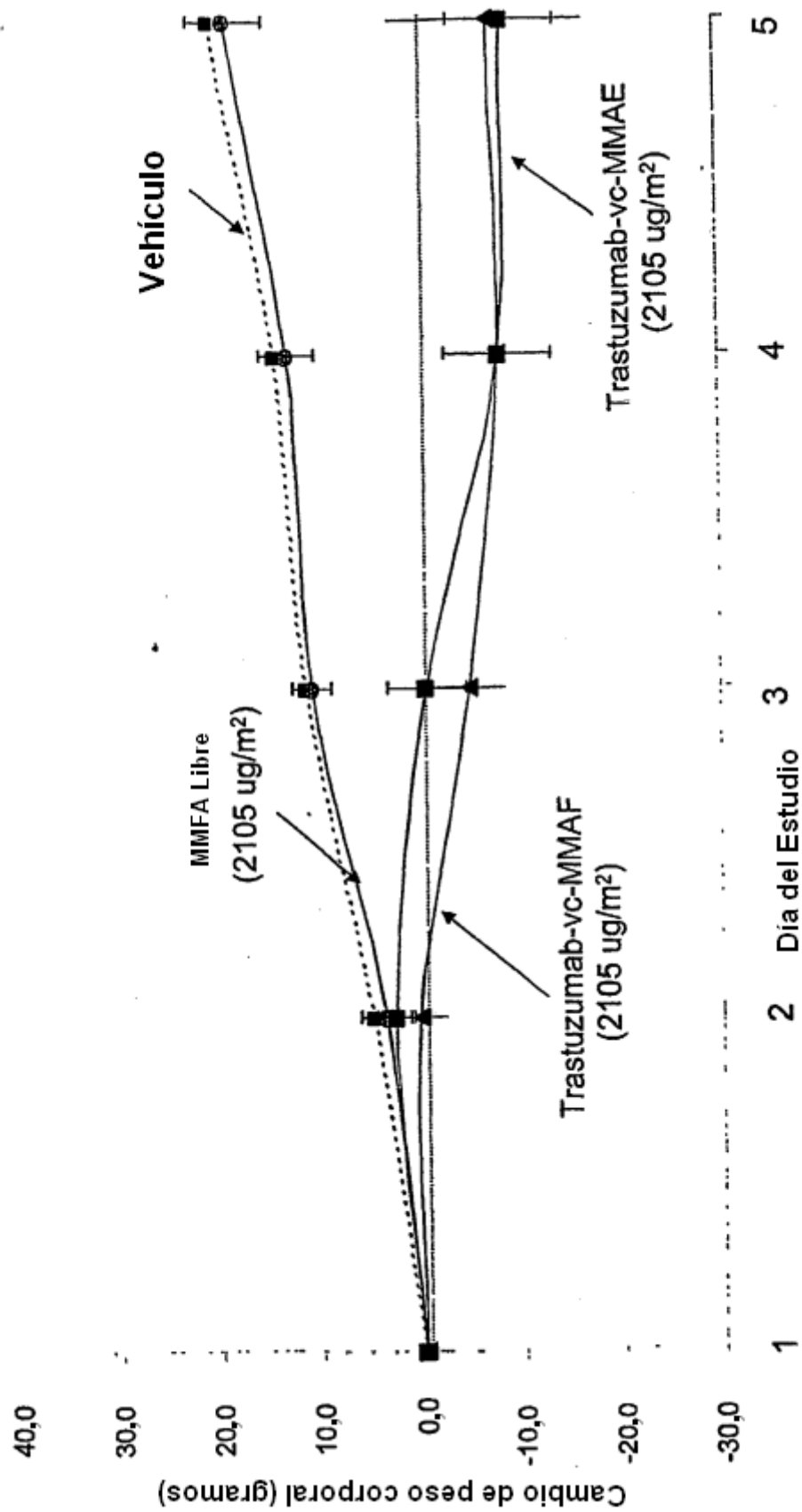


Figura 17

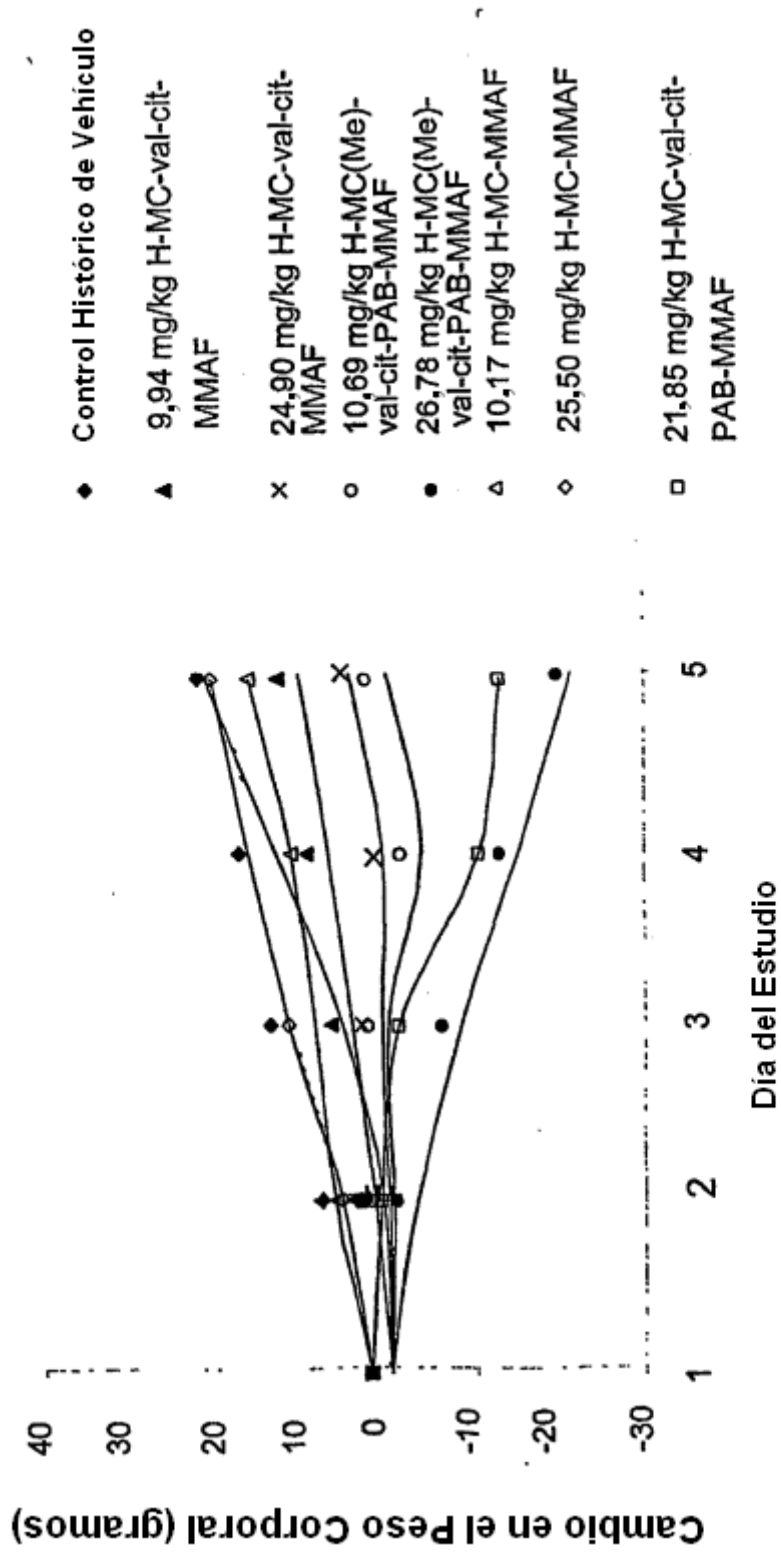


Figura 18

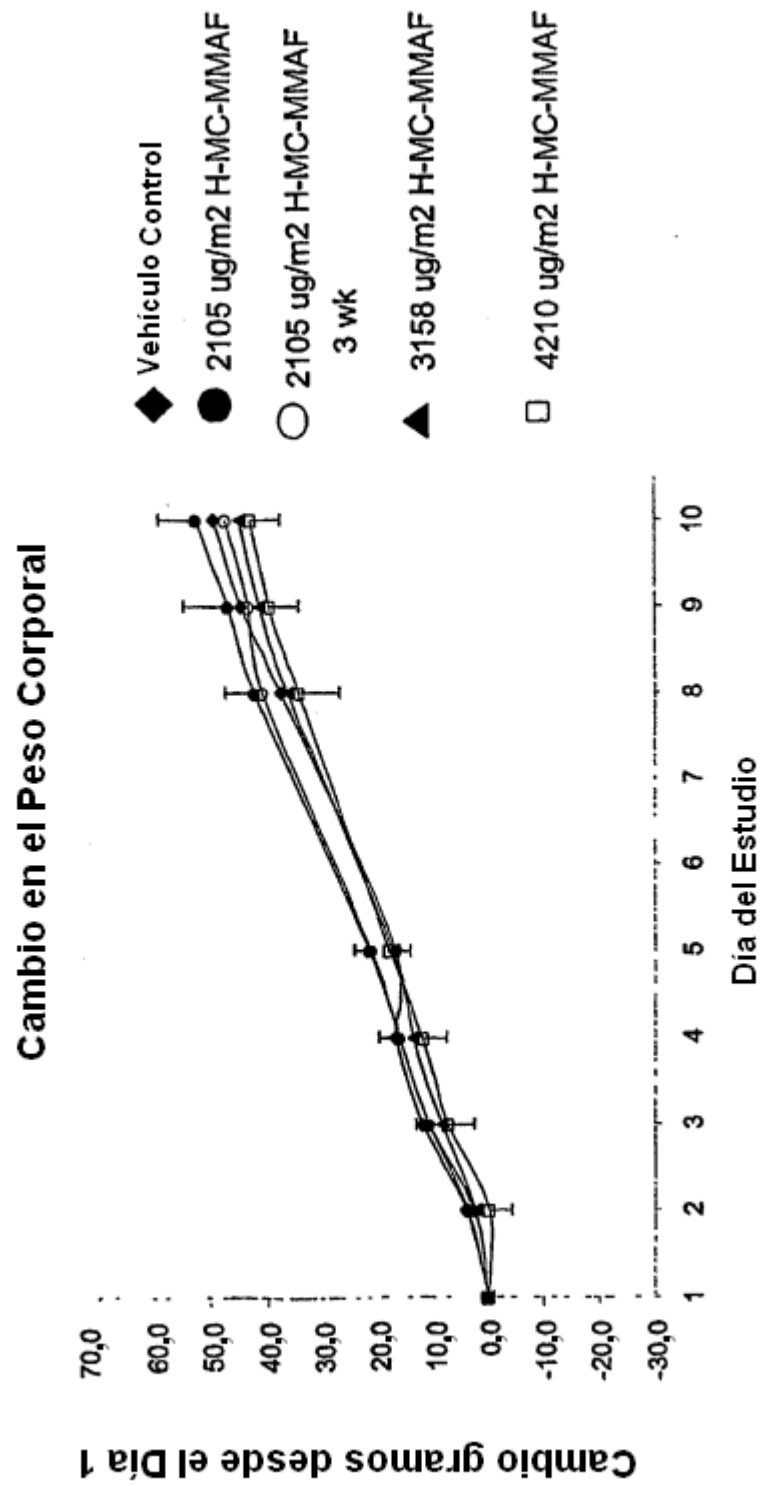


Figura 19