

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 608**

51 Int. Cl.:

C07D 491/12 (2006.01)

A61K 31/535 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2011 E 11793586 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015 EP 2640727**

54 Título: **Conjugados de anticuerpo y de alaninil-maitansinol**

30 Prioridad:

17.11.2010 US 414535 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.09.2015

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**FLYGARE, JOHN;
JUNUTULA, JAGATH REDDY y
PILLOW, THOMAS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 544 608 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

Conjugados de anticuerpo y de alaninil-maitansinol

5 **Solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de conformidad con la solicitud provisional de EE.UU. Nº de serie 61/414.535, presentada el 17 de noviembre de 2010.

10 **Campo de la invención**

La invención se refiere, en general, a anticuerpos conjugados con restos de fármaco maitansinoide para formar conjugados de anticuerpo-fármaco con aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico. Los anticuerpos se pueden modificar genéticamente con aminoácidos de cisteína libres, reactivos para la conjugación con reactivos enlazadores de los fármacos alaninil-maitansinoides. La invención también se refiere a métodos de uso de los compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco alaninil-maitansinoide para el diagnóstico o el tratamiento *in vitro*, *in situ* e *in vivo* de células de mamífero o afecciones patológicas asociadas.

20 **Antecedentes de la invención**

Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) son moléculas quimioterapéuticas dirigidas que combinan las propiedades ideales tanto de los anticuerpos como de los fármacos citotóxicos mediante la dirección de potentes fármacos citotóxicos a las células tumorales que expresan el antígeno, la interiorización y la liberación del fármaco, aumentando así su actividad antitumoral. El desarrollo exitoso de ADC para un antígeno diana dado depende de la optimización de la selección de los anticuerpos, del diseño y de la estabilidad de los enlazadores, de la potencia del fármaco citotóxico, y del modo de conjugación entre el fármaco y el enlazador al anticuerpo. Las propiedades de pH de los enlazadores, así como las sensibilidades redox y la susceptibilidad a las proteasas, influyen en la interiorización y la liberación del resto de fármaco citotóxico. La escisión intracelular de los enlazadores que contienen disulfuro de un ADC está limitada por el potencial de oxidación de los endosomas y los lisosomas, y probablemente no sean liberados por la escisión reductora dentro de la vía endocítica (Austin et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 102(50): 17987-17992). La escisión reductora se puede producir en la membrana celular y conferir un efecto destructor espectador de las células tumorales y normales susceptibles mediante el fármaco libre. Es probable que la liberación inapropiada del fármaco contribuya a la toxicidad. Una vez interiorizado, la eficacia del ADC depende de la digestión proteolítica de la actividad del fármaco. La estabilidad del enlazador desempeña un papel importante tanto en la eficacia como en la toxicidad del ADC (Alley et al., (2008) *Bioconjugate Chem.* 19: 759-765). Los enlazadores estables tales como mcc son más eficaces y más seguros que los enlazadores de disulfuro, inestables, ampliando la ventana terapéutica.

Es posible modificar anticuerpos con sustituciones de cisteína (ThioMab y ThioFab) en sitios donde las cisteínas se encuentran disponibles para la conjugación, pero no perturban el plegamiento ni el ensamblaje de las inmunoglobulinas, ni alteran la unión al antígeno ni las funciones efectoras (Junutula, et al., 2008b *Nature Biotech.*, 26(8): 925-932; Dornan et al. (2009) "Blood" 114(13):2721-2729, US 7521541, US 7723485; WO2009/052249). Estos ThioMab se pueden conjugar luego con fármacos citotóxicos a través de los grupos tiol de las cisteínas modificadas genéticamente para obtener conjugados de ThioMab-fármaco (TDC) con estequiometría uniforme (aproximadamente 2 fármacos por anticuerpo). Los estudios con múltiples anticuerpos contra diferentes antígenos han mostrado que los TDC son tan eficaces como los ADC convencionales en modelos de xenoinjerto y que se toleran a dosis más elevadas en los modelos preclínicos pertinentes. Los conjugados de ThioMab-fármaco se han modificado genéticamente mediante la unión del fármaco a diferentes partes del anticuerpo (Fab de cadena ligera, Fab de cadena pesada y Fc de cadena pesada). La estabilidad *in vitro* e *in vivo*, la eficacia y las propiedades farmacocinéticas de los TDC proporcionan una ventaja única frente a los ADC convencionales debido a su homogeneidad y a la conjugación específica del sitio con los fármacos citotóxicos.

Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) compuestos del maitansinoide DM1 enlazado a trastuzumab muestran una potente actividad antitumoral en las líneas de células tumorales sensibles y resistentes a trastuzumab con sobreexpresión de HER2 y en modelos de xenoinjerto de cáncer humano. Trastuzumab-mcc-DM1 (T-DM1) se encuentra actualmente en evaluación en ensayos clínicos de fase II en pacientes cuya enfermedad es refractaria a los tratamientos dirigidos a HER2 (Beeram et al. (2007) "A phase I study of trastuzumab-mcc-DM1 (T-DM1), a first-in-class HER2 antibody-drug conjugate (ADC), in patients (pts) with HER2+ metastatic breast cancer (BC)", American Society of Clinical Oncology 43rd: 2 de junio (Sumario 1042; Krop et al., European Cancer Conference ECCO, Póster 2118, 23-27 de septiembre de 2007, Barcelona; US 7097840; US 2005/0276812; US 2005/0166993).

Los maitansinoides, derivados del fármaco antimetabólico maitansina, se unen a los microtúbulos de una manera similar a los fármacos alcaloides de la vinca (Issell B. F. et al. (1978) *Cancer Treat. Rev.* 5:199-207; Cabanillas F. et al. (1979) *Cancer Treat Rep.* 63:507-9). Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) compuestos del maitansinoide DM1 enlazado a trastuzumab muestran una potente actividad antitumoral en las líneas de células tumorales sensibles y resistentes a trastuzumab con sobreexpresión de HER2 y modelos de xenoinjertos de cáncer de mama

humano. Un conjugado de maitansinoides enlazados al anticuerpo de cáncer de mama murino anti-HER2 TA.1 a través del enlazador mcc fue 200 veces menos potente que el conjugado correspondiente con un enlazador de disulfuro (Chari et al. (1992) *Cancer Res.* 127-133). Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) compuestos del maitansinoide DM1 enlazado a trastuzumab muestran una potente actividad antitumoral en las líneas de células tumorales sensibles y resistentes a trastuzumab con sobreexpresión de HER2 y modelos de xenoinjertos de cáncer humano.

Trastuzumab-mcc-DM1 (trastuzumab emtansina, trastuzumab-DM1; T-DM1; PRO132365), un nuevo conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) diseñado específicamente para el tratamiento del cáncer de mama positivo en HER2, se compone del agente citotóxico DM1 (un agente anti-microtúbulos maitansinoide que contiene tiol) conjugado con trastuzumab (US 6407213) a través de cadenas laterales de lisina, con una proporción media de fármaco con respecto a anticuerpo de aproximadamente 3,4:1. T-DM1 está en desarrollo para el tratamiento del cáncer de mama metastásico HER2+ (Beeram M., Burris H., Modi S. et al. (2008) *J Clin Oncol* 26: 20 de mayo supl; sumario 1028). T-DM1 se une a HER2 con una afinidad similar a la de trastuzumab. Dicha unión se requiere para la actividad antitumoral de T-DM1 (Folleto para investigadores de HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, julio de 2007). Se plantea la hipótesis de que, tras la unión a HER2, T-DM1 sufre la interiorización mediada por el receptor, lo que produce la liberación intracelular de DM1 y la posterior muerte celular (Austin C. D., De Mazière A. M., Pisacane P. I., et al. (2004) *Mol Cell Biol* 15 (12): 5268-5282).

Se ensayó el ADC de trastuzumab-maitansinoide con diversos enlazadores para determinar la eficacia *in vitro* e *in vivo*, la farmacocinética y la toxicidad en estudios preclínicos (Phillips et al. (2008) *Cancer Res.* 68 (22): 9280-9290). Trastuzumab enlazado a DM1 a través de un enlace de tioéter no reducible (mcc) mostró una actividad superior en comparación con trastuzumab no conjugado o trastuzumab enlazado a otros maitansinoides a través de enlazadores de disulfuro. Dado que trastuzumab enlazado a DM1 a través de un enlazador no reducible ofrece una eficacia y una farmacocinética mejores, así como una toxicidad reducida frente a los enlazadores de disulfuro reducibles evaluados, se seleccionó trastuzumab-mcc-DM1 para el desarrollo clínico.

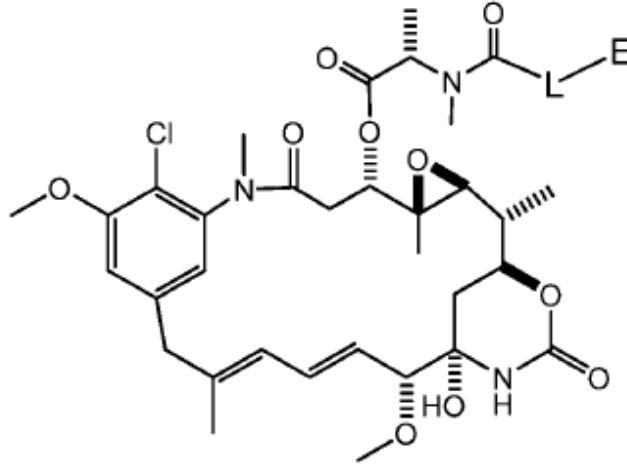
DM1 es un maitansinoide que contiene tiol derivado del éster de origen natural ansamitocina P3 (Remillard S., Rebhun L. I., Howie G. A., et al. (1975) *Science* 189(4207): 1002-1005.3; Cassady J. M., Chan K. K., Floss H. G. (2004) *Chem Pharm Bull* 52(1):1-26.4). El éster vegetal relacionado, la maitansina, se ha estudiado como agente quimioterapéutico en aproximadamente 800 pacientes, administrado a una dosis de 2,0 mg/m² cada 3 semanas, bien como una sola dosis o durante 3 días consecutivos (Issell B. F., Crooke S. T. (1978) "Maytansine". *Cancer Treat Rev* 5:199-207). A pesar de la actividad no clínica, la actividad clínica de la maitansina fue modesta a las dosis que se pudieron administrar de forma segura. La toxicidad limitante de la dosis (DLT) fue gastrointestinal, consistiendo en náuseas, vómitos y diarrea (a menudo seguida de estreñimiento). Estas toxicidades fueron dependientes de la dosis, pero no de la pauta de dosificación. Se informó de neuropatía periférica (predominantemente sensorial), y fue más evidente en los pacientes con neuropatía preexistente. Se informó de elevaciones transitorias subclínicas de la transaminasa hepática, la fosfatasa alcalina y la bilirrubina total. Fueron comunes las toxicidades constitucionales, entre las que se incluyeron la debilidad, el letargo, la disforia y el insomnio. Las toxicidades menos comunes incluyeron la flebitis en la zona de la infusión y la mielosupresión leve. En la década de los 80, se dejó de desarrollar el fármaco debido a la limitada ventana terapéutica.

Hasta la fecha, los resultados clínicos sugieren que T-DM1 puede beneficiar a los pacientes con MBC positivas en HER2 que han progresado durante el tratamiento dirigido a HER2. Trastuzumab-mcc-DM1 (T-DM1) se encuentra actualmente en evaluación en ensayos clínicos de fase II en pacientes cuya enfermedad es refractaria a los tratamientos dirigidos a HER2 (Beeram et al. (2007) "A phase I study of trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1), a first-in-class HER2 antibody-drug conjugate (ADC), in patients (pts) with HER2+ metastatic breast cancer (BC)", American Society of Clinical Oncology 43rd:2 de junio (sumario 1042; Krop et al., European Cancer Conference ECCO, Póster 2118, 23-27 de septiembre de 2007, Barcelona; US 7097840; US 2005/0276812; US 2005/0166993).

El resto enlazador óptimo de los conjugados de anticuerpo-fármaco es estable en la circulación sistémica, sin embargo, permite la liberación eficaz del fármaco en el sitio diana (Alley et al. (2008) *Bioconjugate Chem.* 19:759-765; Christie et al. (2010) *Bioconjugate Chem.* 21:1779-1787; US 2008/0299668). Los ADC enlazados con maleimido pueden someterse a la retroadición de Michael de tiol para liberar el fármaco antes de la unión al receptor diana (Alley et al. (2008) *Bioconjugate Chem.* 19:759-765). Ambos conjugados de anticuerpo TMAb-mcc-DM1 y Thio-TMAb-mpeo-DM1 tienen una maleimida en el enlazador que une el grupo tiol de DM1 a mcc-maleimida o mpeo-maleimida (US 7097840, US 2005/0276812, US 2005/0166993). La incubación de los conjugados de anticuerpo-fármaco, donde un tiol de cisteína del anticuerpo está enlazado a través de un grupo maleimida con plasma de rata y ratón formó conjugados de albúmina-fármaco, coincidiendo con la retroadición de Michael de tiol para liberar el conjugado de fármaco maleimida y la adición con tiol de cisteína de albúmina (Alley et al. (2008) *Bioconjugate Chem.* 19:759-765). De manera análoga, la retroadición de Michael del tiol del resto de fármaco DM1 del ADC puede producir la pérdida de fármaco del anticuerpo y la formación de aductos de albúmina-anticuerpo, cisteína-anticuerpo o glutatión-anticuerpo. Esta inestabilidad de la escisión de los enlaces de tio-maleimida reduce la potencia del ADC administrado. Los nuevos enlazadores sin un grupo maleimida unido a maitansina pueden prevenir la pérdida inespecífica del fármaco maitansina mediante la retroadición de Michael u otros mecanismos del plasma antes de la unión dirigida.

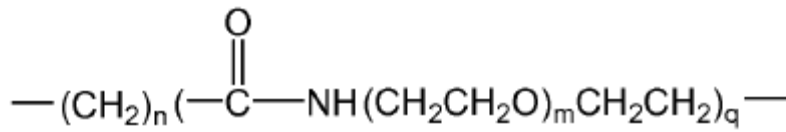
Sumario

Es un aspecto de la presente invención proporcionar nuevos compuestos de enlazador-fármaco de Fórmula I para la conjugación con anticuerpos para formar conjugados de anticuerpo-fármaco.



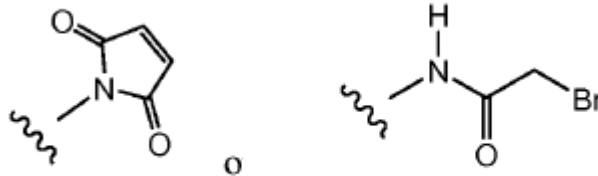
I

5 en la que
L es



;

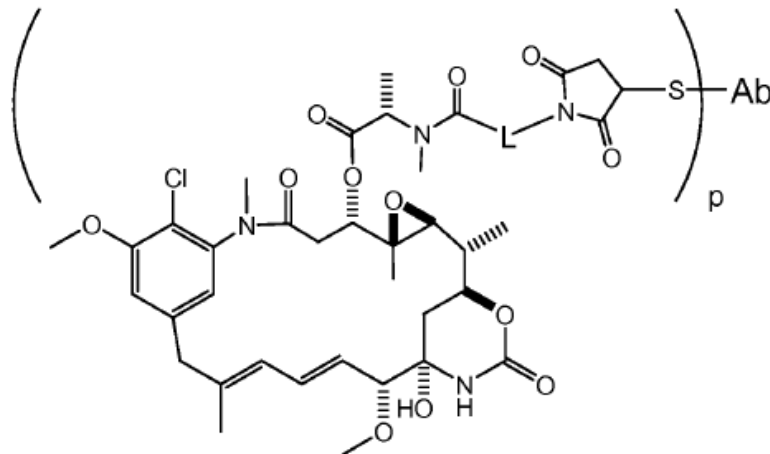
10 E es



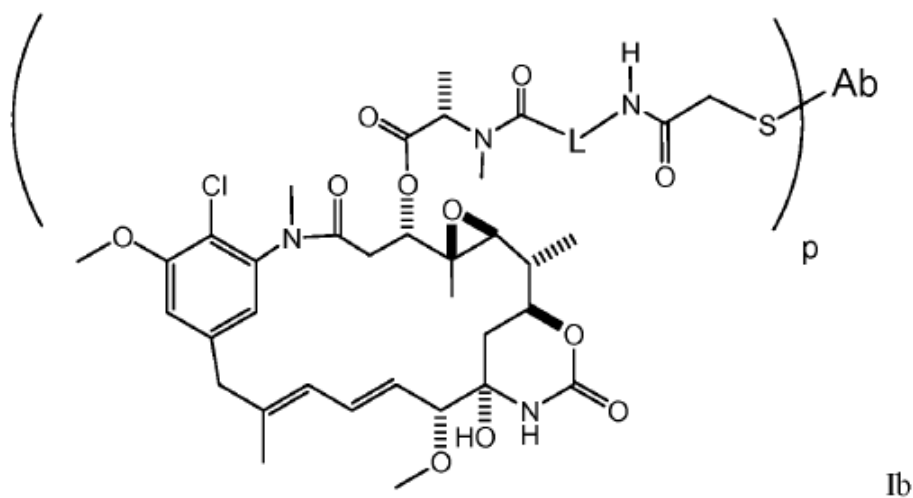
;

n es 2, 3, 4, 5 o 6; m es 2, 3 o 4; y q es 0 o 1.

15 Es un aspecto de la presente invención proporcionar nuevos conjugados de anticuerpo-fármaco de Fórmula Ia y Ib preparados a partir de los compuestos de enlazador-fármaco de Fórmula I.

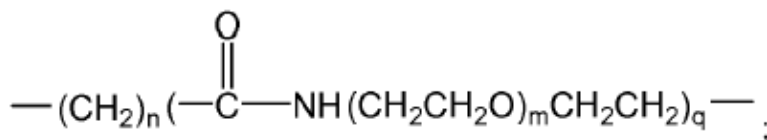


Ia



en la que

L es



5

n es 2, 3, 4, 5 o 6; m es 2, 3 o 4; q es 0 o 1; p es 1 a 4; y Ab es un anticuerpo.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo (Ab) modificado genéticamente con cisteína conjugado a través de un aminoácido de cisteína libre a un enlazador L.

10

Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un conjugado de anticuerpo-fármaco de Fórmula la o Ib y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15

También se desvela un método de tratamiento del cáncer que comprende administrar a un paciente una composición farmacéutica que comprende un conjugado de anticuerpo-fármaco de Fórmula la o Ib.

20

Un aspecto de la invención es un artículo de fabricación que comprende un conjugado de anticuerpo-fármaco de Fórmula la o Ib; un recipiente; y un prospecto o etiqueta que indica que el compuesto se puede usar para tratar el cáncer.

25

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1a muestra una síntesis del fármaco-enlazador intermedio mal-hex-ala-May **5**.

La Figura 1b muestra la síntesis del fármaco intermedio 3-(S-(N-metilalaninil)maitansinol **4a**.

La Figura 2 muestra la síntesis del fármaco-enlazador intermedio bra-hex-ala-May **8**.

La Figura 3 muestra la síntesis del fármaco-enlazador intermedio mal-PEG3-ala-May **14**.

30

La Figura 4 muestra la síntesis del fármaco-enlazador intermedio bra-PEG3-ala-May **18**.

Las Figuras 5a y 5b muestran gráficos del cambio del volumen del tumor ajustado *in vivo* a lo largo del tiempo en tumores de mama transgénicos MMTV-HER2 Fo5 inoculados en la capa de grasa mamaria de ratones CRL nu/nu tras la dosificación con: (1) vehículo (tampón de ADC), (2) LC-V205C-Thio-TMAb-mpeo-DM1, (3) LC-V205C-Thio-TMAb-mal-PEG3-ala-May, (4) HC-A118C-Thio-TMAb-mal-PEG3-ala-May, (5) LC-V205C-Thio-TMAb-mal-hex-ala-May, (6) TMAb-mcc-DM1 (trastuzumab-mcc-DM1, T-DM1), (7) LC-V205C-Thio anti-gD5B6-mal-PEG3-ala-May, (8) LC-V205C-Thio anti-gD5B6-mal-hex-ala-May (Ejemplos 6, 8). Todos los conjugados de anticuerpo-fármaco (dosis individuales) se dosificaron por vía intravenosa a 10 mg/kg. Anti-gD5B6 es un anticuerpo de control y su antígeno correspondiente no se expresa en los tejidos tumorales Fo5.

35

La Figura 6 muestra un gráfico del cambio del volumen del tumor ajustado *in vivo* a lo largo del tiempo en tumores de mama transgénicos MMTV-HER2 Fo5 inoculados en la capa de grasa mamaria de ratones CRL nu/nu tras la dosificación con: (1) vehículo: tampón de histidina Nº 8: acetato de histidina 20 mM, pH 5,5, sacarosa 240 mM, PS 20 al 0,02 %, (4) HC-A118C-Thio-TMAb-mal-PEG3-ala-May, 5 mg/kg, (4) HC-A118C-Thio-

40

5 TMAb-mal-PEG3-ala-May, 10 mg/kg, (10) HC-A118C Thio anti-gD5B6-bra-PEG3-ala-May, 5 mg/kg, (10) HC-A118C Thio anti-gD5B6-bra-PEG3-ala-May, 10 mg/kg, (11) HC-A118C Thio TMAb-bra-PEG3-ala-May, 5 mg/kg, (11) HC-A118C Thio TMAb-bra-PEG3-ala-May, 10 mg/kg, (12) HC-A118C, LC-V205C Thio-TMAb-mal-PEG3-ala-May, 5 mg/kg, (12) HC-A118C, LC-V205C Thio-TMAb-mal-PEG3-ala-May, 10 mg/kg. Todos los conjugados de anticuerpo-fármaco (dosis individuales) se dosificaron por vía intravenosa al iniciarse el estudio.

Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas

10 Se hará referencia ahora en detalle a ciertas realizaciones de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en las estructuras y fórmulas adjuntas. Aunque la invención se describirá en combinación con las realizaciones ilustradas, se entenderá que no se pretende limitar la invención a dichas realizaciones. Al contrario, la invención pretende englobar todas las alternativas, modificaciones y equivalentes, que puedan incluirse dentro del alcance de la presente invención según lo definido por las reivindicaciones.

15 Un experto en la materia reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento que se podrían usar en la práctica de la presente invención. La presente invención no se limita, bajo ningún concepto, a los métodos y materiales descritos.

20 A menos que se defina lo contrario, las expresiones y los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención, y coinciden con: Singleton et al. 20 (1994) "Dictionary of Microbiology and Molecular Biology", II Ed., J. Wiley & Sons, Nueva York, NY; y Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) "Immunobiology", V Ed., Garland Publishing, Nueva York.

25 Definiciones

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y expresiones usados en el presente documento pretenden tener los siguientes significados:

30 Cuando, en el presente documento, se usan nombres comerciales, los solicitantes pretenden incluir independientemente la formulación del producto del nombre comercial, el fármaco genérico y el/los principio/s farmacéutico/s activo/s del producto del nombre comercial.

35 El término "anticuerpo", en el presente documento, se usa en el sentido más amplio y engloba específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Miller et al. (2003) *Jour. of Immunology* 170: 854-4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmune que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, V Ed., Garland Publishing, Nueva York). En general, un antígeno diana tiene numerosos sitios de unión, también denominados epítomos, reconocidos por las CDR en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítomo diferente tiene una estructura diferente. Por lo tanto, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión al antígeno que se une de forma inespecífica a un antígeno de una diana de interés o parte del mismo, incluyendo dichas dianas, pero sin limitación, célula o células cancerosas que producen anticuerpos autoinmunes asociados con una enfermedad autoinmune. La inmunoglobulina desvelada en el presente documento puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden proceder de cualquier especie. No obstante, en un aspecto, la inmunoglobulina es de origen humano, murino o de conejo.

40 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, en general, la región de unión al antígeno o la región variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; minicuerpos (Olafsen et al. (2004) *Protein Eng. Design & Sel.* 17(4):315-323), fragmentos producidos mediante una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), CDR (región de determinación de la complementariedad) y fragmentos de unión al epítomo de cualquiera de los anteriores que se unen de forma inespecífica a antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

60 La expresión "anticuerpo monoclonal", 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 a excepción de posibles mutaciones de origen natural que se pueden presentar en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, siendo dirigidos frente a un solo sitio antigénico. Además, en contraste con los preparados de anticuerpo policlonal que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un

solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se pueden sintetizar sin contaminarse por otros anticuerpos. El adjetivo "monoclonal" indica que el anticuerpo se obtiene de una población básicamente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante el método de hibridoma que fue descrito por primera vez por Kohler et al. (1975) *Nature* 256: 495, o se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante (véanse, por ejemplo, los documentos US 4816567; US 5807715). Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas que se describen, por ejemplo, en Clackson et al. (1991) *Nature*, 352: 624-628; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597.

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de los 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 las secuencias correspondientes de los anticuerpos derivados de otra especie, o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (documento US 4816567; y Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81:6851-6855). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión al antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, Mono del Viejo Mundo o Simio) y secuencias de región constante humanas.

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

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos se pueden asignar a diferentes "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos de inmunoglobulina intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de estos se pueden dividir además 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. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Las formas de Ig incluyen modificaciones bisagra o formas sin bisagra (Roux et al. (1998) *J. Immunol.* 161:4083-4090; Lund et al. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:7246-7256; US 2005/0048572; US 2004/0229310).

Un "aminoácido de cisteína libre" se refiere a un resto de aminoácido de cisteína que ha sido modificado genéticamente para formar un anticuerpo parental, tiene un grupo funcional tiol (-SH) y no está enlazado como un puente disulfuro intramolecular o intermolecular.

El término "valor de reactividad del tiol" es una caracterización cuantitativa de la reactividad de los aminoácidos de cisteína libres. El valor de la reactividad del tiol es el porcentaje de un aminoácido de cisteína libre de un anticuerpo modificado genéticamente con cisteína que reacciona con un agente reactivo con tiol, y se convierte en un valor máximo de 1. Por ejemplo, un aminoácido de cisteína libre de un anticuerpo modificado genéticamente con cisteína que reacciona con un rendimiento del 100 % con un agente reactivo con tiol, tal como un reactivo de biotina-maleimida, para formar un anticuerpo marcado con biotina tiene un valor de reactividad del tiol de 1,0. Otro aminoácido de cisteína modificado genéticamente para formar el mismo o diferente anticuerpo parental que reacciona con un rendimiento del 80 % con un agente reactivo con tiol tiene un valor de reactividad del tiol de 0,8. Otro aminoácido de cisteína modificado genéticamente para formar el mismo o diferente anticuerpo parental que no reacciona en absoluto con un agente reactivo con tiol tiene un valor de reactividad del tiol de 0. La determinación del valor de la reactividad del tiol de una determinada cisteína se puede realizar mediante ensayo ELISA, espectroscopia de masas, cromatografía líquida, autorradiografía u otros ensayos analíticos cuantitativos.

Un "anticuerpo parental" es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o más restos de aminoácidos están reemplazados por uno o más restos de cisteína. El anticuerpo parental puede comprender una secuencia de tipo nativo o silvestre. El anticuerpo parental puede tener modificaciones de la secuencia de aminoácidos preexistentes (tales como adiciones, eliminaciones y/o sustituciones) con respecto a otras formas modificadas, de tipo nativo o de tipo silvestre de un anticuerpo. Un anticuerpo parental se puede dirigir contra un antígeno diana de interés, por ejemplo, un polipéptido biológicamente relevante. También se contemplan los anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos glucolípidos asociados a tumores; véase el documento US 5091178).

Los anticuerpos parentales ilustrativos incluyen anticuerpos que tienen afinidad y selectividad por receptores de la superficie celular y transmembrana, y antígenos asociados a tumores (TAA).

La "presentación en fagos" es una técnica mediante la cual se muestran variantes polipeptídicas como proteínas de fusión a una proteína de la cubierta de la superficie de un fago, por ejemplo, fagos filamentosos, partículas. Una utilidad de la presentación en fagos radica en el hecho de que es posible clasificar de forma rápida y eficaz grandes bibliotecas de variantes de proteínas aleatorias para aquellas secuencias que se unen a una molécula diana con alta afinidad. La presentación de bibliotecas de péptidos y proteínas en fagos se ha usado para la selección entre millones de polipéptidos de aquellos que tienen propiedades de unión específicas. Los métodos de presentación en fagos polivalentes se han usado para la visualización de pequeños péptidos aleatorios y pequeñas proteínas, normalmente a través de fusiones bien a pIII o pVIII del fago filamentoso (Wells y Lowman, (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3: 355-362, y las referencias citadas en el mismo). En la presentación en fagos monovalentes, se fusiona una biblioteca de proteínas o péptidos a una proteína de cubierta de fago o una parte de la misma, y se expresa a niveles bajos en presencia de proteína de tipo silvestre. Los efectos de aidez se reducen con respecto al fago polivalente de modo que la clasificación se realiza basándose en la afinidad intrínseca del ligando, y se usan vectores fagémidos, que simplifican las manipulaciones del ADN. Lowman y Wells, "Methods: A companion to Methods in Enzymology", 3:205-0216 (1991). La presentación en fagos incluye técnicas de producción de moléculas de tipo anticuerpo (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) "Immunobiology", V Ed., Garland Publishing, Nueva York, pág. 627-628; Lee et al.).

Un "fagémido" es un vector plasmídico que tiene un origen de replicación bacteriano, por ejemplo, Co1E1, y una copia de una región intergénica de un bacteriófago. El fagémido se puede usar en cualquier bacteriófago conocido, incluyendo un bacteriófago filamentoso y un bacteriófago lambda. En general, el plásmido también contendrá un marcador seleccionable para la resistencia a los antibióticos. Los segmentos de ADN clonados en estos vectores se pueden propagar como plásmidos. Cuando a las células que portan estos vectores se proporcionan todos los genes necesarios para la producción de partículas de fago, el modo de replicación del plásmido cambia a la replicación de círculo rodante para generar copias de una cadena de ADN plasmídico y las partículas de fago del paquete. El fagémido puede formar partículas de fago infecciosas o no infecciosas. Este término incluye fagémidos que contienen un gen de proteína de cubierta de fago o un fragmento de la misma ligado a un gen de polipéptido heterólogo como una fusión de genes de manera que el polipéptido heterólogo se muestra en la superficie de la partícula de fago.

"Enlazador", "Unidad enlazadora" o "enlace" se refiere a un resto químico que comprende una cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo a un resto de fármaco. En diversas realizaciones, un enlazador es un radical divalente, especificado como L.

Las definiciones estereoquímicas y convenciones usadas, en general, en el presente documento son conforme a S. P. Parker, Ed., Diccionario de términos químicos de McGraw-Hill (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 la luz polarizada del plano. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S, se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula en torno a su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el sentido de giro de la luz polarizada del plano por el compuesto, significando (-) o l que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos a excepción de que son imágenes especulares entre sí. Un determinado estereoisómero también se puede denominar como un enantiómero, y una mezcla de dichos isómeros se denomina comúnmente mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o racemato, que pueden aparecer cuando no haya estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. La expresión "mezcla racémica" y el término "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, carentes de actividad óptica.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC). Las sales ilustrativas incluyen, pero sin limitación, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato de ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentsinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, benenosulfonato, *p*-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ión acetato, un ión succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que establezca la carga en el compuesto precursor. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en que varios átomos cargados forman 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.

En el presente documento, se usan las siguientes abreviaturas, y tienen las definiciones indicadas: BME es β -mercaptoetanol, Boc es *N*-(*t*-butoxicarbonilo), cit es citrulina (ácido 2-amino-5-ureido-pentanoico), 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, DMA es dimetilacetamida, DMAP es 4-dimetilaminopiridina, DME es dimetiléter de etilenglicol (o 1,2-dimetoxietano), DMF es *N,N*-dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfóxido, 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 de 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), NHS es *N*-hidroxisuccinimida, PBS es solución salina tamponada con fosfato (pH 7), PEG es polietilenglicol o una unidad de etilenglicol (-OCH₂CH₂-), Ph es fenilo, Pnp es *p*-nitrofenilo, MC es 6-maleimidocaproilo, phe es L-fenilalanina, PyBrop se hexafluorofosfato de *tris*-pirrolidinofosfonio de bromo, SEC es cromatografía de exclusión por tamaño, Su es succinimida, TFA es ácido trifluoroacético, TLC es cromatografía de capa fina, UV es ultravioleta y val es valina.

15 ANTICUERPOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE CON CISTEÍNA

Los compuestos de la invención incluyen anticuerpos modificados genéticamente con cisteína donde uno o más aminoácidos de un anticuerpo de tipo silvestre o parental se reemplazan por un aminoácido de cisteína. Cualquier forma de anticuerpo se puede modificar genéticamente de esta manera, es decir, mutar. Por ejemplo, se puede modificar genéticamente un fragmento Fab de anticuerpo parental para formar un Fab modificado genéticamente con cisteína, denominado en el presente documento "ThioFab". De manera similar, se puede modificar genéticamente un anticuerpo monoclonal parental para formar una "ThioMab". Cabe señalar que, debido a la naturaleza dimerica del anticuerpo IgG, la mutación de un solo sitio produce un solo resto de cisteína modificado genéticamente en un ThioFab, mientras que la mutación de un solo sitio produce dos restos de cisteína modificados genéticamente en un ThioMab. Los mutantes con restos de cisteína (Cys) reemplazados ("modificados genéticamente") se evalúan en cuanto a la reactividad de los grupos tiol de cisteína modificados genéticamente recién introducidos. El valor de reactividad del tiol es un término numérico relativo en el intervalo de 0 a 1,0, y se puede medir para cualquier anticuerpo modificado genéticamente con cisteína. Los valores de reactividad del tiol de los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína de la invención están en los intervalos de 0,6 a 1,0; de 0,7 a 1,0; o de 0,8 a 1,0.

Los métodos de diseño, selección y preparación de la invención permiten obtener anticuerpos modificados genéticamente con cisteína que son reactivos con funcionalidad electrófila. Estos métodos permiten además obtener compuestos de conjugados de anticuerpos tales como compuestos de conjugados de anticuerpo-circonio (AZC) con átomos de circonio en sitios selectivos, diseñados, designados. Los restos de cisteína reactivos de una superficie de anticuerpo permiten conjugar de manera específica un resto de circonio a través de un grupo reactivo del tiol tal como maleimida o haloacetilo. La reactividad nucleófila de la funcionalidad tiol de un resto de Cys hacia un grupo maleimida es aproximadamente 1.000 veces superior en comparación con cualquier otra funcionalidad de aminoácidos en una proteína, tal como un grupo amino de restos de lisina o el grupo amino N-terminal. La funcionalidad específica del tiol de reactivos de yodoacetilo y maleimida puede reaccionar con grupos amino, pero se requieren un pH más alto (> 9,0) y tiempos de reacción más prolongados (Garman, 1997, "Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach", Academic Press, Londres).

Los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína de la invención conservan preferentemente la capacidad de unión al antígeno de sus anticuerpos homólogos parentales, de tipo silvestre. Por lo tanto, los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína son capaces de unirse, preferentemente de manera específica, a antígenos. Dichos antígenos incluyen, por ejemplo, antígenos asociados a tumores (TAA), proteínas receptoras de la superficie celular y otras moléculas de la superficie celular, proteínas transmembrana, proteínas de señalización, factores de regulación de la supervivencia celular, factores de regulación de la proliferación celular, moléculas asociadas con el (por ejemplo, que se sabe o se sospecha que contribuyen funcionalmente al) desarrollo o la diferenciación tisular, linfocinas, citocinas, moléculas que participan en la regulación del ciclo celular, moléculas que participan en la vasculogénesis y moléculas asociadas con (por ejemplo, que se sabe o se sospecha que contribuyen funcionalmente a) la angiogénesis. El antígeno asociado a un tumor puede ser un factor de diferenciación de agrupaciones (es decir, una proteína CD). Un antígeno al que se puede unir un anticuerpo modificado genéticamente con cisteína puede ser un miembro de un subconjunto de una de las categorías mencionadas anteriormente, comprendiendo el otro/s subconjunto/s de dicha categoría otras moléculas/antígenos que tienen una característica distinta (con respecto al antígeno de interés).

El anticuerpo parental también puede ser un anticuerpo humanizado seleccionado entre huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 (Trastuzumab, HERCEPTIN[®]) como se describe en la Tabla 3 del documento US 5821337; 520C9 humanizado (documento WO 93/21319) y anticuerpos 2C4 humanizados como los descritos en el presente documento.

Los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína de la invención se pueden acoplar de manera específica del sitio y eficazmente con un agente reactivo con tiol. El agente reactivo con tiol puede ser un reactivo enlazador multifuncional, un reactivo marcador de captura, es decir, de afinidad (por ejemplo, un reactivo enlazador de biotina),

un marcador de detección (por ejemplo, un reactivo fluoróforo), un reactivo de inmovilización en fase sólida (por ejemplo, SEPHAROSE™, poliestireno o vidrio) o un enlazador intermedio de circonio. Un ejemplo de un agente reactivo con tiol es la N-etil-maleimida (NEM). En una realización ilustrativa, la reacción de un ThioFab con un reactivo enlazador de biotina proporciona un ThioFab biotinilado mediante el que se pueden detectar y medir la presencia y la reactividad del resto de cisteína modificado genéticamente. La reacción de un ThioFab con un reactivo enlazador multifuncional proporciona un ThioFab con un enlazador funcionalizado que puede hacerse reaccionar además con un reactivo de resto de circonio u otro marcador. La reacción de un ThioFab con un enlazador intermedio de circonio proporciona un conjugado de ThioFab-circonio.

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

Dicha metodología se puede aplicar a la conjugación de otros agentes reactivos con tiol en los que el grupo reactivo es, por ejemplo, una maleimida, una yodoacetamida, un disulfuro de piridilo u otra pareja de conjugación reactiva con tiol (Haugland, 2003, "Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals", Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, 1997, "Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach", Academic Press, Londres; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Hermanson, G. en "Bioconjugate Techniques" (1996) Academic Press, San Diego, pág. 40-55, 643-671). La pareja puede ser un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina tal como doxorubicina o la toxina pertussis), un fluoróforo tal como un colorante fluorescente como la fluoresceína o la rodamina, un agente quelante para un metal de formación de imágenes o radioterapéutico, un marcador o etiqueta de detección de peptidilo o no peptidilo, o un agente modificador del aclaramiento tal como diversos isómeros de polietilenglicol, un péptido que se une a un tercer componente, u otro hidrato de carbono o agente lipófilo.

Los sitios identificados en el fragmento de anticuerpo ilustrativo, hu4D5Fabv8, del presente documento se encuentran principalmente en el dominio constante de un anticuerpo que se conserva bien a través de todas las especies de anticuerpos. Estos sitios deben ser ampliamente aplicables a otros anticuerpos, sin mayor necesidad de diseño estructural o conocimiento de las estructuras de determinados anticuerpos, y sin interferencias en las propiedades de unión al antígeno inherentes a los dominios variables del anticuerpo.

Los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína que pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer incluyen, pero sin limitación, anticuerpos contra receptores de superficie celular y antígenos asociados a tumores (TAA). Dichos anticuerpos se pueden usar como anticuerpos desnudos (no conjugados a un resto marcador) o como conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de Fórmula I. Los 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. En los intentos por descubrir dianas celulares eficaces para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer, los investigadores han buscado identificar polipéptidos transmembrana u otros polipéptidos asociados a tumores que se expresan específicamente en la superficie de uno o más determinados tipos de células cancerosas en comparación con una o más células normales no cancerosas. A menudo, dichos polipéptidos asociados a tumores se expresan de manera más abundante en la superficie de las células cancerosas en comparación con la superficie de las células no cancerosas. La identificación de dichos antígenos polipeptídicos de la superficie celular asociados a tumores ha permitido dirigirse específicamente a las células cancerosas para destruirlas a través de terapias a base de anticuerpos.

Los ejemplos de antígenos asociados a tumores TAA incluyen, pero sin limitación, los TAA (1)-(51) que se enumeran a continuación. Por conveniencia, a continuación, se presenta la información relativa a estos antígenos, todos ellos conocidos en la técnica, e incluye las denominaciones, las denominaciones alternativas, los números de acceso en GenBank y la/s referencia/s principal/es, siguiendo las convenciones de identificación de secuencias de proteínas y ácidos nucleicos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas correspondientes a los TAA (1)-(51) están disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank. Los antígenos asociados a tumores dirigidos por anticuerpos incluyen todas las variantes e isoformas de secuencias de aminoácidos que poseen al menos aproximadamente el 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con respecto a las secuencias identificadas en las referencias citadas, o que presentan sustancialmente las mismas propiedades o características biológicas que un TAA que tiene una secuencia encontrada en las referencias citadas. Por ejemplo, un TAA que tiene una variante de secuencia, en general, es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo que se une específicamente al TAA con la secuencia correspondiente de la lista.

ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMORES (1)-(51):

(1) BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB, N° 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); documento US2003134790-A1 (pág. 38-39); documento WO2002102235 (Reivindicación 13; pág. 296); documento WO2003055443 (pág. 91-92); documento WO200299122 (Ejemplo 2; pág. 528-530); documento WO2003029421 (Reivindicación 6); documento WO2003024392 (Reivindicación 2; Fig. 112); documento

- WO200298358 (Reivindicación 1; pág. 183); documento WO200254940 (pág. 100-101); documento WO200259377 (pág. 349-350); documento WO200230268 (Reivindicación 27; pág. 376); documento WO200148204 (Ejemplo; Fig. 4)
 NP_001194 Receptor de proteína morfogenética ósea, tipo IB /pid=NP_001194.1 -
 5 Referencias cruzadas: MIM:603248; NP_001194.1; AY065994.
- (2) E16 (LAT1, SLC7A5, N° 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
 10 WO2004032842 (Ejemplo IV); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento WO2003016475
 (Reivindicación 1); documento WO200278524 (Ejemplo 2); documento WO200299074 (Reivindicación 19; pág.
 127-129); documento WO200286443 (Reivindicación 27; pág. 222, 393); documento WO2003003906
 (Reivindicación 10; pág. 293); documento WO200264798 (Reivindicación 33; pág. 93-95); documento
 15 WO200014228 (Reivindicación 5; pág. 133-136); documento US2003224454 (Fig. 3); documento
 WO2003025138 (Reivindicación 12; pág. 150);
 Familia de portadores de solutos NP_003477.7 (transportador de aminoácidos catiónicos, sistema y⁺), miembro 5
 /pid=NP_003477.3 - *Homo sapiens*
 Referencias cruzadas: MIM:600182; NP_003477.3; NM_015923; NMR_003486_1.
- (3) STEAP1 (seis antígenos epiteliales transmembrana de la próstata, N° de acceso en Genbank NM_012449)
Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R. S., et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 96 (25):14523-
 14528; documento WO2004065577 (Reivindicación 6); documento WO2004027049 (Fig. 1L); documento
 EP1394274 (Ejemplo 11); documento WO2004016225 (Reivindicación 2); documento WO2003042661
 (Reivindicación 12); documento US2003157089 (Ejemplo 5); documento US2003185830 (Ejemplo 5); documento
 20 US2003064397 (Fig. 2); documento WO200289747 (Ejemplo 5; pág. 618-619); documento WO2003022995
 (Ejemplo 9; Fig. 13A, Ejemplo 53; pág. 173, Ejemplo 2; Fig. 2A);
 NP_036581 seis antígenos epiteliales transmembrana de la próstata
 Referencias cruzadas: MIM:604415; NP_036581.1; NM_012449_1.
- (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; pág. 116-121);
 documento US2003124140 (Ejemplo 16); Referencias cruzadas: GI:34501467; AAK74120.3; AF361486_1.
- (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador 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. EE.UU. 96 (20):11531-11536 (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93 (1):136-140 (1996), *J. Biol.*
Chem. 270(37):21984-21990 (1995); documento WO2003101283 (Reivindicación 14); (documento
 WO2002102235 (Reivindicación 13; pág. 287-288); documento WO2002101075 (Reivindicación 4; pág. 308-
 309); documento WO200271928 (pág. 320-321); documento WO9410312 (pág. 52-57);
 35 Referencias cruzadas: MIM:601051; NP_005814.2; NM_005823_1.
- (6) Napi3b (NAPI-3B, NPT1b, SLC34A2, familia de portadores de soluto 34 (fosfato sódico), miembro 2,
 transportador 3b de fosfato dependiente del sodio de tipo II, 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; pág. 326); documento EP875569
 (Reivindicación 1; pág. 17-19); documento WO200157188 (Reivindicación 20; pág. 329); documento
 WO2004032842 (Ejemplo IV); documento WO200175177 (Reivindicación 24; pág. 139-140);
 40 Referencias cruzadas: MIM:604217; NP_006415.1; NMR_006424_1.
- (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete
 repeticiones de trombospondina (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; pág. 50); documento
 WO200188133 (Reivindicación 1; pág. 41-43, 48-58); documento WO2003054152 (Reivindicación 20);
 documento WO2003101400 (Reivindicación 11);
 Acceso: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC:10737.
- (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN ADNc 2700050C12, gen RIKEN ADNc 2700050C12, N°
 de acceso en Genbank AY358628); Ross et al. (2002) *Cancer Res* 62:2546-2553; documento US2003129192
 (Reivindicación 2); documento US2004044180 (Reivindicación 12); documento US2004044179 (Reivindicación
 11); documento US2003096961 (Reivindicación 11); documento US2003232056 (Ejemplo 5); documento
 55 WO2003105758 (Reivindicación 12); documento US2003206918 (Ejemplo 5); documento EP1347046
 (Reivindicación 1); documento WO2003025148 (Reivindicación 20);

Referencias cruzadas: GI:37182378; AAQ88991.1; AY358628_1.

- (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. EE.UU.* 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. 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. 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; pág. 144); documento WO200198351 (Reivindicación 1; pág. 124-125); documento EP522868 (Reivindicación 8; Fig. 2); documento WO200177172 (Reivindicación 1; pág. 297-299); documento US2003109676; documento US6518404 (Fig. 3); documento US5773223 (Reivindicación 1a; Col 31-34); documento WO2004001004.
- (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; pág. 61); documento WO2003018621 (Reivindicación 1); documento WO2003024392 (Reivindicación 2; Fig. 93); documento WO200166689 (Ejemplo 6); Referencias cruzadas: LocusID:54894; NP_060233.2; NMR_017763_1.
- (11) STEAP2 (HGNC 8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, seis antígenos epiteliales transmembrana de próstata 2, seis proteínas de próstata 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; pág. 54-55); documento WO200172962 (Reivindicación 1; Fig. 4B); documento WO2003104270 (Reivindicación 11); documento WO2003104270 (Reivindicación 16); documento US2004005598 (Reivindicación 22); documento WO2003042661 (Reivindicación 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.
- (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4, N° de acceso en Genbank NM_017636) Xu, X. Z., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 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; pág. 100-103); documento WO200210382 (Reivindicación 1; Fig. 9A); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento WO200230268 (Reivindicación 27; pág. 391); documento US2003219806 (Reivindicación 4); documento WO200162794 (Reivindicación 14; Fig. 1A-D); Referencias cruzadas: MIM:606936; NP_060106.2; NM_017636_1.
- (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, N° de acceso en Genbank 10 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 WO200288170 (Reivindicación 2; pág. 52-53); documento WO2003024392 (Reivindicación 2; Fig. 58); documento WO200216413 (Reivindicación 1; pág. 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; NMR_003212_1.
- (14) CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del 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. EE.UU.* 84, 9194-9198, 1987; Barel M., et al., *Mol. Immunol.* 35, 1025-1031, 1998; Weis J. J., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 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.

5 (15) CD79b (CD79B, CD79 β , Igb (β asociado a inmunoglobulina), B29, N^o de acceso en Genbank NM_000626 o 11038674)
Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (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, pág. 102); documento WO2003062401 (Reivindicación 9); documento WO200278524 (Ejemplo 2); documento US2002150573 (Reivindicación 5, pág. 15); documento US5644033; documento WO2003048202 (Reivindicación 1, pág. 306 y 309); documento WO 99/558658, documento US6534482 (Reivindicación 13, Fig 17A/B); documento WO200055351 (Reivindicación 11, pág. 1145-1146);
 Referencias cruzadas: MIM:147245; NP_000617.1; NMR_000626_1.

15 (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a de anclaje de fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C, N^o de acceso en Genbank NM_030764, AY358130)
Genome Res. 13 (10):2265-2270 (2003), *Immunogenetics* 54 (2):87-95 (2002), *Blood* 99 (8):2662-2669 (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 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.

25 (17) HER2 (ErbB2, N^o 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. EE.UU.* 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; pág. 95-107); documento WO200212341 (Reivindicación 68; Fig 7); documento WO200213847 (pág. 71-74); documento WO200214503 (pág. 114-117); documento WO200153463 (Reivindicación 2; pág. 41-46); documento WO200141787 (pág. 15); documento WO200044899 (Reivindicación 52; Fig 7); documento WO200020579 (Reivindicación 3; Fig 2); documento US5869445 (Reivindicación 3; Col 31-38); documento WO9630514 (Reivindicación 2; pág. 56-61); documento 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.

40 (18) NCA (CEACAM6, N^o 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. EE.UU.* 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; pág. 427); documento WO200260317 (Reivindicación 2); Acceso: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728;

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

55 (20) IL20R α (IL20Ra, ZCYTOR7, N^o 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 (pág. 74-75); documento WO2003002717 (Reivindicación 2; pág. 63); documento WO200222153 (pág. 45-47); documento US2002042366 (pág. 20-21); documento WO200146261 (pág. 57-59); documento WO200146232 (pág. 63-65); documento WO9837193 (Reivindicación 1; pág. 55-59); Acceso: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

65 (21) Brevican (BCAN, BEHAB, N^o 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. EE.UU.* 99, 16899-16903, 2002; documento US2003186372 (Reivindicación 11); documento US2003186373 (Reivindicación 11); documento US2003119131 (Reivindicación 1; Fig 52); documento US2003119122 (Reivindicación 1; Fig 52); documento US2003119126 (Reivindicación 1); documento US2003119121 (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);
- (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; pág. 41); documento WO2004065576 (Reivindicación 1); documento WO2004020583 (Reivindicación 9); documento WO2003004529 (pág. 128-132); documento WO200053216 (Reivindicación 1; pág. 42);
- Referencias cruzadas: MIM:600997; NP_004433.2; NMR_004442_1.
- (23) ASLG659 (B7h, N° de acceso en Genbank AX092328) documento US20040101899 (Reivindicación 2); documento WO2003104399 (Reivindicación 11); documento WO2004000221 (Fig 3); documento US2003165504 (Reivindicación 1); documento US2003124140 (Ejemplo 2); documento US2003065143 (Fig 60); documento WO2002102235 (Reivindicación 13; pág. 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 US2002034749 (Reivindicación 54; pág. 45-46); documento WO200206317 (Ejemplo 2; pág. 320-321, Reivindicación 34; pág. 321-322); documento WO200271928 (pág. 468-469); documento WO200202587 (Ejemplo 1; Fig 1); documento WO200140269 (Ejemplo 3; pág. 190-192); documento WO200036107 (Ejemplo 2; pág. 205-207); documento WO2004053079 (Reivindicación 12); documento WO2003004989 (Reivindicación 1); documento WO200271928 (pág. 233-234, 452-453); documento WO 0116318;
- (24) PSCA (precursor del antígeno de células madre prostáticas, N° de acceso en Genbank AJ297436) Reiter R. E., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., et al., *Oncogene* 19, 1288-1296, 2000; *Biochem. 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; pág. 164); documento WO2003003906 (Reivindicación 10; pág. 288); documento WO200140309 (Ejemplo 1; Fig 17); documento US2001055751 (Ejemplo 1; Fig 1b); documento WO200032752 (Reivindicación 18; Fig 1); documento WO9851805 (Reivindicación 17; pág. 97); documento WO9851824 (Reivindicación 10; pág. 94); documento WO9840403 (Reivindicación 2; Fig 1B); Acceso: 043653; EMBL; AF043498; AAC39607.1.
- (25) GEDA (N° de acceso en Genbank AY260763); Proteína de tipo pareja de fusión de HMGIC de lipoma AAP14954/pid=AAP14954.1 - Especie de *Homo sapiens: Homo sapiens* (ser 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
- (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, receptor BLyS 3, BR3, N° de acceso en Genbank AF116456); receptor BAFF/pid=NP_443177.1 - *Homo sapiens*: Thompson, J. S., et al., *Science* 293 (5537), 2108-2111 (2001); documento WO2004058309; documento WO2004011611; documento WO2003045422 (Ejemplo; pág. 32-33); documento WO2003014294 (Reivindicación 35; Fig 6B); documento WO2003035846 (Reivindicación 70; pág. 615-616); documento WO200294852 (Col 136-137); documento WO200238766 (Reivindicación 3; pág. 133); documento WO200224909 (Ejemplo 3; Fig 3); Referencias cruzadas: MIM:606269; NP_443177.1; NM_052945_1; AF132600.
- (27) CD22 (receptor CD22 de linfocitos B, isoforma B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, N° de acceso en Genbank AK026467); Wilson et al. (1991) *J. Exp. Med.* 173:137-146; documento WO2003072036 (Reivindicación 1; Fig 1); Referencias cruzadas: MIM:107266; NP_001762.1; NM_001771_1.
- (28) CD79a (CD79A, CD79 α , α asociada con inmunoglobulina, una proteína específica de los linfocitos B que interacciona covalentemente con Ig β (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie con moléculas de IgM, transduce una señal implicada en la diferenciación de los linfocitos B), pl: 4.84, PM: 25028 TM: 2 [P] Cromosoma génico: 19q13.2, N° de acceso en Genbank NP_001774.10) documento WO2003088808, documento US20030228319; documento WO2003062401 (Reivindicación 9); documento US2002150573 (Reivindicación 4, pág. 13-14); documento WO9958658 (Reivindicación 13, Fig 16); 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 et 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; 20

- 5 (29) CXCR5 (receptor 1 del linfoma de Burkitt, un receptor acoplado a proteína G que es activado por la quimiocina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y la defensa humoral, desempeña un papel en la infección por VIH-2 y quizás en el desarrollo del SIDA, linfoma, mieloma y leucemia) 372 aa, pl: 8.54 PM: 41959 TM: 7 [P] Cromosoma génico: 11q23.3, Nº 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, pág. 269); documento WO200172830 (pág. 12-13); documento WO200022129 (Ejemplo 1, pág. 152-153, Ejemplo 2, pág. 254-256); documento WO9928468 (Reivindicación 1, pág. 38); US5440021 (Ejemplo 2, col 49-52); WO9428931 (pág. 56-58); WO9217497 (Reivindicación 7, Fig 5); Dobner et al. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:2795-2799; Barella et al. (1995) *Biochem. J.* 309:773-779;
- 10
- 15 (30) HLA-DOB (subunidad β de la molécula de clase II del MHC (antígeno Ia) que se une a los péptidos y los presenta a los linfocitos T CD4+); 273 aa, pl: 6.56 PM: 30820 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 6p21.3, Nº 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 EE.UU.* 99:16899-16903; Serenius 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;
- 20
- 25 (31) P2X5 (canal iónico 5 dependiente de ligando P2X del receptor purinérgico, un canal iónico dependiente de ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión sináptica y la neurogénesis, la deficiencia puede contribuir a la fisiopatología de la inestabilidad idiopática del detrusor); 422 aa, pl: 7.63, PM: 47206 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 17p13.3, Nº 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; WO200222660 (Reivindicación 20); documento WO2003093444 (Reivindicación 1); documento WO2003087768 (Reivindicación 1); documento WO2003029277 (pág. 82);
- 30
- (32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de las linfocitos B, Lyb-2) SECUENCIA PROTEICA Full maeaiity...tafrfpd (1..359; 359 aa), pl: 8.66, PM: 40225 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 9p13.3, Nº de acceso en Genbank NP_001773.1) documento WO2004042346 (Reivindicación 65); documento WO2003026493 (pág. 51-52, 57-58); documento WO200075655 (pág. 105-106); Von Hoegen et al. (1990) *J. Immunol.* 144(12):4870-4877; Strausberg et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci EE.UU.* 99:16899-16903;
- 35
- 40 (33) LY64 (antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repeticiones ricas en leucina (LRR), regula la activación y apoptosis de linfocitos B, la pérdida de función está asociada con un aumento de la actividad de la enfermedad en pacientes con lupus eritematoso sistémico); 661 aa, pl: 6.20, PM: 74147 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 5q12, Nº de acceso en Genbank. NP_005573.1) documento US2002193567; documento WO9707198 (Reivindicación 11, pág. 39-42); Miura et al. (1996) *Genomics* 38(3):299-304; Miura et al. (1998) *Blood* 92:2815-2822; documento WO2003083047; documento WO9744452 (Reivindicación 8, pág. 57-61); documento WO200012130 (pág. 24-26);
- 45
- (34) FcRH1 (proteína 1 de tipo receptor de Fc, un 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 los linfocitos B)); 429 aa, pl: 5.28, PM: 46925 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 1q21-1q22, Nº 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 EE.UU.*, 98(17):9772-9777; documento WO2003089624 (Reivindicación 8); documento EP1347046 (Reivindicación 1); documento WO2003089624 (Reivindicación 7);
- 50
- 55 (35) IRTA2 (FcRH5, Translocación asociada al receptor 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas, un supuesto inmunoreceptor con posibles papeles en el desarrollo y la linfomagénesis de los linfocitos B; la desregulación de los genes por translocación se produce en algunas neoplasias malignas de linfocitos B); 977 aa, pl: 6.88 PM: 106468 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 1q21, Nº de acceso en Genbank: ser humano: AF343662, AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; Ratón: AK089756, AY158090, AY506558; 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);
- 60
- 65

- (36) TENB2 (TMEFF2, tomorregulina, TPEF, HPP1, TR, supuesto proteoglucono transmembrana, relacionado con la familia de EGF/herregulina de factores de crecimiento y folistatina); 374 aa, Acceso en NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; Gen en NCBI: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; N° de acceso en Genbank AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436
- 5 documento WO2004074320 (SEC ID N° 810); documento JP2004113151 (SEC ID N° 2, 4, 8); documento WO2003042661 (SEC ID N° 580); documento WO2003009814 (SEC ID N° 411); documento EP1295944 (pág. 69-70); documento WO200230268 (pág. 329); documento WO200190304 (SEC ID N° 2706); documento US2004249130; documento US2004022727; documento WO2004063355; documento US2004197325; documento US2003232350; documento US2004005563; documento US2003124579; Horie et al. (2000)
- 10 *Genomics* 67:146-152; Uchida et al. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:593-602; Liang et al. (2000) *Cancer Res.* 60:4907-12; Glynne-Jones et al. (2001) *Int J Cancer.* 15 de octubre; 94(2):178-84;
- (37) PMEL17 (homólogo de plata; SILV; D12S53E; PMEL17; (SI); (SIL); ME20; gp100) BC001414; BT007202; M32295; M77348; NM_006928; McGlinchey, R. P. et al. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 106 (33), 13731-13736; Kummer, M. P. et al. (2009) *J. Biol. Chem.* 284 (4), 2296-2306;
- 15 (38) TMEFF1 (proteína transmembrana con dominios de tipo EGF y dos dominios de tipo folistatina 1; Tomorregulina-1; H7365; C9orf2; C9ORF2; U19878; X83961) NM_080655; NM_003692; Harms, P. W. (2003) *Genes Dev.* 17 (21), 2624-2629; Gery, S. et al. (2003) *Oncogene* 22 (18):2723-2727;
- 20 (39) GDNF-Ra1 (receptor α 1 de la familia GDNF; GFRA1; GDNFR; GDNFRA; RETL1; TRNR1; RET1L; GDNFR- α 1; GFR-ALPHA-1; U95847; BC014962; NM_145793) NM_005264; Kim, M. H. et al. (2009) *Mol. Cell. Biol.* 29 (8), 2264-2277; Treanor, J. J. et al. (1996) *Nature* 382 (6586):80-83;
- 25 (40) Ly6E (complejo de antígenos de linfocitos 6, locus E; Ly67,RIG-E,SCA-2,TSA-1) NP_002337.1; NM_002346.2; de Nooij-van Dalen, A. G. et al. (2003) *Int. J. Cancer* 103 (6), 768-774; Zammit, D. J. et al. (2002) *Mol. Cell. Biol.* 22(3):946-952;
- 30 (41) TMEM46 (homólogo de shisa 2 (*Xenopus laevis*); SHISA2) NP_001007539.1; NM_001007538.1; Furushima, K. et al. (2007) *Dev. Biol.* 306 (2), 480-492; Clark, H. F. et al. (2003) *Genome Res.* 13 (10):2265-2270;
- (42) Ly6G6D (complejo de antígenos de linfocitos 6, locus G6D; Ly6-D, MEGT1) NP_067079.2; NM_021246.2; Mallya, M. et al. (2002) *Genomics* 80 (1):113-123; Ribas, G. et al. (1999) *J. Immunol.* 163 (1):278-287;
- 35 (43) LGR5 (receptor 5 acoplado a la proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina; GPR49, GPR67) NP_003658.1; NM_003667.2; Salanti, G. et al. (2009) *Am. J. Epidemiol.* 170 (5):537-545; Yamamoto, Y. et al. (2003) "Hepatology" 37 (3):528-533;
- 40 (44) RET (proto-oncogén ret; MEN2A; HSCR1; MEN2B; MTC1; (PTC); CDHF12; Hs.168114; RET51; RET-ELE1) NP_066124.1; NM_020975.4; Tsukamoto, H. et al. (2009) *Cancer Sci.* 100 (10):1895-1901; Narita, N. et al. (2009) "Oncogene" 28 (34):3058-3068;
- 45 (45) LY6K (complejo de antígenos de linfocitos 6, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226) NP_059997.3; NM_017527.3; Ishikawa, N. et al. (2007) *Cancer Res.* 67 (24):11601-11611; de Nooij-van Dalen, A. G. et al. (2003) *Int. J. Cancer* 103 (6):768-774;
- (46) GPR19 (receptor 19 acoplado a la proteína G; Mm.4787) NP_006134.1; NM_006143.2; Montpetit, A. y Sinnott, D. (1999) *Hum. Genet.* 105 (1-2):162-164; O'Dowd, B. F. et al. (1996) *FEBS Lett.* 394 (3):325-329;
- 50 (47) GPR54 (receptor KISS1; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR12) NP_115940.2; NM_032551.4; Navenot, J. M. et al. (2009) *Mol. Pharmacol.* 75 (6):1300-1306; Hata, K. et al. (2009) *Anticancer Res.* 29 (2):617-623;
- (48) ASPHD1 (dominio 1 que contiene la aspartato β -hidroxilasa; LOC253982) NP_859069.2; NM_181718.3; Gerhard, D. S. et al. (2004) *Genome Res.* 14 (10B):2121-2127;
- 55 (49) Tirosinasa (TYR; OCA1A; OCA1A; tirosinasa; SHEP3) NP_000363. 1; NM_000372.4; Bishop, D. T. et al. (2009) *Nat. Genet.* 41 (8):920-925; Nan, H. et al. (2009) *Int. J. Cancer* 125 (4):909-917;
- (50) TMEM118 (proteína de dedo anular, transmembrana 2; RNFT2; FLJ14627) NP_001103373.1; NM_001109903.1; Clark, H. F. et al. (2003) *Genome Res.* 13 (10):2265-2270; Scherer, S. E. et al. (2006) *Nature* 440 (7082):346-351
- 60 (51) GPR172A (receptor 172A acoplado a la proteína G; GPCR41; FLJ11856; D15Erd747e) NP_078807.1; NM_024531.3; Ericsson, T. A. et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 100 (11):6759-6764; Takeda, S. et al. (2002) *FEBS Lett.* 520 (1-3):97-101.
- 65

El anticuerpo parental también puede ser una proteína de fusión que comprende una secuencia de péptido de unión a la albúmina (ABP) (Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" *J Biol Chem.* 277:35035-35043; documento WO 01/45746). Los anticuerpos de la invención incluyen proteínas de fusión con secuencias de ABP enseñadas por: (i) Dennis et al. (2002) *J Biol Chem.* 277:35035-35043 en las Tablas III y IV, pág. 35038; (ii) documento US 20040001827 en el párrafo [0076]; y (iii) documento WO 01/45746 en las pág. 12-13.

Para preparar un anticuerpo modificado genéticamente con cisteína por mutagénesis, se prepara el ADN que codifica una variante de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de partida mediante varios métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, la preparación por mutagénesis dirigida (o mediada por oligonucleótidos), la mutagénesis por PCR y la mutagénesis de casete de un DNA preparado anteriormente que codifique el polipéptido. También se pueden construir variantes de anticuerpos recombinantes mediante la manipulación de fragmentos de restricción o por PCR de extensión de solapamiento con oligonucleótidos sintéticos. Los cebadores mutagénicos codifican una o varias sustituciones de codones de cisteína. Se pueden emplear técnicas de mutagénesis convencionales para generar ADN que codifique dichos anticuerpos mutantes modificados genéticamente con cisteína. En Sambrook et al. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; y Ausubel et al. "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, N. Y., 1993, se pueden encontrar las directrices generales.

La mutagénesis dirigida es un método de preparación de variantes de sustitución, es decir, de proteínas mutantes (Carter (1985) et al. *Nucleic Acids Res.* 13:4431-4443; Ho et al. (1989) *Gene (Amst.)* 77:51-59; y Kunkel et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82:488). El ADN de partida se altera primero mediante la hibridación de un oligonucleótido que codifique la mutación deseada con una sola hebra de dicho ADN de partida. Después de la hibridación, se usa una ADN polimerasa para sintetizar una segunda hebra, usando el oligonucleótido hibridado como cebador, y usando la cadena sencilla del ADN de partida como molde. Así pues, el oligonucleótido que codifica la mutación deseada se incorpora al ADN de doble cadena resultante. La mutagénesis dirigida se puede llevar a cabo dentro del gen que exprese la proteína que se vaya a someter a mutagénesis en un plásmido de expresión, y se puede secuenciar el plásmido resultante para confirmar la introducción de las mutaciones de sustitución de cisteínas deseadas (Liu et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 20252-20260). Los protocolos y los formatos de mutagénesis dirigida se pueden obtener fácilmente, por ejemplo, el kit de mutagénesis multidirigida QuikChange® (Stratagene, La Jolla, CA).

La mutagénesis por PCR también es adecuada para preparar variantes de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de partida. Véase Higuchi, (1990) en "PCR Protocols", pág.177-183, Academic Press; Ito et al. (1991) *Gene* 102:67-70; Bernhard et al. (1994) *Bioconjugate Chem.*, 5:126-132; y Vallette et al. (1989) *Nuc. Acids Res.*, 17:723-733. En resumen, cuando se usan pequeñas cantidades de ADN de molde como material de partida en una PCR, se pueden usar cebadores que difieran ligeramente en la secuencia de la región correspondiente de un ADN de molde para generar cantidades relativamente altas de un fragmento de ADN específico que difiera de la secuencia molde solo en las posiciones donde los cebadores difieren del molde.

Otro método de preparación de variantes, la mutagénesis de casete, se basa en la técnica descrita por Wells et al. (1985) *Gene*, 34: 315-323. El material de partida es el plásmido (u otro vector) que comprende el ADN del polipéptido de partida que se desea mutar. Se identifican el/los codón/es del ADN de partida que se va a mutar. Debe haber un único sitio de endonucleasa de restricción a cada lado del/de los sitio/s de mutación identificado/s. Si no existen dichos sitios de restricción, se pueden generar usando el método de mutagénesis mediada por oligonucleótidos descrito anteriormente para introducirlos en ubicaciones adecuadas del ADN del polipéptido de partida. El ADN del plásmido se corta en estos sitios para linealizarlo. Se sintetiza un oligonucleótido de doble cadena que codifique la secuencia de ADN entre los sitios de restricción, pero que contenga la/s mutación/es deseada/s, usando procedimientos convencionales, en los que las dos hebras del oligonucleótido se sintetizan por separado y luego se hibridan entre sí usando técnicas convencionales. Este oligonucleótido de doble cadena se conoce como casete. Este casete se diseña para que tenga extremos 5' y 3' que sean compatibles con los extremos del plásmido linealizado, de modo que pueda ligarse directamente al plásmido. Este plásmido contiene ahora la secuencia de ADN mutada. El ADN mutante que contiene las sustituciones de cisteína codificadas se puede confirmar por secuenciación del ADN.

También se generan mutaciones individuales por mutagénesis dirigida a oligonucleótidos usando ADN de plásmido de doble cadena como molde mediante mutagénesis basada en PCR (Sambrook y Russel, (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", III Edición; Zoller et al. (1983) *Methods Enzymol.* 100:468-500; Zoller, M. J. y Smith, M. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10:6487-6500).

MODIFICACIÓN GENÉTICA Y REACTIVIDAD DEL TIOL DE LOS THIOFAB ANTI-HER2 4D5

Se introdujo cisteína en cada posición de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo de fragmento Fab hu4D5Fabv8 anti-HER2 (documento US 5821337; Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89:4285-4289). Los 440 mutantes de cadena pesada y mutantes de cadena ligera se prepararon de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Se midió la reactividad del tior según el ensayo PHESELECTOR. Las secuencias de cadena

pesada están numeradas por el sistema de numeración secuencial. Las secuencias de cadena ligera siguen el sistema de numeración de Kabat. En la cadena ligera, tanto la numeración de Kabat como la numeración secuencial indican los mismos números.

5 Se seleccionaron los mutantes hu4D5Fabv8 de cadena pesada con unión eficaz a la proteína receptora HER2 y con reactividad del tiol con el reactivo de biotilación, biotina-PEO-maleimida (documento US 7521541). Ciertos mutantes de cadena pesada tenían una unión limitada o comprometida con ECD de HER2, porque es un resto importante para la unión al antígeno (HER2), situado en las CDR de la región variable del Fab del anticuerpo. Algunos de los restos ubicados en el dominio constante de los Fab también dieron lugar a una baja unión a HER2
10 debido a que estos restos pueden contribuir a la estructura y al plegamiento de Fab, dando lugar así a una baja presentación del Fab de 4D5 en el fago M13 (Junutula, J. R. et al. (2008) *J. Immunol Methods*, 332: 41-52). Los mutantes hu4D5Fabv8 de cadena pesada con una baja unión a ECD de HER2 incluían mutaciones de cisteína en las posiciones 1, 21, 31, 33-36, 38, 48-50, 59, 87, 95, 101, 104, 129, 131, 132, 136, 153, 155, 159, 166, 169, 170, 172, 197, 198, 202, 215, 219. Se midieron las variantes de cisteína de tipo silvestre 22, 96, 147, 203, 223. Otros mutantes de cadena pesada tuvieron reactividad limitada del tiol con el reactivo de biotilación.
15

El aminoácido de cisteína libre A121C introducido por los métodos de modificación genéticamente de cisteínas descritos en el presente documento y SEC ID N° 32 es designado por el sistema de numeración secuencial. Este resto del comienzo del dominio constante también es A118C, designado por el sistema de numeración de la UE, o A114C por el sistema de Kabat. Los mutantes como los conjugados en los conjugados de anticuerpo-fármaco descritos en el presente documento (Figuras 5a y 5b, Tabla 3, y Ejemplo 6) usan el sistema de la UE A118C para la designación de los anticuerpos que comprenden SEC ID N° 32.
20

El resto de aminoácido de cisteína libre está en el centro con restos flanqueantes en las secuencias de la columna central de la Tabla 1. El aminoácido sustituido y la posición de la cadena pesada se designan en la columna izquierda. Los mutantes hu4D5Fabv8 de cadena pesada de SEC ID N° 1-49 de la Tabla 1 tienen unión a HER2 conservada y valores de reactividad del tiol de aproximadamente 0,8 o superiores, con exclusión de las variantes de cisteína de tipo silvestre. Los anticuerpos con SEC ID N° 1-49 (Tabla 1) han demostrado reactividad del tiol y pueden ser útiles para formar enlaces covalentes con un marcador de captura, un marcador de detección, un resto de fármaco o un soporte sólido. Los mutantes de cadena pesada de la Tabla 1 se pueden conjugar como ThioFab o ThioMab, por ejemplo, en forma de conjugados de anticuerpo-fármaco.
25
30

Tabla 1: Unión eficaz, mutantes hu4D5Fabv8 de cadena pesada reactivos de tiol

HC-L4C	EVQCVESGG	SEC ID N°: 1
HC-G8C	QLVESCGLVQ	SEC ID N°: 2
HC-G10C	VESGGCLVQPG	SEC ID N°: 3
HC-L20C	GGSLRCSAAS	SEC ID N°: 4
HC-A23C	LRLSCCASGFN	SEC ID N°: 5
HC-G26C	SCAASC FN IKD	SEC ID N°: 6
HC-F27C	CAASGCNIKDT	SEC ID N°: 7
HC-T32C	FNIKDCYIHWV	SEC ID N°: 8
HC-Q39C	IHWVRCAPGKG	SEC ID N°: 9
HC-P41C	WVRQACGKGLE	SEC ID N°: 10
HC-K43C	RQAPGCGLEWV	SEC ID N°: 11
HC-G44C	QAPGKCLEWVA	SEC ID N°: 12
HC-W47C	GKGLECVARIY	SEC ID N°: 13
HC-S63C	TRYADCVKGRF	SEC ID N°: 14
HC-F68C	SVKGRCTISAD	SEC ID N°: 15
HC-D73C	FTISACTSKNT	SEC ID N°: 16
HC-K76C	SADTSCNTAYL	SEC ID N°: 17
HC-T78C	DTSKNCAYLQM	SEC ID N°: 18
HC-Y80C	SKNTACLQMNS	SEC ID N°: 19
HC-L81C	KNTAYCQMNSL	SEC ID N°: 20
HC-Q82C	NTAYLCMNSLR	SEC ID N°: 21
HC-L86C	LQMNSCRAEDT	SEC ID N°: 22
HC-A88C	MNSLRCEDTAV	SEC ID N°: 23
HC-D90C	SLRAECTAVYY	SEC ID N°: 24
HC-V93C	AEDTACYCSR	SEC ID N°: 25
HC-Y94C	EDTAVCYCSRW	SEC ID N°: 26

ES 2 544 608 T3

HC-R98C	VYYCSCWGGDG	SEC ID Nº: 27
HC-G100C	YCSRWCGDGFY	SEC ID Nº: 28
HC-D108C	GFYAMCYWGQG	SEC ID Nº: 29
HC-G113C	DYWGQCTLVTV	SEC ID Nº: 30
HC-T117C	QGTLVCVSSAS	SEC ID Nº: 31
HC-A121C	VTVSSCSTKGP	SEC ID Nº: 32
HC-G125C	SASTKCPSVFP	SEC ID Nº: 33
HC-G141C	KSTSGCTAALG	SEC ID Nº: 34
HC-P154C	VKDYFCEPVTV	SEC ID Nº: 35
HC-N162C	VTVSWCSGALT	SEC ID Nº: 36
HC-S163C	TVSWNCGALTS	SEC ID Nº: 37
HC-G164C	VSWNSCALTSG	SEC ID Nº: 38
HC-S168C	SGALTCGVHTF	SEC ID Nº: 39
HC-F173C	SGVHTCPAVLQ	SEC ID Nº: 40
HC-T190C	LSSVVCVPSSS	SEC ID Nº: 41
HC-S194C	VTVPSCSLGTQ	SEC ID Nº: 42
HC-T200C	SLGTQCYICNV	SEC ID Nº: 43
HC-V205C	TYICNCHKPS	SEC ID Nº: 44
HC-N211C	NHKPSCTKVDK	SEC ID Nº: 45
HC-T212C	HKPSNCKVDDK	SEC ID Nº: 46
HC-V214C	PSNTKCDKKVE	SEC ID Nº: 47
HC-K217C	TKVDKCEPKS	SEC ID Nº: 48
HC-T226C	KSCDKCH	SEC ID Nº: 49

5 Se seleccionaron los mutantes hu4D5Fabv8 de cadena ligera con unión eficaz a la proteína receptora HER2 y con reactividad del tiol con el reactivo de biotilación, biotina-PEO-maleimida (documento US 7521541). Ciertos mutantes de cadena ligera tenían una unión limitada o comprometida con HER2, porque es un resto importante para la unión al antígeno (HER2), situado en las CDR de la región variable del Fab del anticuerpo. Algunos de los restos ubicados en el dominio constante de los Fab también dieron lugar a una baja unión a HER2 debido a que estos restos pueden contribuir a la estructura y al plegamiento de Fab, dando lugar así a una baja presentación del Fab de 4D5 en el fago M13 (Junutula, J. R. et al. (2008) *J. Immunol Methods*, 332: 41-52). Los mutantes hu4D5Fabv8 de cadena ligera con una baja unión a HER2 incluían mutaciones de cisteína en las posiciones 4, 29-32, 35, 36, 50, 82, 86, 89-91, 113, 115, 117, 120, 126, 128, 139, 141, 146, 148, 179, 186, 192, 202. Se midieron las variantes de cisteína de tipo silvestre 23, 134, 194, 214. Otros mutantes de cadena ligera tuvieron reactividad limitada del tiol con el reactivo de biotilación.

15 El resto de aminoácido de cisteína libre V205C introducido por los métodos de modificación genéticamente de cisteínas descritos en el presente documento y SEC ID Nº 96 es designado por el sistema de numeración de Kabat y el secuencial. Los mutantes V205C como los conjugados en los conjugados de anticuerpo-fármaco descritos en el presente documento (Figuras 5a y 5b, Tabla 3, y Ejemplo 6) comprenden SEC ID Nº 96.

20 El resto de aminoácido de cisteína libre está en el centro con restos flanqueantes en las secuencias de la columna central de la Tabla 2. El aminoácido sustituido y la posición de la cadena ligera se designan en la columna izquierda. Los mutantes hu4D5Fabv8 de cadena ligera de SEC ID Nº 50-98 de la Tabla 2 tienen unión a HER2 conservada y valores de reactividad del tiol de aproximadamente 0,8 o superiores, con exclusión de las variantes de cisteína de tipo silvestre. Los anticuerpos con SEC ID Nº 50-98 (Tabla 2) han demostrado reactividad del tiol y pueden ser útiles para formar enlaces covalentes con un marcador de captura, un marcador de detección, un resto de fármaco o un soporte sólido. Los mutantes de cadena ligera de la Tabla 2 se pueden conjugar como ThioFab o ThioMab, por ejemplo, en forma de conjugados de anticuerpo-fármaco.

Tabla 2: Unión eficaz, mutantes hu4D5Fabv8 de cadena ligera reactivos de tiol

LC-S9C	MTQSPCSLSAS	SEC ID Nº: 50
LC-L46C	GKAPKCLIYSA	SEC ID Nº: 51
LC-Y49C	PKLLICSASFL	SEC ID Nº: 52
LC-F53C	IYSASCLYSGV	SEC ID Nº: 53
LC-T72C	SGTDFCLTISS	SEC ID Nº: 54
LC-L73C	GTDFTCTISSL	SEC ID Nº: 55
LC-T74C	TDFTLCISSLQ	SEC ID Nº: 56

ES 2 544 608 T3

LC-I75C	DFTLTCSSLQP	SEC ID Nº: 57
LC-S77C	TLTISCLQPED	SEC ID Nº: 58
LC-Q79C	TISSLCPEDFA	SEC ID Nº: 59
LC-P80C	ISSLQCEDFAT	SEC ID Nº: 60
LC-Y92C	YCQQHCTTPPT	SEC ID Nº: 61
LC-P95C	QHYYTCPTFGQ	SEC ID Nº: 62
LC-G99C	TPPTFCQGTKV	SEC ID Nº: 63
LC-G101C	PTFGQCTKVEI	SEC ID Nº: 64
LC-K103C	FGQGTCVEIKR	SEC ID Nº: 65
LC-E105C	QGTKVCIKRTV	SEC ID Nº: 66
LC-V110C	EIKRTCAAPSV	SEC ID Nº: 67
LC-A112C	KRTVACPSVFI	SEC ID Nº: 68
LC-S114C	TVAAPCVFIFP	SEC ID Nº: 69
LC-F116C	AAPSVCIFPPS	SEC ID Nº: 70
LC-F118C	PSVFICPPSDE	SEC ID Nº: 71
LC-S121C	FIFPPCDEQLK	SEC ID Nº: 72
LC-L125C	PSDEQCKSGTA	SEC ID Nº: 73
LC-S127C	DEQLKCGTASV	SEC ID Nº: 74
LC-T129C	QLKSGCASVVC	SEC ID Nº: 75
LC-A130C	LKSGTCSVVCL	SEC ID Nº: 76
LC-S131C	KSGTACVVCLL	SEC ID Nº: 77
LC-N137C	VVCLLCNFYPR	SEC ID Nº: 78
LC-N138C	VCLLNCFYPRE	SEC ID Nº: 79
LC-Y140C	LLNNFCPREAK	SEC ID Nº: 80
LC-R142C	NNFYPCFAKVQ	SEC ID Nº: 81
LC-A144C	FYPRECKVQWK	SEC ID Nº: 2
LC-Q147C	REAKVCWKVDN	SEC ID Nº: 83
LC-K149C	AKVQWCVDNAL	SEC ID Nº: 84
LC-D151C	VQWKVCNALQS	SEC ID Nº: 85
LC-Q155C	VDNALCSGNSQ	SEC ID Nº: 86
LC-Q160C	QSGNSCESVTE	SEC ID Nº: 87
LC-A184C	LTLKCDYEKH	SEC ID Nº: 88
LC-D185C	TLSKACYEKHK	SEC ID Nº: 89
LC-K188C	KADYECHKVYA	SEC ID Nº: 90
LC-T197C	YACEVCHQGLS	SEC ID Nº: 91
LC-G200C	EVTHQCLSSPV	SEC ID Nº: 92
LC-L201C	VTHQGCSSPVT	SEC ID Nº: 93
LC-S203C	HQGLSCPVTKS	SEC ID Nº: 94
LC-P204C	QGLSSCVTKSF	SEC ID Nº: 95
LC-V205C	GLSSPCTKSFN	SEC ID Nº: 96
LC-T206C	LSSPVCKSFNR	SEC ID Nº: 97
LC-K207C	SSPVTCFNRG	SEC ID Nº: 98

PREPARACIÓN DE ANTICUERPOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE CON CISTEÍNA PARA LA CONJUGACIÓN

- 5 En determinadas condiciones, los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína se pueden hacer reactivos para la conjugación con los complejos de fármaco-enlazador intermedios de la invención mediante el tratamiento con un agente reductor tal como DTT (reactivo de Cleland, ditiotreitól) o TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina; Getz et al. (1999) *Anal. Biochem.* Vol 273: 73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA). Se redujeron anticuerpos monoclonales modificados genéticamente con cisteína, de longitud completa, (ThioMab) expresados en células CHO (Gomez et al. (2010) *Biotechnology and Bioeng.* 105(4): 748-760; Gomez et al. (2010) *Biotechnol. Prog.* 26: 1438-1445) con aproximadamente un exceso de 50 veces de DTT durante la noche a temperatura ambiente para reducir los enlaces disulfuro que se podían formar entre los restos de cisteína recién introducidos y la cisteína presente en el medio de cultivo. Se diluyó el ThioMab reducido y se cargó en la columna HiTrap SP FF en acetato de sodio 10 mM,
- 10

pH 5, y se eluyó con Tris-Cl 50 mM, pH 7,5, que contenía cloruro sódico 150 mM. Se volvieron a establecer los enlaces disulfuro entre los restos de cisteína presentes en el Mab parental llevando a cabo la reoxidación con 15X DHAA a temperatura ambiente durante 3 horas en Tris-Cl 50 mM, pH 7,5. Se pueden usar otros oxidantes, es decir, agentes de oxidación, y condiciones oxidantes que sean conocidos en la técnica. La oxidación del aire ambiental también es eficaz. Esta etapa de reoxidación parcial, suave, forma disulfuros intracatenarios de manera eficaz con alta fidelidad. Se añadió un exceso aproximado de 1,5 veces de fármaco-enlazador intermedio, por ejemplo, 5, 8, 14, 18, se mezcló y se dejó reposar durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente para efectuar la conjugación y formar el conjugado de anticuerpo-fármaco ThioMab. Se cargó la mezcla de conjugación y se eluyó a través de una columna HiTrap SP FF para eliminar el exceso de fármaco-enlazador intermedio y otras impurezas.

RESTO DE FÁRMACO DE *N*-METIL-ALANINIL-MAITANSINOL

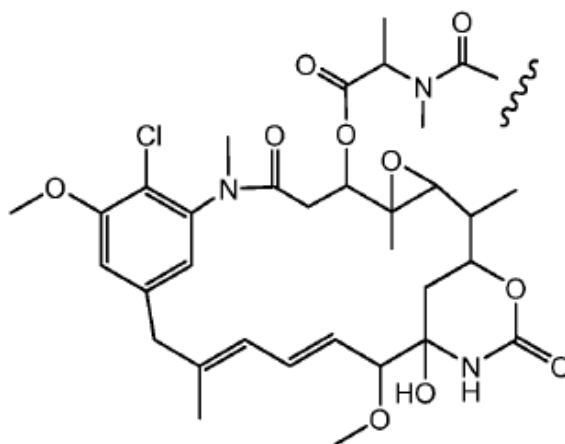
El resto de fármaco (D) de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención es un derivado de maitansinoide que tiene un efecto citotóxico o citostático a través de cualquier mecanismo de acción incluyendo la inhibición de la microtubulina, la inhibición de la mitosis, la inhibición de la topoisomerasa o la intercalación de ADN.

Los compuestos de maitansina inhiben la proliferación celular mediante la inhibición de la formación de los microtúbulos durante la mitosis a través de la inhibición de la polimerización de la proteína microtubular tubulina (Remillard et al. (1975), *Science* 189:1002-1005). La maitansina y los maitansinoides son muy citotóxicos, pero su uso clínico en el tratamiento del cáncer se ha visto limitado en gran medida por sus graves efectos secundarios sistémicos, atribuidos principalmente a su escasa selectividad hacia los tumores. Los ensayos clínicos con maitansina se habían suspendido debido a los graves efectos adversos en el sistema nervioso central y el sistema gastrointestinal (Issel et al. (1978) *Can. Treatment. Rev.* 5: 199- 207).

Los restos de fármacos maitansinoides son restos de fármaco atractivos en los conjugados de anticuerpo-fármaco debido a que son: (i) relativamente fáciles de preparar por fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación; (ii) susceptibles a la derivatización con grupos funcionales adecuados para la conjugación a través de enlazadores no disulfuro a anticuerpos; (iii) estables en el plasma; y (iv) eficaces contra varias líneas de células tumorales (documentos US 2005/0169933; WO 2005/037992, US 5208020).

Los derivados de maitansinoide incluyen los compuestos *N*-metil-alaninil-maitansinol preparados a partir de fuentes naturales de acuerdo con métodos conocidos, producidos usando técnicas de ingeniería genética (Yu et al. (2002) *Proc. Nat. Acad. Sci.* (EE.UU.) 99:7968-7973; documento US 6790954; documento US 7192750). Aisladas por primera vez de un arbusto africano (documento US 3896111), las maitansinas se obtienen de manera más eficaz por fermentación microbiana (documento US 4151042; documento US 6790954; documento US 7192750; documento US 7432088), produciéndose una mezcla del éster C-3 ansamitocina. La reducción de los ésteres C-3 produce maitansinol (documento US 7411063; documento 6333410). El hidroxilo C-3 del maitansinol se puede derivar de forma selectiva (documento US 7301019; documento US 7276497; documento US 7473796; documento US 7598375), incluyendo los alaninilésteres (documento US 4137230; documento US 4260608; documento US 5208020; y *Chem. Pharm. Bull.* (1984) 12:3441).

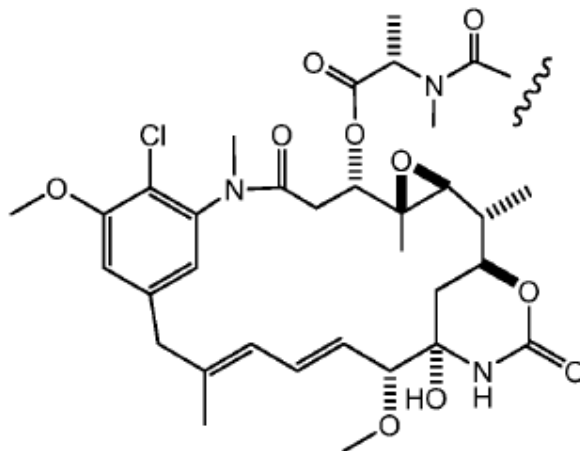
El resto de fármaco *N*-metil-alaninil-maitansinol (D) de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de Fórmula I tienen la estructura:



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

Para los compuestos de la invención, se contemplan todos los estereoisómeros del resto de fármaco maitansinoide, es decir, cualquier combinación de configuraciones *R* y *S* en los carbonos quirales de D. En una realización, el resto

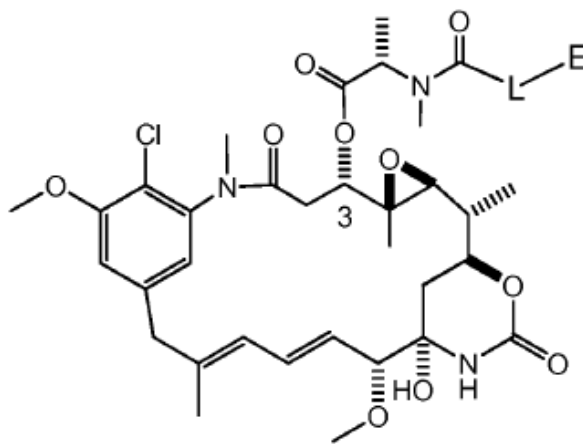
de fármaco maitansinoide (D) tendrá la siguiente estereoquímica:



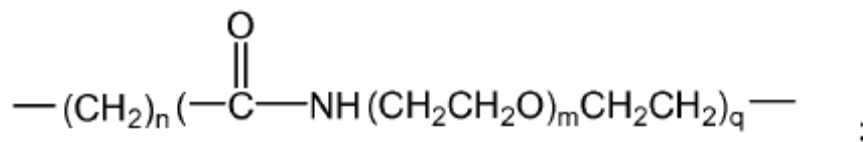
5 El resto de fármaco *N*-metil-alaninil-maitansinol (D) de los conjugados de anticuerpo-fármaco y los productos intermedios de fármaco-enlazador de Fórmula I de la invención comprenden un enlace amida-alquilo o amida-etilenoxi al grupo *N*-metilal-aninilo y no un enlace alquiltio-maleimido unido al grupo *N*-metil-alaninilo del resto de fármaco maitansinoide, tal como el enlace mpeo-DM1 o mcc-DM1, ilustrado en el documento US 2005/0276812, en las páginas 29 y 32, respectivamente.

10 PRODUCTOS INTERMEDIOS DE FÁRMACO *N*-METIL-ALANINIL-MAITANSINOL-ENLAZADOR

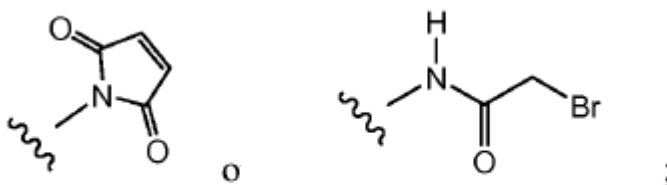
La invención incluye compuestos intermedios de fármaco *N*-metil-alaninil-maitansinol-enlazador, donde el enlazador está unido al resto alaninil-maitansinoide C-3 y que tiene la Fórmula I:



15 L es:



E es



n es 2, 3, 4, 5 o 6;
m es 2, 3 o 4; y
q es 0 o 1.

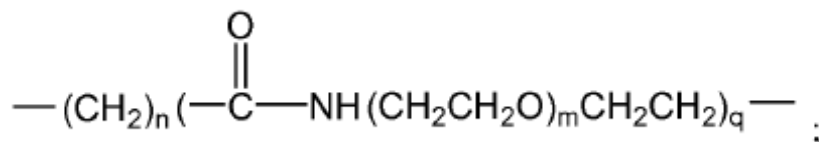
5 El enlazador (L) es un resto bifuncional o multifuncional que se puede usar para enlazar uno o más restos de fármaco maitansinol (D) y una unidad de anticuerpo (Ab) para formar conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de Fórmula la o lb. Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) se pueden preparar convenientemente usando un enlazador que tenga funcionalidad de reactivo para la unión al fármaco y al anticuerpo. Un tiol de cisteína de un anticuerpo (Ab) modificado genéticamente con cisteína puede formar un enlace con un grupo funcional electrófilo (E) de un reactivo enlazador o un producto intermedio de fármaco-enlazador. Se sabe que los grupos funcionales bromoacetamido y maleimida son reactivos con los tioles, incluyendo los tioles de cisteína de las proteínas (Schelte et al. (2000) *Bioconjugate Chem.* 11:118-123; Alley et al. (2008) *Bioconjugate Chem.* 19:759-765). En un aspecto, un enlazador tiene un sitio reactivo que tiene un grupo electrófilo que es reactivo a una cisteína nucleófila presente en un anticuerpo. El tiol de cisteína del anticuerpo es reactivo con un grupo electrófilo en un enlazador, y forma un enlace covalente con un enlazador. Los grupos electrófilos útiles incluyen, pero sin limitación, grupos maleimida y haloacetamida. Los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína reaccionan con reactivos enlazadores o productos intermedios de fármaco-enlazador, con grupos funcionales electrófilos tales como maleimida o α -halo-carbonilo, de acuerdo con el método de conjugación de la página 766 de Klussman, et al. (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4): 765-773, y de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 6.

Los ejemplos de grupos funcionales electrófilos, reactivos con tiol, incluyen, pero sin limitación, maleimida, ésteres activados con α -haloacetilo tales como ésteres de succinimida, 4-nitrofenilésteres, pentafluorofenilésteres, tetrafluorofenilésteres, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos, isotiocianatos, vinilsulfona, clorotriazina, 2-halopiridilo, cloropirimidina y enamida.

El resto enlazador de un producto intermedio de fármaco-enlazador puede ser un alquilo de 2, 3, 4, 5 o 6 grupos metileno, donde L es $-(CH_2)_n-$ y n es 2, 3, 4, 5 o 6. Una realización ilustrativa es el producto intermedio de fármaco-enlazador mal-mc-ala-May 5 de la Figura 1 y del Ejemplo 1, donde E es maleimida y n es 5. La acilación de 2,5-dioxopirrolidin-1-il-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoato 1 con (N-metil-S-alanina) de ácido (S)-2-(metilamino)propanoico 2 da el ácido (S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-metilhexanamido)propanoico 3. El acoplamiento de maitansinol 4 en el 3-hidroxiilo con 3 da mal-hex-ala-May 5, listo para la conjugación con un anticuerpo para dar el conjugado de anticuerpo-fármaco, Ab-hex-mc-ala-May.

Otra realización ilustrativa es bra-hex-ala-May 8 de la Figura 2 y del Ejemplo 2, donde E es 2-bromoacetamida, y n es 5. La acilación de 2,5-dioxopirrolidin-1-il-6-(2-bromoacetamido)hexanoato 6 con (N-metil-S-alanina) de ácido (S)-2-(metilamino)propanoico 2 dio ácido (S)-2-(6-(2-bromoacetamido)-N-metilhexanamido)propanoico 7. El acoplamiento de maitansinol 4 en el 3-hidroxiilo con 7 da bra-hex-ala-May 8, listo para la conjugación con un anticuerpo para dar el conjugado de anticuerpo-fármaco, Ab-acet-hex-ala-May.

El resto enlazador L de un producto intermedio de fármaco-enlazador puede comprender unidades de etilenoxi (PEG) donde L es:



45 n es 2, 3, 4, 5 o 6; m es 2, 3 o 4; y q es 1. Una realización ilustrativa es el producto intermedio de fármaco-enlazador mal-PEG3-ala-May 14 de la Figura 3 y del Ejemplo 3, donde E es maleimida, n es 4 y m es 3. Se hace reaccionar el éster de mono-N-hidroxisuccinimida (NHS), ácido 6-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)-6-oxohexanoico 9, formado a partir de ácido adípico, con 2,2'-(2,2'-oxibis(etano-2,1-diil)bis(oxi))dietanamina para dar el ácido 1-amino-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaoctadecan-18-oico 10. Se forma la maleimida de 10 con metil-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxilato, dando ácido 1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaoctadecan-18-oico 11. Se forma el

éster de NHS de **11** con *N*-hidroxisuccinimida y DCC, dando 2,5-dioxopirrolidin-1-il-1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaoctadecan-18-oato **12**. La amidación de **12** con (*N*-metil-*S*-alanina) de ácido (*S*)-2-(metilamino)propanoico **2** dio ácido (*S*)-1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-19,20-dimetil-13,18-dioxo-3,6,9-trioxa-12,19-diazahenicosan-21-oico **13**. El acoplamiento en el 3-hidroxi de maitansinol **4** con **13** dio el producto intermedio de fármaco-enlazador mal-PEG3-ala-May **14**, listo para la conjugación con un anticuerpo para dar el conjugado de anticuerpo-fármaco, Ab-mal-PEG3-ala-May.

Como alternativa, se hace reaccionar el maitansinol **4** con *N,N*-diisopropiletilamina, triflato de cinc y (*S*)-3,4-dimetiloxazolidin-2,5-diona **2a** en THF/DMF, dando 3-(*S*-(*N*-metilalaninil)maitansinol **4a** (Figura 1b). El reactivo **2a** se prepara a partir de (*N*-metil-*S*-alanina) de ácido (*S*)-2-(metilamino)propanoico **2** y tricloruro fosforoso en DCM. El 3-(*S*-(*N*-metilalaninil)maitansinol **4a** se acopla con el ácido 1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaoctadecan-18-oico **11**, clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida y *N,N*-diisopropiletilamina, proporcionando mal-PEG3-ala-May **14** (Figura 3)

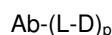
Otra realización ilustrativa es bra-PEG3-ala-May **18** de la Figura 4 del Ejemplo 4, donde E es 2-bromoacetamida, n es 4 y m es 3. Se acila el ácido 1-amino-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaoctadecan-18-oico **10** con bromuro de bromoacetilo, dando el ácido 1-bromo-2,16-dioxo-6,9,12-trioxa-3,15-diazahenicosan-21-oico **15**. El éster de NHS de **15** se forma con *N*-hidroxisuccinimida y DCC en DCM, dando 2,5-dioxopirrolidin-1-il-1-bromo-2,16-dioxo-6,9,12-trioxa-3,15-diazahenicosan-21-oato **16**. La amidación de **16** con (*N*-metil-*S*-alanina) de ácido (*S*)-2-(metilamino)propanoico **2** dio el reactivo enlazador, el ácido (*S*)-1-bromo-22,23-dimetil-2,16,21-trioxa-6,9,12-trioxa-3,15,22-triazatetracosan-24-oico **17**. El acoplamiento en el 3-hidroxi de maitansinol **4** con **17** da el producto intermedio de fármaco-enlazador bra-PEG3-ala-May **18**, listo para la conjugación con un anticuerpo para dar el conjugado de anticuerpo-fármaco Ab-acet-PEG3-ala-May.

Como alternativa, se acopló el 3-(*S*-(*N*-metilalaninil)maitansinol **4a** (Figura 1b) con el ácido 1-bromo-2,16-dioxo-6,9,12-trioxa-3,15-diazahenicosan-21-oico **15**, clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida y *N,N*-diisopropiletilamina para proporcionar bra-PEG3-ala-May **18** (Figura 4)

CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO ALANINIL-MAITANSINOIDE

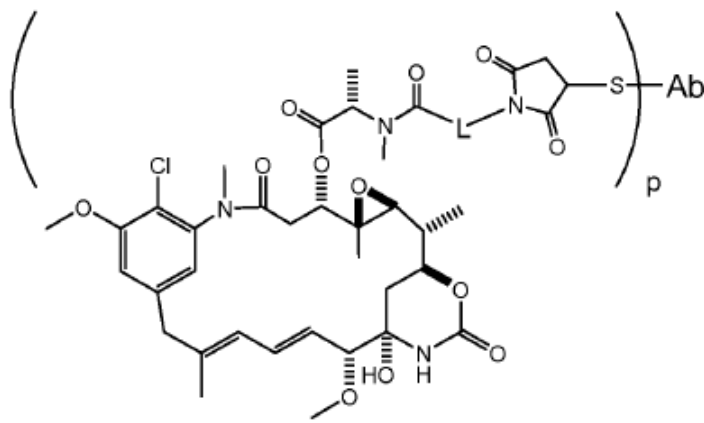
Los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención se componen de un resto de fármaco *N*-metil-alaninil-maitansinol unido covalentemente a través de un resto enlazador al grupo tiol de cisteína reactivo de un anticuerpo.

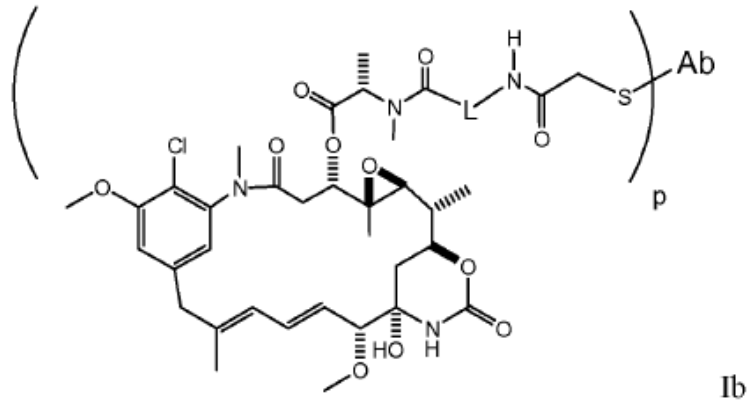
Una realización ilustrativa de un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) comprende un anticuerpo modificado genéticamente con cisteína (Ab) y un resto de fármaco *N*-metil-alaninil-maitansinol (D), en el que el anticuerpo tiene uno o más aminoácidos de cisteína libres, y el anticuerpo está unido a través de uno o más aminoácidos de cisteína libres por un resto enlazador (L) a D; la composición que tiene la fórmula:



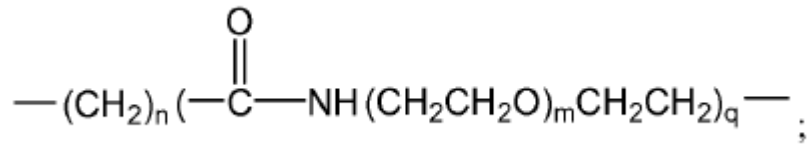
donde p es 1, 2, 3 o 4. El número de restos de fármaco que se pueden conjugar a través de un resto enlazador reactivo con tiol a una molécula de anticuerpo está limitado por el número de restos de cisteína que se introducen mediante los métodos descritos en el presente documento. El ADC ilustrativo preparado a partir de productos intermedios de fármaco-enlazador de Fórmula I comprende, por tanto, anticuerpos que tienen 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de cisteína modificados genéticamente.

Las realizaciones ilustrativas de un conjugado de anticuerpo-fármaco alaninil-maitansinoide son de Fórmula Ia, donde L comprende un resto maleimida, y de Fórmula Ib, donde L comprende un resto acetamidometilo.



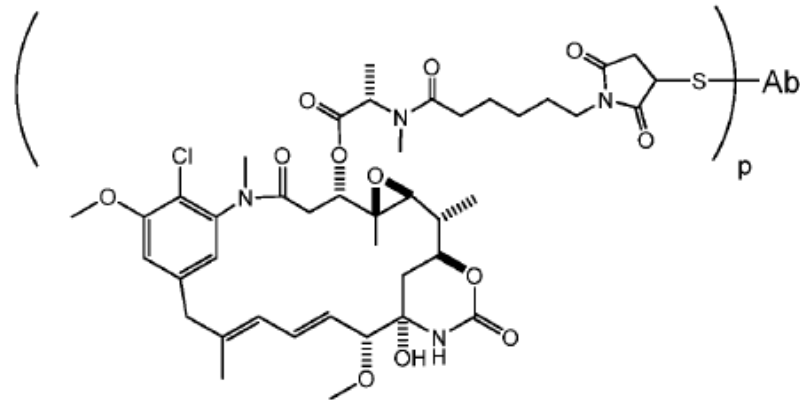


L es:

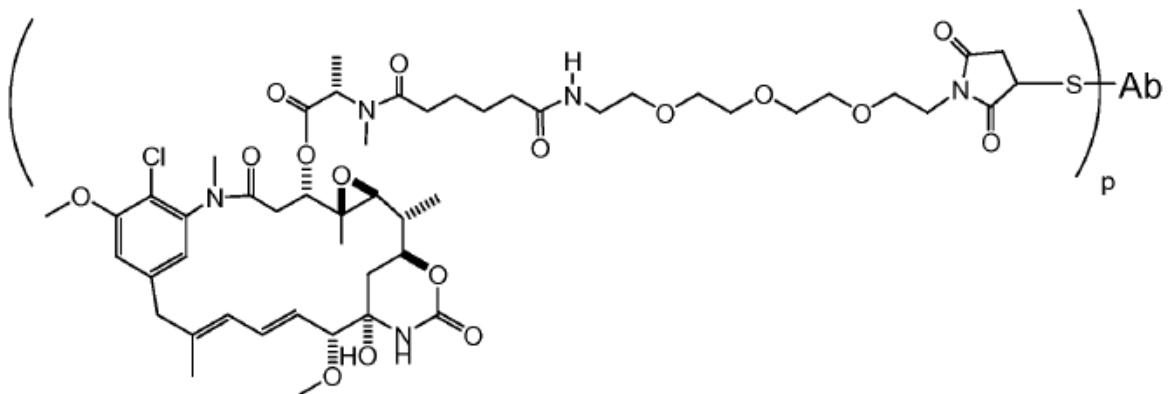


- 5 n es 2, 3, 4, 5 o 6;
 m es 2, 3 o 4;
 q es 0 o 1;
 p es de 1 a 4; y
 Ab es un anticuerpo.

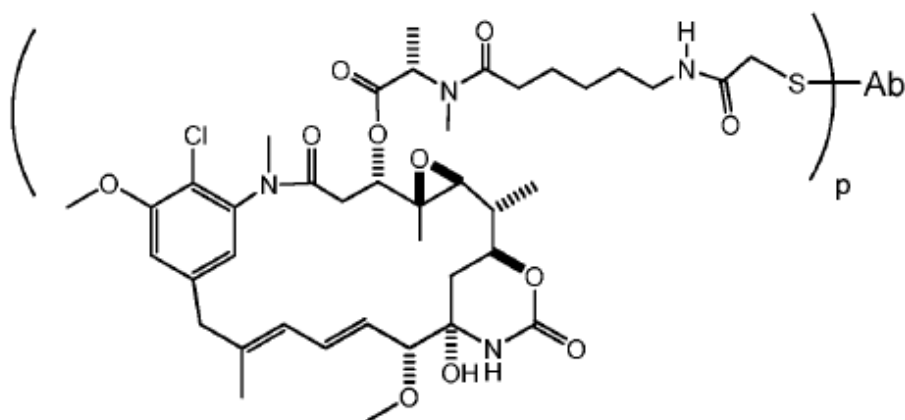
- 10 Las realizaciones ilustrativas de los conjugados de anticuerpo-fármaco alanil-maitansinoide de Fórmula Ia incluyen Ab-mal-hex-ala-May:



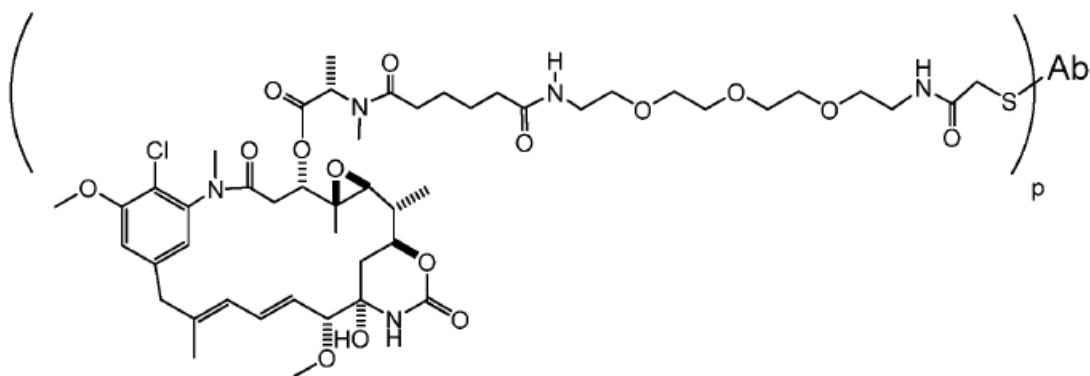
y Ab-mal-PEG3-ala-May:



Las realizaciones ilustrativas de los conjugados de anticuerpo-fármaco alanil-maitansinoide de Fórmula Ib incluyen Ab-acet-hex-ala-May:



5 y Ab-acet-PEG3-ala-May:



Los compuestos de ADC de la invención incluyen aquellos con utilidad para la actividad contra el cáncer. En particular, los compuestos incluyen un anticuerpo modificado genéticamente con cisteína conjugado, es decir, enlazado covalentemente por un enlazador, a un resto de fármaco, es decir, una toxina. Cuando el fármaco no está conjugado a un anticuerpo, el fármaco tiene un efecto citotóxico o citostático. Por lo tanto, la actividad biológica del resto de fármaco es modulada por la conjugación a un anticuerpo. Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención administran selectivamente una dosis eficaz de un agente citotóxico al tejido tumoral, mediante lo que se puede lograr una mayor selectividad, es decir, una dosis eficaz más baja.

15 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR *IN VITRO*

En general, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) se mide mediante: la exposición de células de mamífero que tienen proteínas receptoras, por ejemplo, HER2, al anticuerpo del ADC en un medio de cultivo celular; el cultivo de las células durante un período de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 5 días; y la medición de la viabilidad celular. Se usaron ensayos *in vitro* a base de células para medir la viabilidad (proliferación), la citotoxicidad y la inducción de la apoptosis (activación de la caspasa) del ADC de la invención.

Se midió la potencia *in vitro* de los conjugados de anticuerpo-fármaco mediante un ensayo de proliferación celular (Ejemplo 7). El ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo[®] es un método de ensayo homogéneo, disponible en el mercado, (Promega Corp., Madison, WI), basado en la expresión recombinante de la luciferasa de los coleópteros (patentes de EEUU. N^o 5583024; 5674713 y 5700670). Este ensayo de proliferación celular determina el número de células viables en cultivo basándose en la cuantificación del ATP presente, un indicador de las células metabólicamente activas (Crouch et al. (1993) *J. Immunol. Meth.* 160:81-88; documento US 6602677). El ensayo CellTiter-Glo[®] se realizó en formato de 96 pocillos, haciéndolo susceptible a la exploración automática de alto rendimiento (HTS) (Cree et al. (1995) *AntiCancer Drugs* 6: 398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica añadir el único reactivo (Reactivo CellTiter-Glo[®]) directamente a las células cultivadas en medio suplementado con suero. No se requieren el lavado de las células, la eliminación del medio ni las múltiples etapas de pipeteado. El sistema detecta tan pocas como 15 células/pocillo en un formato de 384 pocillos en 10 minutos, tras la adición de reactivo y el mezclado. Las células se pueden tratar de manera continua con ADC, o se pueden tratar y separar del ADC. En general, las células tratadas durante poco tiempo, es decir, durante 3 horas, mostraron los

de conjugados de anticuerpo-fármaco enlazados y cargados de forma muy diversa, donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 restos de fármaco están unidos covalentemente al anticuerpo trastuzumab (documento US 7097840; documento US 2005/0276812; documento US 2005/0166993)).

5 EFICACIA *IN VIVO*

Se ensayó la eficacia *in vivo* de TMAb-mcc-MD1 (6) y diversos conjugados ThioMab con enlazadores mpeo (2), hex (5) y PEG3 (3), (4), (7), (8) enlazados covalentemente a DM1 (Ejemplo 6) en el modelo de tumor de mama resistente a trastuzumab MMTV-HER2 Fo5 (Ejemplo 8), y estos resultados se presentan en la Figuras 5a, 5b y 6. Se implantaron explantes tumorales MMTV-HER2 Fo5 en la capa de grasa mamaria N° 2/3 de ratones CRL nu/nu. Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 180 mm³, se distribuyeron los ratones aleatoriamente y luego recibieron una sola dosis intravenosa de conjugados DM1 (a 10 mg/kg) el Día 0 del estudio.

Las Figuras 5a y 5b muestran gráficos de la variación del volumen del tumor ajustada *in vivo* a lo largo del tiempo en tumores mamarios transgénicos MMTV-HER2 Fo5 inoculados en la capa de grasa mamaria de los ratones CRL nu/nu después de la administración de: (1) vehículo (tampón de ADC), (2) LC-V205C-Thio-TMAb-mpeo-DM1, (3) LC-V205C-Thio-TMAb-mal-PEG3-ala-May, (4) HC-A118C-Thio-TMAb-mal-PEG3-ala-May, (5) LC-V205C-Thio-TMAb-mal-hex-ala-May, (6) TMAb-mcc-DM1 (trastuzumab-mcc-DM1, T-DM1), (7) LC-V205C-Thio anti-gD5B6-mal-PEG3-ala-May, (8) LC-V205C-Thio anti-gD5B6-mal-hex-ala-May (Ejemplos 6, 8). Todos los conjugados de anticuerpo-fármaco (dosis individuales) se dosificaron por vía intravenosa a 10 mg/kg. Anti-gD5B6 es un anticuerpo de control y su antígeno correspondiente no se expresa en los tejidos tumorales Fo5.

El (6) TMAb-mcc-DM1 mostró inhibición parcial del crecimiento del tumor a 10 mg/kg, lo que equivale a una dosis de DM1 de 560 µg/m². Todos los conjugados de ThioTMAb-maitansinoide resultaron tener una actividad comparable a la misma concentración de anticuerpo, a pesar de tener carga de fármaco inferior. El (3) LC-V205C-Thio-TMAb-mal-PEG3-ala-May mostró ligeramente mejor actividad a la dosis en mg/kg en comparación con (2) LC-V205C Thio-TMAb-mpeo-DM1 (Figura 5a). A pesar de que los conjugados de ThioMab con enlazadores Hex y PEG3 mostraron una potencia *in vitro* aproximadamente 2 veces inferior debido a la menor carga de fármaco, mostraron una eficacia *in vivo* comparable a TMAb-mcc-DM1, lo que indica que los restos de enlazador-fármaco hex y PEG3-alaninil-maitansinol pueden tener mejores propiedades farmacocinéticas en los conjugados de anticuerpo-fármaco.

La Figura 6 muestra un gráfico de la variación del volumen del tumor ajustada *in vivo* a lo largo del tiempo en tumores de mama transgénicos MMTV-HER2 Fo5 inoculados en la capa de grasa mamaria de ratones CRL nu/nu tras la dosificación con: (1) vehículo: tampón de histidina N° 8: acetato de histidina 20 mM, pH 5,5, sacarosa 240 mM, PS 20 al 0,02 %, (4) HC-A118C-Thio-TMAb-mal-PEG3-ala-May, dosis de 5 mg/kg, exposición del fármaco de 150 µg/m², (4) HC-A118C-Thio-TMAb-mal-PEG3-ala-May, dosis de 10 mg/kg, exposición del fármaco de 300 µg/m² (10) HC-A118C Thio anti-gD5B6-bra-PEG3-ala-May, dosis de 5 mg/kg, exposición del fármaco de 120 µg/m² (10) HC-A118C Thio anti-gD5B6-bra-PEG3-ala-May, dosis de 10 mg/kg, exposición del fármaco de 115 µg/m² (11) HC-A118C Thio TMAb-bra-PEG3-ala-May, dosis de 5 mg/kg, exposición del fármaco de 115 µg/m² (11) HC-A118C Thio TMAb-bra-PEG3-ala-May, 10 mg/kg, exposición del fármaco de 230 µg/m² (12) HC-A118C, LC-V205C Thio-TMAb-mal-PEG3-ala-May, dosis de 5 mg/kg, exposición del fármaco de 320 µg/m², (12) HC-A118C, LC-V205C Thio-TMAb-mal-PEG3-ala-May, dosis de 10 mg/kg, exposición del fármaco de 640 µg/m². Todos los conjugados de anticuerpo-fármaco (dosis individuales) se dosificaron por vía intravenosa al iniciarse el estudio. Un grupo de nueve animales recibieron un conjugado de anticuerpo-fármaco a una determinada dosis.

El vehículo y el control negativo de conjugado de anticuerpo anti-gD5B6-fármaco (10) no mostraron efectos inhibidores del crecimiento tumoral. Los conjugados de anticuerpo anti-HER2-fármaco (4), (11) y (12) mostraron una inhibición del crecimiento tumoral dependiente de la dosis y dependiente de la exposición al fármaco maitansinoide. El anticuerpo de (12) HC-A118C, LC-V205C Thio-TMAb-mal-PEG3-ala-May, es un mutante doble, con cisteínas introducidas en A118 de la cadena pesada y V205 de la cadena ligera. El producto intermedio de fármaco-enlazador mal-PEG3-ala-May **14** (Ejemplo 3) se conjugó con el doble mutante HC-A118C, LC-V205C Thio-TMAb casi cuantitativamente a una proporción de fármaco/anticuerpo de 3,9. Los nueve animales del grupo de ensayo que recibieron 10 mg/kg de conjugado (12) mostraron dos respuestas parciales.

55 ADMINISTRACIÓN DE LOS CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO

Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención se pueden administrar por cualquier vía apropiada para la afección que se desea tratar. El ADC normalmente se administra por vía parenteral, es decir, infusión, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural.

60 FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Por lo general, las formulaciones farmacéuticas de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) terapéuticos de la invención se preparan para la administración parenteral, es decir, bolo, intravenosa, inyección intratumoral con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable y en una forma inyectable de dosificación unitaria. Un conjugado

de anticuerpo-fármaco (ADC) que tiene el grado deseado de pureza se mezcla opcionalmente con diluyentes, vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables ("Remington's Pharmaceutical Sciences" (1980) XVI, Osol, A. Ed.) en forma de una formulación liofilizada o una solución acuosa.

5 TRATAMIENTOS CON LOS CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO

Se contempla que los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención se pueden usar para tratar diversas enfermedades o trastornos, por ejemplo, aquellos caracterizados por la sobreexpresión de un antígeno tumoral. Los ejemplos de afecciones o trastornos hiperproliferativos incluyen tumores benignos o malignos; leucemia y tumores malignos linfoides. Otros incluyen trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos, glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales, blastocélulas, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, incluyendo los trastornos autoinmunes.

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

Las enfermedades autoinmunes para cuyo tratamiento se pueden usar los compuestos de ADC incluyen trastornos reumatológicos (tales como, por ejemplo, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerodermia, lupus tal como lupus eritematoso sistémico (SLE) y la nefritis por lupus, polimiositis/dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpos contra los fosfolípidos y artritis soriasica), osteoartritis, trastornos gastrointestinales y hepáticos autoinmunes (tales como, por ejemplo, enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), gastritis autoinmune y anemia perniciosa, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y enfermedad celíaca), vasculitis (tales como, por ejemplo, vasculitis asociada a ANCA, incluyendo vasculitis de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener y polyarteriitis), trastornos neurológicos autoinmunes (tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple, síndrome de opsoclonos mioclonos, miastenia gravis, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y polineuropatías autoinmunes), trastornos renales (tales como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture y enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunes (tales como, por ejemplo, soriasis, urticaria, pénfigo vulgar, pénfigoide ampolloso y lupus eritematoso cutáneo), trastornos hematológicos (tales como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura postransfusional y anemia hemolítica autoinmune), aterosclerosis, uveítis, enfermedades auditivas autoinmunes (tales como, por ejemplo, enfermedad del oído interno y pérdida de la audición), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órganos y trastornos endocrinos autoinmunes (tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunes relacionadas con la diabetes tales como diabetes mellitus dependiente de la insulina (DMID), enfermedad de Addison y enfermedad tiroidea autoinmune (por ejemplo, enfermedad de Graves y tiroiditis)). Las más preferidas de dichas enfermedades incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, vasculitis asociada a ANCA, lupus, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, DMID, anemia perniciosa, tiroiditis y glomerulonefritis.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un ADC dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, como se ha definido anteriormente, de la gravedad y del curso de la enfermedad, de si la molécula se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo, así como del juicio del médico tratante. La molécula se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de la molécula es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Una dosis ilustrativa de ADC para su administración a un paciente se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso del paciente

60 ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación o "kit" que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o un prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botes, viales, jeringas, paquetes de blíster, etc. Los recipientes pueden estar formados por varios materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que es eficaz

para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un ADC. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se usa para tratar la afección de elección, tal como cáncer. Como alternativa, o además, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

10 Ejemplos

Ejemplo 1. Síntesis de mal-hex-ala-May 5

15 La acilación de 2,5-dioxopirrolidin-1-il-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-hexanoato **1** con (*N*-metil-*S*-alanina) de ácido (*S*)-2-(metilamino)propanoico **2** da el ácido (*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-*N*-metilhexanamido)propanoico **3** (Figura 1a). El acoplamiento de maitansinol **4** en el 3-hidroxilo con **3** da mal-hex-ala-May **5**. MS [M+H]⁺ 843,5. RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 7,11 (s, 1H), 6,76 (s, 2H), 6,72 - 6,65 (m, 2H), 6,60 (dd, *J* = 14,7; 11,4 Hz, 1H), 5,69 (dd, *J* = 14,9; 9,1 Hz, 1H), 5,49 (c, *J* = 6,7 Hz, 1H), 4,65 (dd, *J* = 11,9; 2,1 Hz, 1H), 4,19 (td, *J* = 10,3; 4,1 Hz, 1H), 3,97 (s, 3H), 3,62-3,55 (m, 2H), 3,41 - 3,34 (m, 5H), 3,23 (d, *J* = 12,7 Hz, 1H), 3,20 (s, 3H), 2,94 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 2,84 (s, 3H), 2,72 - 2,62 (m, 1H), 2,56 - 2,45 (m, 1H), 2,33 - 2,23 (m, 1H), 2,14 (dd, *J* = 14,1; 1,8 Hz, 1H), 1,68 (s, 3H), 3,5 1,65 - 1,42 (m, 7H), 1,29 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,28 - 1,25 (m, 2H), 1,23 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H), 0,84 (s, 3H).

Ejemplo 2. Síntesis de bra-hex-ala-May 8

25 La acilación de 2,5-dioxopirrolidin-1-il 6-(2-bromoacetamido)-hexanoato **6** con (*N*-metil-*S*-alanina) de ácido (*S*)-2-(metilamino)propanoico **2** dio ácido (*S*)-2-(6-(2-bromoacetamido)-*N*-metilhexanamido)propanoico **7** (Figura 2). El acoplamiento de maitansinol **4** en el hidroxilo 3 con **7** da bra-hex-ala-May **8**.

Ejemplo 3. Síntesis de mal-PEG3-ala-May 14

30 A una solución de 2,2'-(2,2'-oxibis(etano-2,1-diil)bis(oxi))dietanamina (CHEM-Impex, 5,00 g, 0,0260 mol) en THF (525 ml), se añadió 4-dimetilaminopiridina (320 mg, 0,0026 mol). A esto, se añadió una solución de di-*terc*-butildicarbonato (5,68 g, 0,0260 mol) en THF (100 ml) durante un período de 1 h, usando un embudo de adición, todo a temperatura ambiente (Figura 3). La reacción inicialmente se volvió turbia, pero luego se aclaró. Siguiendo a McReynolds K. D. et al., (2002), *Bioorg Med Chem.*, 10:625, se agitó la reacción durante 2 h más, y después se concentró y se purificó mediante ISCO (MeOH al 0-20 %/DCM), proporcionando *terc*-butil-2-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etilcarbamatato en forma de un aceite amarillo claro (2,70 g, 36 %). MS [M + H]⁺ 293,3. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 5,79 (s, 1H), 3,69 - 3,57 (m, 8H), 3,56 - 3,47 (m, 4H), 3,32 - 3,23 (m, 2H), 2,84 (t, *J* = 5,1 Hz, 2H), 1,44 (s, 9H).

45 A un matraz que contenía *terc*-butil-2-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoxi)etilcarbamatato (1,219 g, 4,169 mmol) y ácido hexanodioico (ácido adipico, 3,046 g, 20,84 mmol) en tetrahidrofurano (100 ml), se añadió *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (1,23 g, 5,98 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente, y se volvió turbia. Después de 2 h, se enfrió la solución hasta 0 °C, y se retiró el subproducto de *N,N'*-diciclohexilurea por filtración. Se concentró la reacción sobre gel de sílice y se purificó a través de ISCO (columna de 40 g, MeOH al 0-10 %/DCM). La concentración proporcionó ácido 2,2-dimetil-4,18-dioxo-3,8,11,14-tetraoxa-5,17-diazatricosan-23-oico **9** en forma de un aceite transparente (1,28 g, 73 %). MS [M+H]⁺ 421,4. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 10,55 (s, 1H), 6,65 (s, 1H), 5,27 (s, 1H), 3,67-3,62 (m, 8H), 3,60-3,52 (m, 4H), 3,48-3,41 (m, 2H), 3,35-3,23 (m, 2H), 2,35 (t, *J* = 6,3 Hz, 3H), 2,25 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 1,44 (s, 9H).

50 A un vial que contenía ácido 2,2-dimetil-4,18-dioxo-3,8,11,14-tetraoxa-5,17-diazatricosan-23-oico **9** (682,3 mg, 0,001623 mol), se añadieron 4 ml de cloruro de hidrógeno 4 M en 1,4-dioxano. Se agitó la reacción durante 30 min y después se concentró. Se añadió una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (5,1 ml). Se enfrió la solución hasta 0 °C y se agitó durante 10 min, y después se añadió *N*-metoxicarbonilmaleimida (251,7 mg, 1,622 mmol). Se agitó la reacción durante 20 min más a 0 °C, y después se calentó a temperatura ambiente. Se diluyó la solución con DMF, se inactivó con 5 gotas de ácido fórmico, se filtró y se purificó por RP-HPLC, proporcionando ácido 1-amino-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaoctadecan-18-oico **10** en forma de un aceite transparente (297 mg, 46 %). MS [M+H]⁺ 401,3. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 8,66 (s, 1H), 6,56 (t, *J* = 4,8 Hz, 10 1H), 3,73 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 3,66-3,60 (m, 9H), 3,56 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H), 3,47-3,41 (m, 2H), 2,35 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 2,24 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 1,77 - 1,58 (m, 4H).

65 Se forma la maleimida de **10** con metil-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-carboxilato para dar ácido 1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaoctadecan-18-oico **11** (Hermanson, G. T. "Bioconjugate Techniques", Segunda edición (2008) Academic Press, Elsevier). Se forma el éster de NHS de **11** con *N*-hidroxisuccinimida y DCC en DCM, dando 2,5-dioxopirrolidin-1-il-1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-aza-octadecan-

18-oato **12**. La amidación de **12** con (*N*-metil-*S*-alanina) de ácido (*S*)-2-(metilamino)propanoico **2** dio ácido (*S*)-1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-19,20-dimetil-13,18-dioxo-3,6,9-trioxa-12,19-diazahenicosan-21-oico **13**. El acoplamiento en el 3-hidroxilo de maitansinol **4** con **13** da el producto intermedio de fármaco-enlazador mal-PEG3-ala-May **14**.

5 Como alternativa, a una solución de maitansinol **4** (50,0 mg, 0,0885 mmol) en DMF (1,12 ml, 14,5 mmol) y THF (380 μ l, 4,6 mmol), se añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (62 μ l, 0,35 mmol), triflato de cinc (129 mg, 0,354 mmol) y (*S*)-3,4-dimetiloxazolidin-2,5-diona **2a** (80,0 mg, 0,619 mmol) (Figura 1b). Se agitó la reacción durante 24 h y se añadió acetato de etilo (2 ml), y luego durante 5 min, y se añadieron 2 ml de una solución saturada de bicarbonato de sodio (1:1) (ac)/cloruro de sodio. Se agitó la solución durante 30 min, y se filtraron las sales y se aclararon con acetato de etilo. Se separaron las dos fases y se extrajo la fase acuosa 3 veces con 2 ml de acetato de etilo cada vez. Se concentraron las fases orgánicas combinadas hasta 0,25 ml. Se añadieron 2 ml de acetato de etilo, y se redujo de nuevo la solución hasta 0,25 ml. Se realizaron una vez más esta dilución y concentración. Finalmente, se añadió acetato de etilo, dando aproximadamente 2 ml de solución, y se filtraron las sales que habían precipitado a través de un filtro de jeringa de 0,45 micrómetros, dando 3-(*S*-(*N*-metilalaninil)maitansinol **4a** (Figura 1b).

20 A una solución de 3-(*S*-(*N*-metilalaninil)maitansinol **4a**, se añadió ácido 1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaoctadecan-18-oico **11** (65,5 mg, 0,164 mmol), clorhidrato de *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida (31,4 mg, 0,164 mmol) y *N,N*-diisopropiletilamina (7,71 μ l, 0,0442 mmol). Se agitó la reacción durante 2 horas, y se filtró y purificó la reacción sobre RP-HPLC, proporcionando mal-PEG3-ala-May **14** en forma de un aceite transparente (48,8 mg, 53 %). MS [*M*+*H*]⁺ 1032,7, RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 6,83 (s, 1H), 6,71 (s, 2H), 6,70-6,64 (m, 2H), 6,47-6,37 (m, 2H), 6,27 (t, *J* = 4,8 Hz, 1H), 5,67 (dd, *J* = 15,3; 9,1 Hz, 1H), 5,35 (c, *J* = 6,7 Hz, 1H), 4,78 (dd, *J* = 12,0; 2,8 Hz, 1H), 4,29 (t, *J* = 10,8 Hz, 1H), 3,98 (s, 3H), 3,72 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H), 3,67-3,56 (m, 12H), 3,54-3,48 (m, 3H), 3,44-3,38 (m, 2H), 3,36 (s, 3H), 3,19 (s, 3H), 3,11 (d, *J* = 12,7 Hz, 1H), 3,01 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 2,84 (s, 3H), 2,60 (dd, *J* = 14,1; 12,4 Hz, 1H), 2,48-2,38 (m, 1H), 2,30-2,13 (m, 4H), 1,75-1,58 (m, 8H), 1,52-1,40 (m, 1H), 1,29 (t, *J* = 6,0 Hz, 6H), 1,22 (d, *J* = 12,9 Hz, 1H), 0,80 (s, 3H).

Ejemplo 4. Síntesis de bra-PEG3-ala-May **18**

30 A un vial que contenía ácido 2,2-dimetil-4,18-dioxo-3,8,11,14-tetraoxa-5,17-diazatricosan-23-oico **9** (321,8 mg, 0,7653 mmol), se añadieron 1 ml de cloruro de metileno y 1 ml de ácido trifluoroacético. Se agitó la reacción durante 30 min y se concentró, dando ácido 1-amino-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaoctadecan-18-oico **10** (Figura 3).

35 Se añadió *N,N*-dimetilformamida (7,65 ml) al vial de **10** y se enfrió la solución hasta 0 °C (Figura 4). Se añadió bromuro de bromoacetilo (73 μ l, 0,842 mmol) seguido de *N,N*-diisopropiletilamina (160 μ l, 0,918 mmol). Tras agitar durante 45 min, se añadieron 2 ml de agua con ácido fórmico al 0,1 % a la solución, y se purificó el producto mediante RP-HPLC, proporcionando ácido 1-bromo-2,16-dioxo-6,9,12-trioxa-3,15-diazahenicosan-21-oico **15** en forma de un aceite transparente (89,6 mg, 27 %). MS [*M*+*H*]⁺ 441,3. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,12 (s, 1H), 6,48 (s, 1H), 3,89 (s, 2H), 3,69-3,54 (m, 12H), 3,53-3,41 (m, 4H), 2,36 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,24 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 1,76-1,59 (m, 4H).

45 Se formó el éster de NHS de **15** con *N*-hidroxisuccinimida y DCC en DCM, dando 2,5-dioxopirrolidin-1-il-1-bromo-2,16-dioxo-6,9,12-trioxa-3,15-diazahenicosan-21-oato **16**. La amidación de **16** con (*N*-metil-*S*-alanina) de ácido (*S*)-2-(metilamino)propanoico **2** da el reactivo enlazador ácido (*S*)-1-bromo-22,23-dimetil-2,16,21-trioxa-6,9,12-trioxa-3,15,22-triazatetracosan-24-oico **17**. El acoplamiento en el 3-hidroxilo de maitansinol **4** con **17** da el producto intermedio de fármaco-enlazador bra-PEG3-ala-May **18** (Figura 4).

50 Como alternativa, a una solución de 3-(*S*-(*N*-metilalaninil)maitansinol **4a** (Figura 1b), se añadieron ácido 1-bromo-2,16-dioxo-6,9,12-trioxa-3,15-diazahenicosan-21-oico **15** (72,2 mg, 0,164 mmol), clorhidrato de *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida (31,4 mg, 0,164 mmol) y *N,N*-diisopropiletilamina (7,71 μ l, 0,0442 mmol). Se agitó la reacción durante 2 h, y se filtró y purificó la reacción sobre RP-HPLC, proporcionando bra-PEG3-ala-May **18** en forma de un aceite transparente (53,3 mg, 56 %). MS [*M*+*H*]⁺ 1073,0. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,10 (s, 1H), 6,83 (s, 1H), 6,66 (s, 1H), 6,64 (s, 1H), 6,48-6,37 (m, 2H), 6,32 (t, *J* = 4,8 Hz, 1H), 5,68 (dd, *J* = 15,3; 9,1 Hz, 1H), 5,31 (c, *J* = 6,5 Hz, 1H), 4,79 (dd, *J* = 12,0; 2,8 Hz, 1H), 4,29 (t, *J* = 11,2 Hz, 1H), 3,98 (s, 3H), 3,87 (s, 2H), 3,65-3,62 (m, 9H), 3,61-3,58 (m, 3H), 3,54 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,50-3,47 (m, 3H), 3,42 (dd, *J* = 9,8; 4,9 Hz, 2H), 3,36 (s, 3H), 3,19 (s, 3H), 3,12 (d, *J* = 12,7 Hz, 1H), 3,00 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 2,85 (s, 3H), 2,60 (dd, *J* = 14,1; 12,4 Hz, 1H), 2,49-2,12 (m, 6H), 1,69-1,57 (m, 7H), 1,46 (cd, *J* = 12,8; 6,4 Hz, 1H), 1,31 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H), 1,28 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H), 1,23 (d, *J* = 13,0 Hz, 1H), 0,80 (s, 3H).

60 Ejemplo 5. Preparación de anticuerpos modificados genéticamente con cisteína para la conjugación mediante reducción y reoxidación

65 Los aminoácidos de la cadena ligera se numeran de acuerdo con Kabat ((Kabat et al., "Sequence of proteins of immunological interest", (1991) V Ed., Departamento estadounidense de sanidad y servicios sociales, National

Institutes of Health, Bethesda, MD). Los aminoácidos de la cadena pesada se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de la UE (Edelman et al. (1969) *Proc. Natl. Acad of Sciences* 63(1):78-85), excepto donde se indique que es de acuerdo con el sistema de Kabat. Se usan abreviaturas de aminoácidos de una sola letra.

5 Los anticuerpos monoclonales modificados genéticamente con cisteína (ThioMabs), de longitud completa, expresados en células CHO portan aductos de cisteína (cistinas) o están glutationilados en las cisteínas modificadas debido a las condiciones del cultivo de células. Para liberar los grupos tiol reactivos de las cisteínas modificadas, se disuelven los ThioMab en borato de sodio 500 mM y cloruro de sodio 500 mM a aproximadamente pH 8,0, y se reducen con un exceso de aproximadamente 50-100 veces de TCEP 1 mM (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (Getz et al. (1999) *Anal. Biochem.* Vol 273: 73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) durante aproximadamente 1-2 horas a 37 °C. Como alternativa, se puede usar DTT como agente reductor. Se monitorizó la formación de enlaces disulfuro intercatenarios bien mediante SDS-PAGE no reductora o mediante cromatografía de columna PLRP HPLC de fase inversa desnaturalizante. Se diluyó el ThioMab reducido y se cargó en una columna HiTrap S en acetato de sodio 10 mM, pH 5, y se eluyó con PBS que contenía cloruro de sodio 0,3 M. Se trató el ThioMab eluido reducido con ácido deshidroascórbico 2 mM (dhAA) a pH 7 durante 3 horas, o sulfato de cobre acuoso 2 mM (CuSO₄) a temperatura ambiente durante la noche. La oxidación del aire ambiental también puede ser eficaz. Se intercambié el tampón por elución sobre resina Sephadex G25 y se eluyó con PBS con DTP 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 mediante la reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm.

Se realizó el análisis de cromatografía líquida/espectrometría de masas en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo TSQ Quantum con intervalo de masas extendido (Thermo Electron, San Jose, California). Se cromatografiaron las muestras en una columna Microbore, de 1.000 Å, PRLP-S, (50 mm x 2,1 mm, Polymer Laboratories, Shropshire, RU) calentada hasta 75 °C. Se usó un gradiente lineal de B al 30-40 % (disolvente A: TFA al 0,05 % en agua, disolvente B: TFA al 0,04 % en acetonitrilo) y el eluyente se ionizó directamente usando la fuente de electronebulización. Los datos fueron recogidos por el sistema de datos Xcalibur y la desconvolución se realizó usando ProMass (Novatia, LLC, Nueva Jersey). Antes del análisis de LC/MS, se trataron los anticuerpos o los conjugados de fármaco (50 microgramos) con PNGasa F (2 unidades/ml; PROzyme, San Leandro, CA) durante 2 horas a 37 °C para eliminar los hidratos de carbono ligados a N.

Se inyectaron muestras de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) en una columna NPR para HIC de butilo (tamaño de partícula de 2,5 micrómetros, 4,6 mm x 3,5 cm) (Tosoh Bioscience), y se eluyeron con un gradiente lineal de B del 0 al 70 % en 0,8 ml/min (A: sulfato de amonio 1,5 M en fosfato de potasio 50 mM, pH 7; B: fosfato de potasio 50 mM, pH 7, isopropanol al 20 %). Se usó un sistema de HPLC serie 1100 de Agilent dotado de un detector de múltiples longitudes de onda y el programa informático Chemstation para resolver y cuantificar las especies de anticuerpos con diferentes proporciones de fármacos por anticuerpo.

Ejemplo 6. Conjugación de los productos intermedios de fármaco-enlazador con los anticuerpos

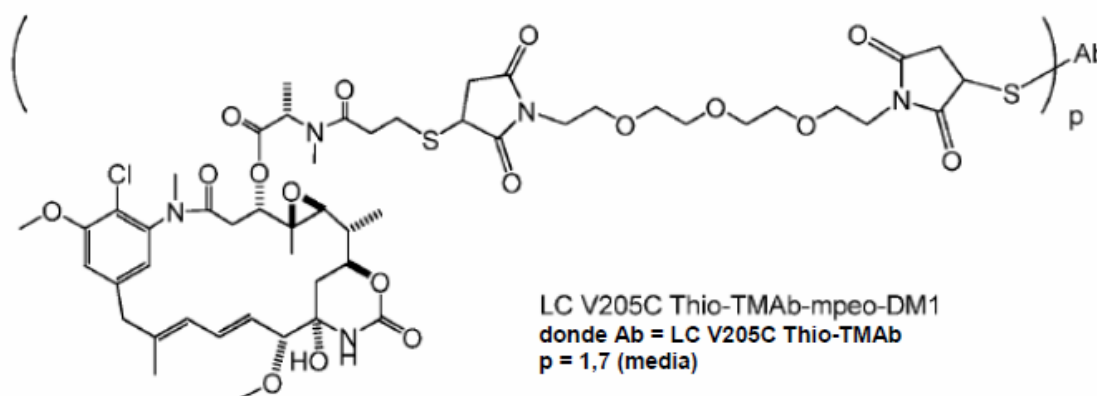
Tras los procedimientos de reducción y reoxidación del Ejemplo 5, el anticuerpo modificado genéticamente con cisteína se disuelve en tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se enfría en hielo. Se disuelven aproximadamente 1,5 equivalentes molares con respecto a las cisteínas modificadas por anticuerpo de un enlazador de fármaco maitansinoide intermedio tal como **5**, **8**, **14** y **18**, con un grupo funcional reactivo de tiol tal como maleimido o bromo-acetamida, en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua, y se añade al anticuerpo reoxidado, reducido, refrigerado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para detener la reacción y proteger cualquier grupo tiol de anticuerpo que no haya reaccionado. Se concentra la mezcla de reacción por ultrafiltración centrífuga y se purifica el conjugado de anticuerpo trastuzumab modificado genéticamente con cisteína-fármaco y se desala mediante elución a través de resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 µm en condiciones estériles, y se congela para su almacenamiento.

Mediante el procedimiento anterior, se prepararon los siguientes conjugados de anticuerpo-fármaco de *N*-metil-alaninil-maitansinol de Fórmula I:

Fig. 5a, 5b, 6	Conjugado de anticuerpo-fármaco	Fármaco/anticuerpo (DAR)	Producto intermedio de fármaco-enlazador
(3)	LC-V205C Thio-TMAb-mal-PEG3-ala-May	1,8	14
(4)	HC-A118C Thio-TMAb-mal-PEG3-ala-May	1,8	14
(5)	LC-V205C Thio-TMAb-mal-hex-ala-May	1,8	5
(7)	LC-V205C Thio anti-gD5B6-mal-PEG3-ala-May	1,8	14
(8)	LC-V205C Thio anti-gD5B6-mal-hex-ala-May	1,8	5

(9)	HC-A118C Thio TMAb-mal-hex-ala-May	1,9	5
(10)	HC-A118C Thio anti-gD5B6-bra-PEG3-ala-May	1,5	18

Los conjugados de Maleimida DM1 (2) LC V205C Thio-TMAb-mpeo-DM1, carga media de fármaco DAR = 1,7, y (6) TMAb-mcc-DM1, carga media de fármaco DAR = 3,4, se prepararon de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 4 del documento US 2005/0276812.



5

Ejemplo 7. Ensayo de proliferación celular *in vitro*

Se midió la eficacia de ADC mediante un ensayo de proliferación celular, empleando el siguiente protocolo (Ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITER GLO™, Promega Corp. Boletín técnico TB288; Mendoza et al. (2002) *Cancer Res.* 62: 5485-5488):

1. Se depositó una parte alícuota de 100 μ l de cultivo celular que contenía aproximadamente 10^4 células (SKBR-3, BT474, MCF7 o MDA-MB-468) en medio 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 pocillos experimentales y se incubaron durante 3-5 días.
4. Se equilibraron las placas 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. Se mezclaron los contenidos durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular.
7. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia.
8. Se registró la luminiscencia y se presentó en gráficos como URL = unidades relativas de luminiscencia.

Los datos se representan como la media de la luminiscencia para cada conjunto de réplicas, con la barras de error de la desviación estándar. El protocolo es una modificación del ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITER GLO™.

Medios: SK-BR-3 crece en el 50/50/FBS al 10 %/glutamina/250 μ g/ml de G-418;

OVCAR-3 crece en RPMI/FBS al 20 %/glutamina

Ejemplo 8. Inhibición del crecimiento tumoral, eficacia *in vivo* en ratones con explantes transgénicos que expresan HER2 a un alto nivel

Se empleó el modelo de tumor mamario de ratón Fo5 para evaluar la eficacia *in vivo* de (6) TMAb-mcc-DM1 y diversos conjugados Thio-TMAb-May de la invención (Ejemplo 6), tras inyecciones intravenosas de una sola dosis, y como se ha descrito previamente (Phillips G. D. L., Li G. M., Dugger D. L., et al. "Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody-Cytotoxic Drug Conjugate". (2008) *Cancer Res.* 68:9280-90). El modelo Fo5 es un modelo de ratón transgénico en el que se sobreexpresa el gen HER2 humano en el epitelio mamario bajo la regulación transcripcional del promotor del virus del tumor mamario murino (MMTV-HER2). La sobreexpresión de HER2 provoca el desarrollo espontáneo de un tumor mamario. Se ha propagado el tumor mamario de uno de estos animales fundadores (fundador N° 5 [Fo5]) en las generaciones posteriores de ratones FVB mediante el trasplante en serie de fragmentos de tumor (~2 x 2 mm de tamaño). Todos los estudios se realizaron de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Se administró cada conjugado de anticuerpo-fármaco (dosis única) a nueve animales por vía intravenosa al inicio del estudio, y 14 días después del trasplante. El tamaño inicial del tumor era de un volumen de aproximadamente 200 mm³. Las mediciones de la inhibición del crecimiento tumoral a lo largo del tiempo mediante los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención y los controles se muestran en las Figuras 5a, 5b y 6.

45

Listado de secuencias

<110> GENENTECH, INC.
 5 <120> CONJUGADOS DE ANTICUERPO Y DE ALANINIL-MAITANSINOL
 <130> P4497R1-WO
 <141> 16-11-2011
 10 <150> US 61/414.535
 <151> 17-11-2010
 <160> 98
 15 <210> 1
 <211>9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 1

Glu Val Gln Cys Val Glu Ser Gly Gly
 1 5

25 <210> 2
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 2

Gln Leu Val Glu Ser Cys Gly Gly Leu Val Gln
 1 5 10

35 <210>3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400>3

Val Glu Ser Gly Gly Cys Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10

45 <210>4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 4

Gly Gly Ser Leu Arg Cys Ser Cys Ala Ala Ser
 1 5 10

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

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

10 <400> 5

Leu Arg Leu Ser Cys Cys Ala Ser Gly Phe Asn
 1 5 10

15 <210>6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

20 <400> 6

Ser Cys Ala Ala Ser Cys Phe Asn Ile Lys Asp
 1 5 10

25 <210>7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

30 <400> 7

Cys Ala Ala Ser Gly Cys Asn Ile Lys Asp Thr
 1 5 10

35 <210>8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

40 <400> 8

Phe Asn Ile Lys Asp Cys Tyr Ile His Trp Val
 1 5 10

45 <210>9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia se sintetiza

<400> 9

Ile His Trp Val Arg Cys Ala Pro Gly Lys Gly
 1 5 10

5 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 10

Trp Val Arg Gln Ala Cys Gly Lys Gly Leu Glu
 1 5 10

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

20 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 11

Arg Gln Ala Pro Gly Cys Gly Leu Glu Trp Val
 1 5 10

25 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 12

Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

35 <210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 13

Gly Lys Gly Leu Glu Cys Val Ala Arg Ile Tyr
 1 5 10

45 <210> 14
 <211> 11

ES 2 544 608 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> la secuencia se sintetiza

<400> 14

Thr Arg Tyr Ala Asp Cys Val Lys Gly Arg Phe
1 5 10

10 <210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> la secuencia se sintetiza

<400> 15

Ser Val Lys Gly Arg Cys Thr Ile Ser Ala Asp
1 5 10

20 <210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> la secuencia se sintetiza

<400> 16

Phe Thr Ile Ser Ala Cys Thr Ser Lys Asn Thr
1 5 10

30 <210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> la secuencia se sintetiza

<400> 17

Ser Ala Asp Thr Ser Cys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10

40 <210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> la secuencia se sintetiza

<400> 18

Asp Thr Ser Lys Asn Cys Ala Tyr Leu Gln Met
1 5 10

<210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

<400> 19

Ser Lys Asn Thr Ala Cys Leu Gln Met Asn Ser
1 5 10

10

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

<400> 20

Lys Asn Thr Ala Tyr Cys Gln Met Asn Ser Leu
1 5 10

20

<210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

<400> 21

Asn Thr Ala Tyr Leu Cys Met Asn Ser Leu Arg
1 5 10

30

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

<400> 22

Leu Gln Met Asn Ser Cys Arg Ala Glu Asp Thr
1 5 10

40

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

45

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

<400> 23

ES 2 544 608 T3

Met Asn Ser Leu Arg Cys Glu Asp Thr Ala Val
 1 5 10

<210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 10 <400> 24

Ser Leu Arg Ala Glu Cys Thr Ala Val Tyr Tyr
 1 5 10

<210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 20 <400> 25

Ala Glu Asp Thr Ala Cys Tyr Tyr Cys Ser Arg
 1 5 10

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 30 <400> 26

Glu Asp Thr Ala Val Cys Tyr Cys Ser Arg Trp
 1 5 10

<210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 40 <400> 27

Val Tyr Tyr Cys Ser Cys Trp Gly Gly Asp Gly
 1 5 10

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 544 608 T3

<223> la secuencia se sintetiza

<400> 28

Tyr Cys Ser Arg Trp Cys Gly Asp Gly Phe Tyr
1 5 10

5 <210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 29

Gly Phe Tyr Ala Met Cys Tyr Trp Gly Gln Gly
1 5 10

15 <210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 30

Asp Tyr Trp Gly Gln Cys Thr Leu Val Thr Val
1 5 10

25 <210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 31

Gln Gly Thr Leu Val Cys Val Ser Ser Ala Ser
1 5 10

35 <210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 32

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

45 <210> 33
 <211> 11
 <212> PRT

ES 2 544 608 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia se sintetiza

5

<400> 33

Ser Ala Ser Thr Lys Cys Pro Ser Val Phe Pro
1 5 10

<210> 34

<211> 11

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia se sintetiza

15

<400> 34

Lys Ser Thr Ser Gly Cys Thr Ala Ala Leu Gly
1 5 10

<210> 35

<211> 11

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia se sintetiza

25

<400> 35

Val Lys Asp Tyr Phe Cys Glu Pro Val Thr Val
1 5 10

<210> 36

<211> 11

30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia se sintetiza

35

<400> 36

Val Thr Val Ser Trp Cys Ser Gly Ala Leu Thr
1 5 10

<210> 37

<211> 11

40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia se sintetiza

45

<400> 37

ES 2 544 608 T3

Thr Val Ser Trp Asn Cys Gly Ala Leu Thr Ser
 1 5 10

5 <210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 10 <400> 38

Val Ser Trp Asn Ser Cys Ala Leu Thr Ser Gly
 1 5 10

15 <210> 39
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 20 <400> 39

Ser Gly Ala Leu Thr Cys Gly Val His Thr Phe
 1 5 10

25 <210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 30 <400> 40

Ser Gly Val His Thr Cys Pro Ala Val Leu Gln
 1 5 10

35 <210> 41
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 40 <400> 41

Leu Ser Ser Val Val Cys Val Pro Ser Ser Ser
 1 5 10

45 <210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 544 608 T3

<223> la secuencia se sintetiza

<400> 42

Val Thr Val Pro Ser Cys Ser Leu Gly Thr Gln
1 5 10

5 <210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 43

Ser Leu Gly Thr Gln Cys Tyr Ile Cys Asn Val
1 5 10

15 <210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 44

Thr Tyr Ile Cys Asn Cys Asn His Lys Pro Ser
1 5 10

25 <210> 45
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 45

Asn His Lys Pro Ser Cys Thr Lys Val Asp Lys
1 5 10

35 <210> 46
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 46

His Lys Pro Ser Asn Cys Lys Val Asp Lys Lys
 1 5 10

5 <210> 47
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

10 <400> 47

Pro Ser Asn Thr Lys Cys Asp Lys Lys Val Glu
 1 5 10

15 <210> 48
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

20 <400> 48

Thr Lys Val Asp Lys Cys Val Glu Pro Lys Ser
 1 5 10

25 <210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

30 <400> 49

Lys Ser Cys Asp Lys Cys His
 1 5

35 <210> 50
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

40 <400> 50

Met Thr Gln Ser Pro Cys Ser Leu Ser Ala Ser
 1 5 10

45 <210>51
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 544 608 T3

<223> la secuencia se sintetiza

<400> 51

Gly Lys Ala Pro Lys Cys Leu Ile Tyr Ser Ala
1 5 10

5 <210> 52
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 52

Pro Lys Leu Leu Ile Cys Ser Ala Ser Phe Leu
1 5 10

15 <210> 53
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 53

Ile Tyr Ser Ala Ser Cys Leu Tyr Ser Gly Val
1 5 10

25 <210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 54

Ser Gly Thr Asp Phe Cys Leu Thr Ile Ser Ser
1 5 10

35 <210> 55
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 55

Gly Thr Asp Phe Thr Cys Thr Ile Ser Ser Leu
1 5 10

45 <210> 56

ES 2 544 608 T3

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 56

Thr Asp Phe Thr Leu Cys Ile Ser Ser Leu Gln
1 5 10

10 <210> 57
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 57

Asp Phe Thr Leu Thr Cys Ser Ser Leu Gln Pro
1 5 10

20 <210> 58
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 58

Thr Leu Thr Ile Ser Cys Leu Gln Pro Glu Asp
1 5 10

30 <210> 59
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 59

Thr Ile Ser Ser Leu Cys Pro Glu Asp Phe Ala
1 5 10

40 <210> 60
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 60

ES 2 544 608 T3

Ile Ser Ser Leu Gln Cys Glu Asp Phe Ala Thr
 1 5 10

5 <210>61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

10 <400> 61

Tyr Cys Gln Gln His Cys Thr Thr Pro Pro Thr
 1 5 10

15 <210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

20 <400> 62

Gln His Tyr Thr Thr Cys Pro Thr Phe Gly Gln
 1 5 10

25 <210> 63
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

30 <400> 63

Thr Pro Pro Thr Phe Cys Gln Gly Thr Lys Val
 1 5 10

35 <210> 64
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

40 <400> 64

Pro Thr Phe Gly Gln Cys Thr Lys Val Glu Ile
 1 5 10

45 <210> 65
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia se sintetiza

<400> 65

Phe Gly Gln Gly Thr Cys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

5 <210> 66
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 66

Gln Gly Thr Lys Val Cys Ile Lys Arg Thr Val
1 5 10

15 <210> 67
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 67

Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val
1 5 10

25 <210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 68

Lys Arg Thr Val Ala Cys Pro Ser Val Phe Ile
1 5 10

35 <210> 69
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 69

Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro
1 5 10

45 <210> 70
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 544 608 T3

<220>
<223> la secuencia se sintetiza

<400> 70

Ala Ala Pro Ser Val Cys Ile Phe Pro Pro Ser
1 5 10

5

<210> 71
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> la secuencia se sintetiza

<400> 71

Pro Ser Val Phe Ile Cys Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10

15

<210> 72
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> la secuencia se sintetiza

<400> 72

Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys
1 5 10

25

<210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> la secuencia se sintetiza

<400> 73

Pro Ser Asp Glu Gln Cys Lys Ser Gly Thr Ala
1 5 10

35

<210> 74
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> la secuencia se sintetiza

<400> 74

Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val
1 5 10

45

<210> 75
<211> 11
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia se sintetiza

5

<400> 75

Gln Leu Lys Ser Gly Cys Ala Ser Val Val Cys
1 5 10

<210> 76

<211> 11

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia se sintetiza

15

<400> 76

Leu Lys Ser Gly Thr Cys Ser Val Val Cys Leu
1 5 10

<210> 77

<211> 11

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia se sintetiza

25

<400> 77

Lys Ser Gly Thr Ala Cys Val Val Cys Leu Leu
1 5 10

<210> 78

<211> 11

30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia se sintetiza

35

<400> 78

Val Val Cys Leu Leu Cys Asn Phe Tyr Pro Arg
1 5 10

<210> 79

<211> 11

40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia se sintetiza

45

<400> 79

Val Cys Leu Leu Asn Cys Phe Tyr Pro Arg Glu
1 5 10

<210> 80

ES 2 544 608 T3

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 80

Leu Leu Asn Asn Phe Cys Pro Arg Glu Ala Lys
1 5 10

10 <210> 81
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 81

Asn Asn Phe Tyr Pro Cys Glu Ala Lys Val Gln
1 5 10

20 <210> 82
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 82

Phe Tyr Pro Arg Glu Cys Lys Val Gln Trp Lys
1 5 10

30 <210> 83
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 83

Arg Glu Ala Lys Val Cys Trp Lys Val Asp Asn
1 5 10

40 <210> 84
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 84

Ala Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu
 1 5 10

5 <210> 85
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

10 <400> 85

Val Gln Trp Lys Val Cys Asn Ala Leu Gln Ser
 1 5 10

15 <210> 86
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

20 <400> 86

Val Asp Asn Ala Leu Cys Ser Gly Asn Ser Gln
 1 5 10

25 <210> 87
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

30 <400> 87

Gln Ser Gly Asn Ser Cys Glu Ser Val Thr Glu
 1 5 10

35 <210> 88
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia se sintetiza

40 <400> 88

Leu Thr Leu Ser Lys Cys Asp Tyr Glu Lys His
 1 5 10

45 <210> 89
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 544 608 T3

<220>
<223> la secuencia se sintetiza

<400> 89

Thr Leu Ser Lys Ala Cys Tyr Glu Lys His Lys
1 5 10

5

<210> 90
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> la secuencia se sintetiza

<400> 90

Lys Ala Asp Tyr Glu Cys His Lys Val Tyr Ala
1 5 10

15

<210> 91
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> la secuencia se sintetiza

<400> 91

Tyr Ala Cys Glu Val Cys His Gln Gly Leu Ser
1 5 10

25

<210> 92
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> la secuencia se sintetiza

<400> 92

Glu Val Thr His Gln Cys Leu Ser Ser Pro Val
1 5 10

35

<210> 93
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> la secuencia se sintetiza

<400> 93

ES 2 544 608 T3

Val Thr His Gln Gly Cys Ser Ser Pro Val Thr
 1 5 10

5 <210> 94
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 10 <400> 94

His Gln Gly Leu Ser Cys Pro Val Thr Lys Ser
 1 5 10

15 <210> 95
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 20 <400> 95

Gln Gly Leu Ser Ser Cys Val Thr Lys Ser Phe
 1 5 10

25 <210> 96
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 30 <400> 96

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

35 <210> 97
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia se sintetiza
 40 <400> 97

Leu Ser Ser Pro Val Cys Lys Ser Phe Asn Arg
 1 5 10

<210> 98
 <211> 11
 <212> PRT

ES 2 544 608 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia se sintetiza

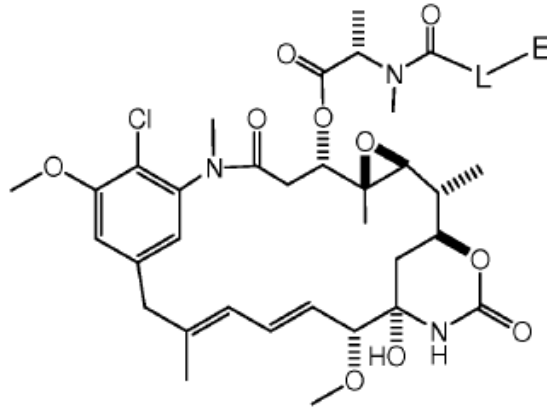
5

<400> 98

Ser Ser Pro Val Thr Cys Ser Phe Asn Arg Gly
1 5 10

REIVINDICACIONES

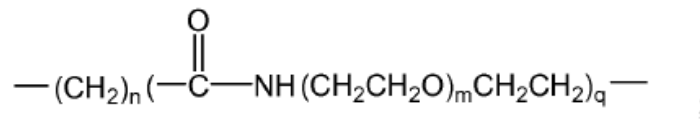
1. Un compuesto seleccionado de la Fórmula I:



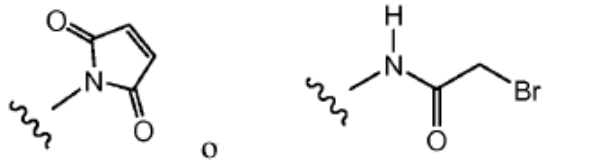
I

5 en la que:

L es:



E es

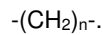


10

n es 2, 3, 4, 5 o 6;
m es 2, 3 o 4; y
q es 0 o 1.

15

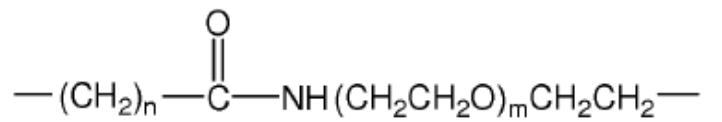
2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que L es



20

3. El compuesto de la reivindicación 2, en el que n es 5.

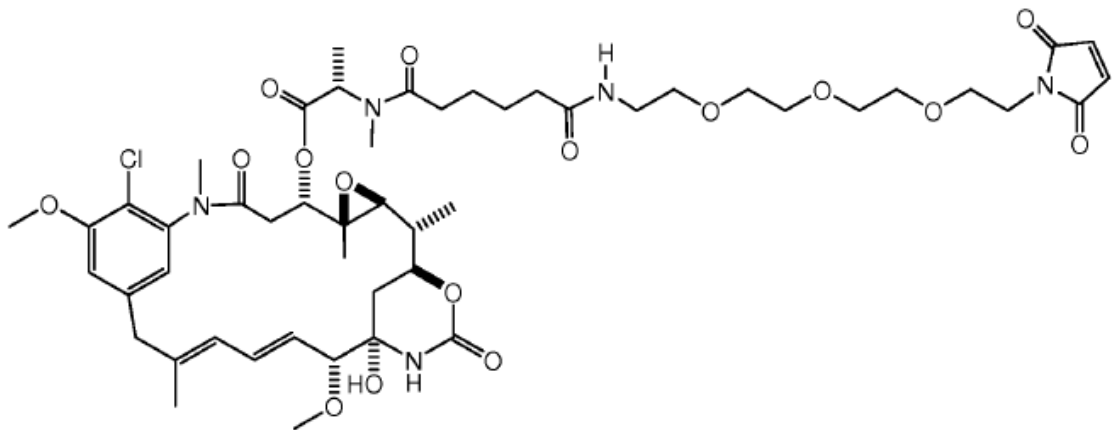
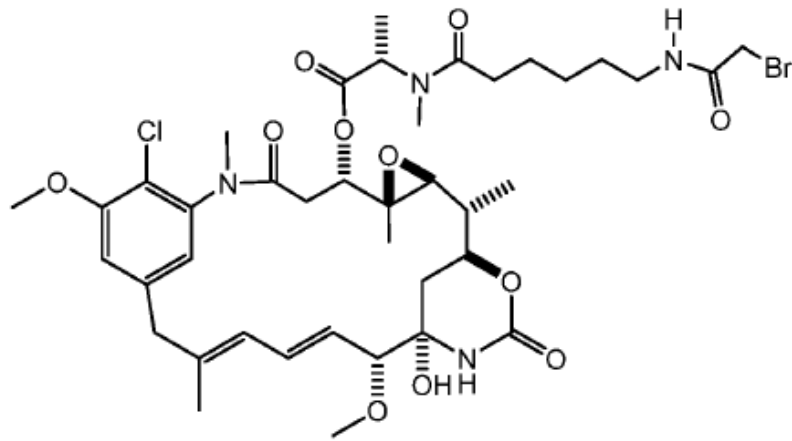
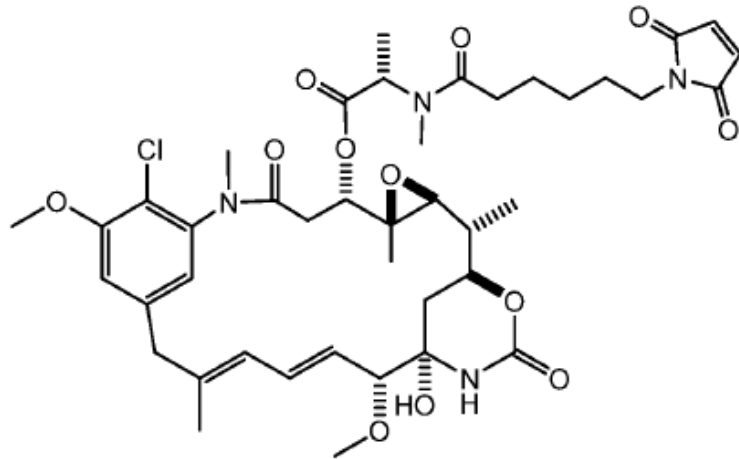
4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que L es:

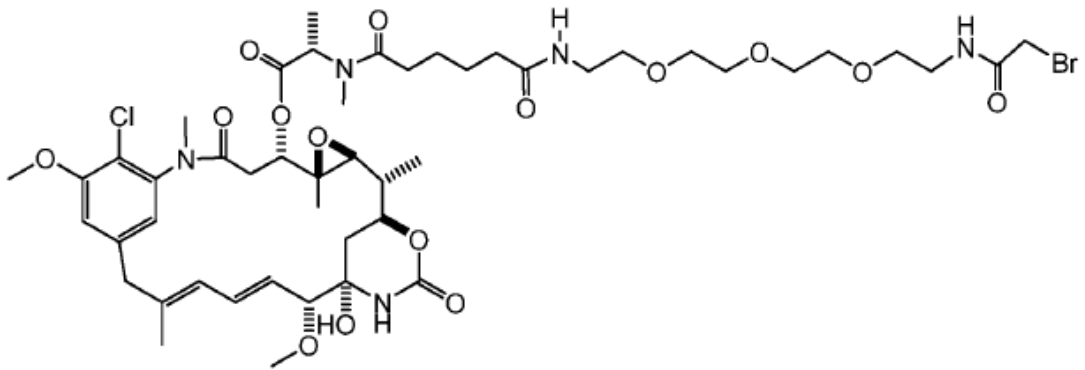


25

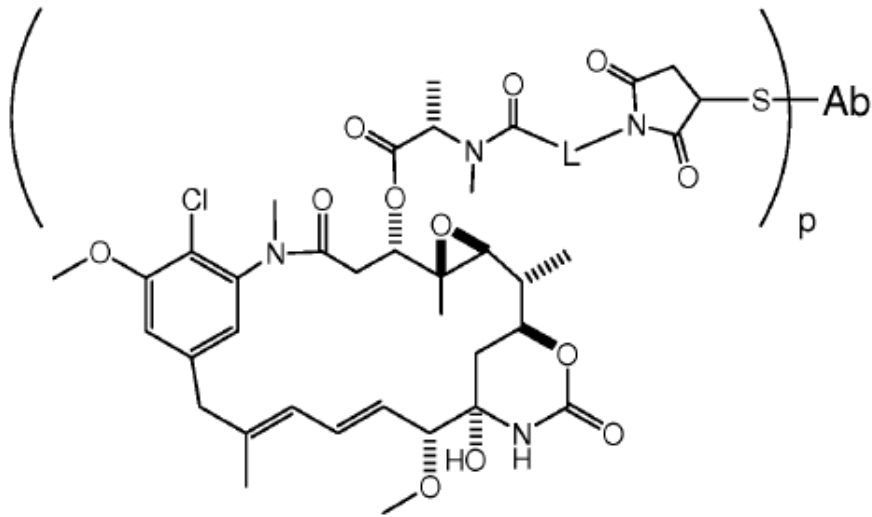
5. El compuesto de la reivindicación 4, en el que n es 4 y m es 3.

6. El compuesto de la reivindicación 1 que tiene la estructura:

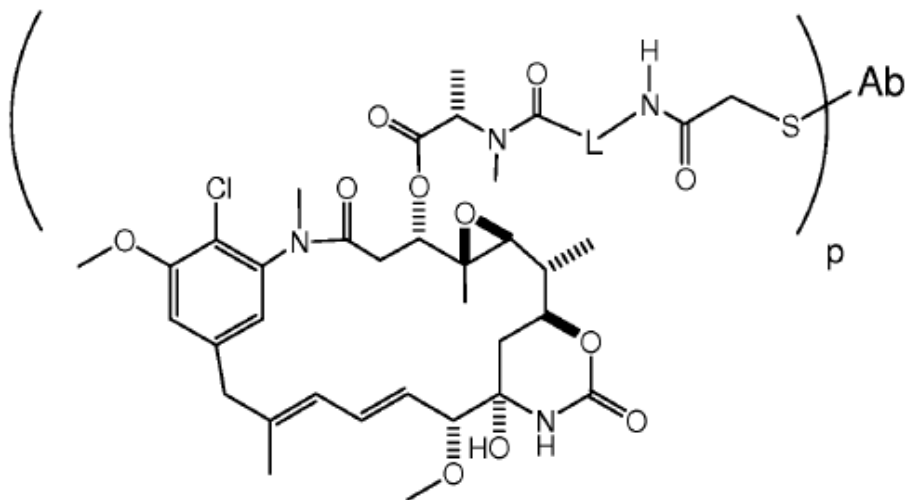




7. Un conjugado de anticuerpo-fármaco seleccionado de las Fórmulas Ia o Ib:



Ia

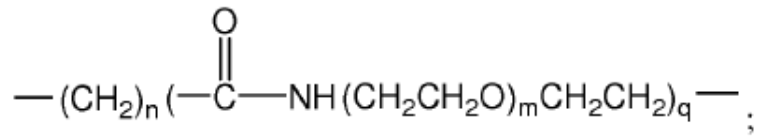


Ib

5

en las que:

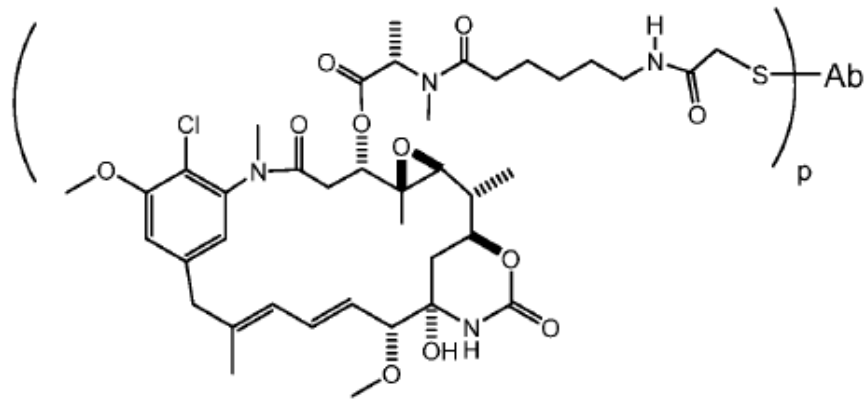
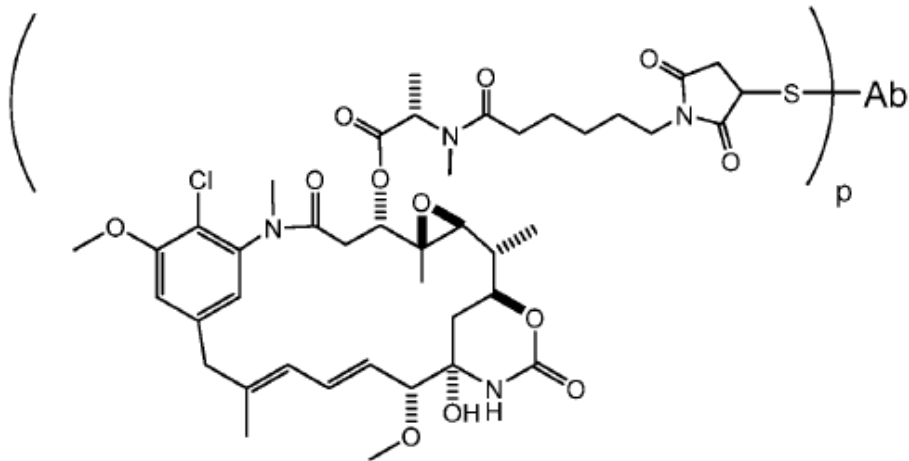
L es



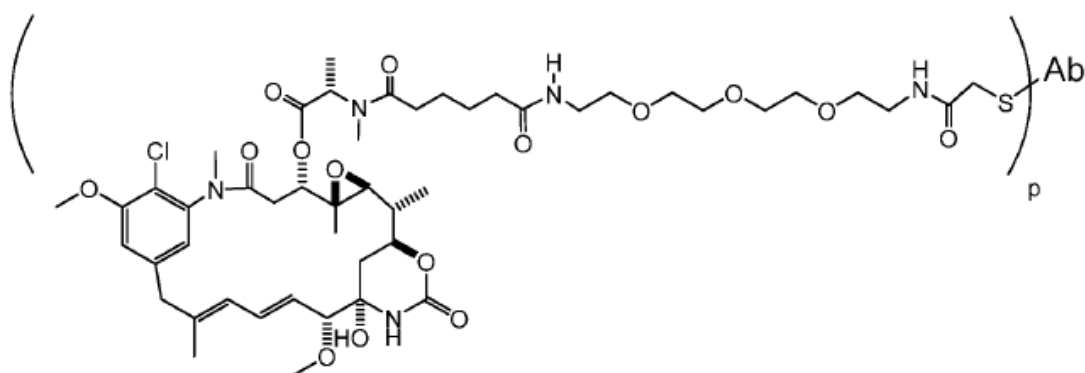
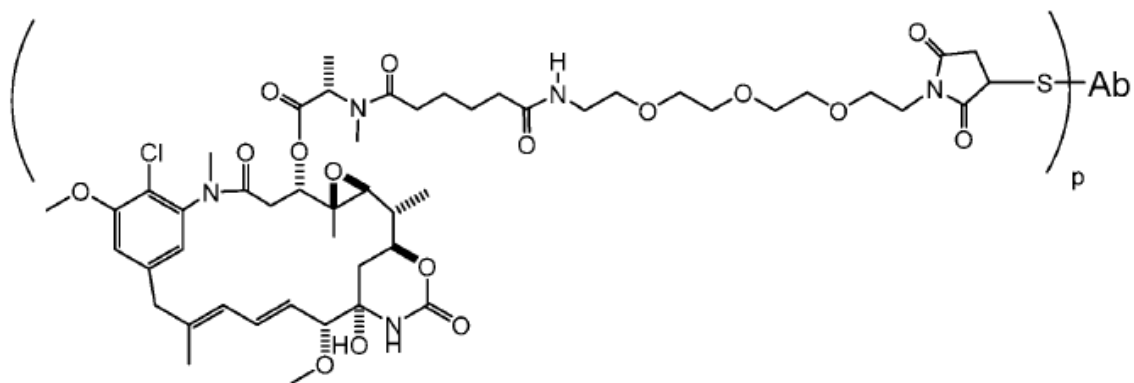
n es 2, 3, 4, 5 o 6;
 m es 2, 3 o 4;
 q es 0 o 1;
 p es 1 a 4; y
 Ab es un anticuerpo.

5

8. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 7 seleccionado de las estructuras:



10



9. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 8 en el que el anticuerpo es un anticuerpo modificado genéticamente con cisteína (Ab) conjugado a través de un aminoácido de cisteína libre a un enlazador (L).

5

10. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 9, en el que:

el aminoácido de cisteína libre del anticuerpo modificado genéticamente con cisteína es A118C (numeración de UE) de la cadena pesada; o el aminoácido de cisteína libre del anticuerpo modificado genéticamente con cisteína es V205C (numeración de Kabat) de la cadena ligera; o el anticuerpo modificado genéticamente con cisteína comprende un aminoácido de cisteína libre y una secuencia de la cadena pesada seleccionada entre las SEC ID N° 1-49 o una secuencia de la cadena ligera seleccionada entre las SEC ID N° 50-98, en las que una cisteína de la secuencia es el aminoácido de cisteína libre.

10

11. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 9 o de la reivindicación 10, en el que el anticuerpo modificado genéticamente con cisteína se prepara mediante un proceso que comprende:

15

- (i) someter a mutagénesis una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo modificado genéticamente con cisteína;
- (ii) expresar el anticuerpo modificado genéticamente con cisteína; y
- (iii) aislar y purificar el anticuerpo modificado genéticamente con cisteína.

20

12. El conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el anticuerpo modificado genéticamente con cisteína se selecciona entre un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado y un fragmento Fab.

25

13. El conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que el anticuerpo modificado genéticamente con cisteína se prepara mediante un proceso que comprende reemplazar uno o más restos de aminoácido de un anticuerpo parental por uno o más aminoácidos de cisteína libres, donde el anticuerpo parental se une selectivamente a un antígeno y el anticuerpo modificado genéticamente con cisteína se une selectivamente al mismo antígeno que el anticuerpo parental.

30

14. El conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en el que el anticuerpo se une a uno o más receptores (1)-(51):

35

- (1) BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB);
- (2) E16 (LAT1, SLC7A5);

- (3) STEAP1 (seis antígenos epiteliales transmembrana de próstata);
 (4) 0772P (CA125, MUC16);
 (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina);
 5 (6) Napi3b (NAPI-3B, NPT11b, SLC34A2, familia de portadores de soluto 34 (fostato sódico), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente del sodio de tipo II);
 (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y similar al tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B);
 (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN ADNc 2700050C12, gen RIKEN ADNc 2700050C12);
 10 (9) ETBR (receptor de endotelina de tipo B);
 (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315);
 (11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, seis antígenos epiteliales transmembrana de próstata 2, seis proteínas de próstata transmembrana);
 15 (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico de potencial receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4);
 (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma);
 (14) CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus de Epstein Barr) o Hs.73792);
 20 (15) CD79b (CD79B, CD79β, Igb (β asociado a inmunoglobulina), B29);
 (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a de anclaje de fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C);
 (17) HER2;
 (18) NCA;
 (19) MDP;
 25 (20) IL20Rα;
 (21) Brevican;
 (22) EphB2R;
 (23) ASLG659;
 (24) PSCA;
 30 (25) GEDA;
 (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, receptor BLyS 3, BR3);
 (27) CD22 (isoforma CD22-B del receptor de linfocitos B);
 (28) CD79a (CD79A, CD79α, α asociado a inmunoglobulina);
 (29) CXCR5 (receptor 1 del linfoma de Burkitt);
 35 (30) HLA-DOB (subunidad β de la molécula de clase II del MHC);
 (31) P2X5 (canal iónico 5 dependiente de ligando P2X del receptor purinérgico);
 (32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de los linfocitos B, Lyb-2);
 (33) LY64 (antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repeticiones ricas en leucina (LRR));
 40 (34) FcRH1 (proteína 1 de tipo receptor de Fc);
 (35) IRTA2 (translocación asociada al receptor 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas);
 (36) TENB2 (supuesto proteoglicano transmembrana);
 (37) PMEL17 (homólogo de plata; SILV; D12S53E; PMEL17; (SI); (SIL); ME20; gp100);
 45 (38) TMEFF1 (proteína transmembrana con dominios de tipo EGF y dos dominios de tipo folistatina 1; Tomorregulina-1; H7365; C9orf2; C9ORF2; U19878; X83961);
 (39) GDNF-Ra1 (receptor α1 de la familia GDNF; GFRA1; GDNFR; GDNFRA; RETL1; TRNR1; RET1L; GDNFR-α1; GFR-ALPHA-1; U95847; BC014962);
 (40) Ly6E (complejo de antígenos de linfocitos 6, locus E; Ly67, RIG-E, SCA-2, TSA-1);
 (41) TMEM46 (homólogo de shisa 2 (*Xenopus laevis*); SHISA2);
 50 (42) Ly6G6D (complejo de antígenos de linfocitos 6, locus G6D; Ly6-D, MEGT1);
 (43) LGR5 (receptor 5 acoplado a la proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina; GPR49, GPR67);
 (44) RET (proto-oncogén ret; MEN2A; HSCR1; MEN2B; MTC1; (PTC); CDHF12; Hs.168114; RET51; RET-ELE1);
 (45) LY6K (complejo de antígenos de linfocitos 6, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226);
 55 (46) GPR19 (receptor 19 acoplado a la proteína G; Mm 4787);
 (47) GPR54 (receptor KISS1; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR12);
 (48) ASPHD1 (dominio 1 que contiene aspartato β-hidroxilasa; LOC253982);
 (49) Tirosinasa (TYR; OCAIA; OCA1A; tirosinasa; SHEP3);
 (50) TMEM118 (proteína de dedo anular, transmembrana 2; RNFT2; FLJ14627) y
 60 (51) GPR172A (receptor 172A acoplado a la proteína G; GPCR41; FLJ11856; D15Erttd747e).

15. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, y un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

65 16. La composición farmacéutica de la reivindicación 15 que comprende además una cantidad terapéuticamente

eficaz de un agente quimioterapéutico.

- 5 17. Un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14 para su uso en terapia.
18. Un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14 para su uso en un método de tratamiento del cáncer que comprende administrar a un paciente el compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco.
- 10 19. El compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco para su uso en un método de tratamiento de la reivindicación 18, en el que el paciente recibe un agente quimioterapéutico en combinación con el compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco.
- 15 20. El uso de un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 10 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un mamífero.
21. Un artículo de fabricación que comprende:
un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14;
un recipiente; y
- 20 un prospecto o una etiqueta que indiquen que el compuesto se puede usar para tratar el cáncer.

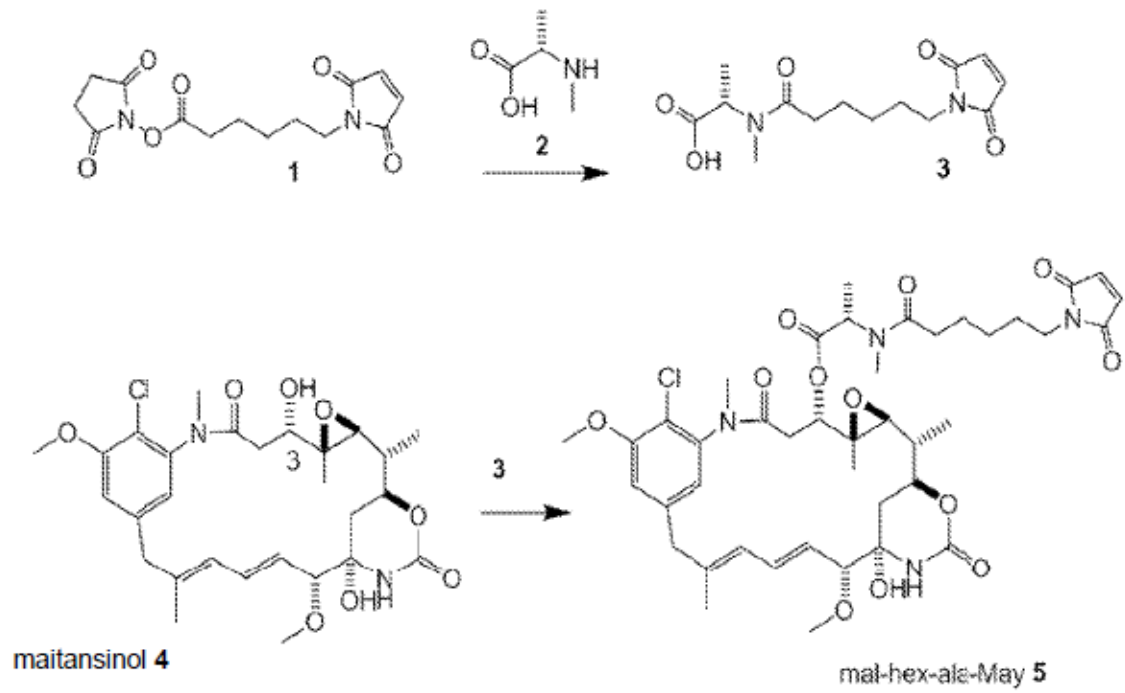


Figura 1a

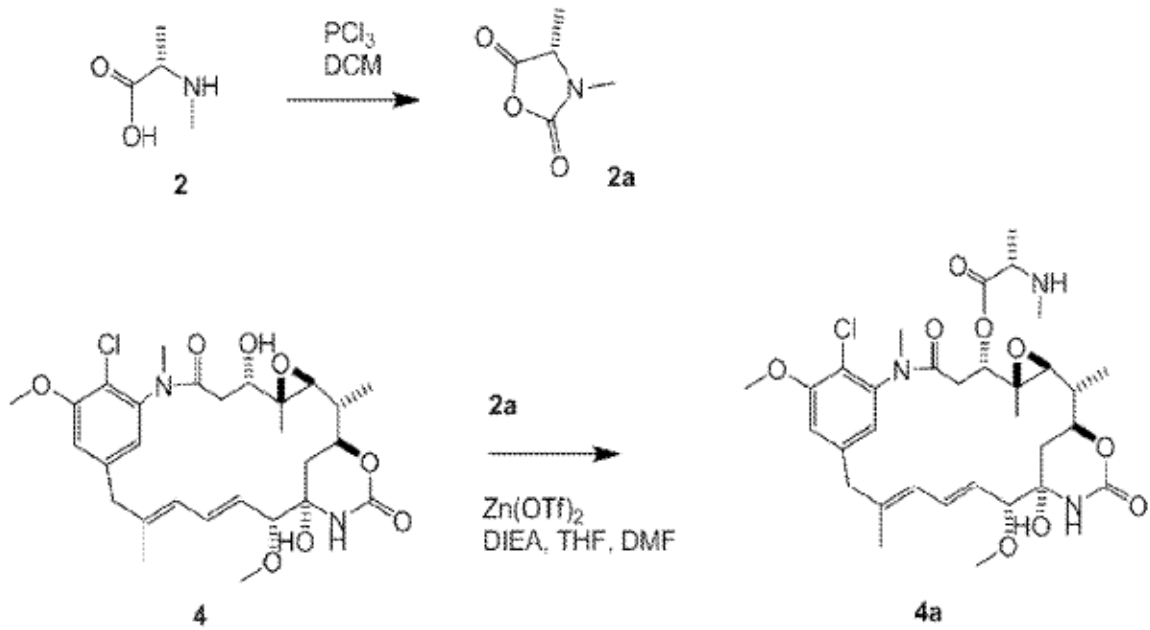


Figura 1b

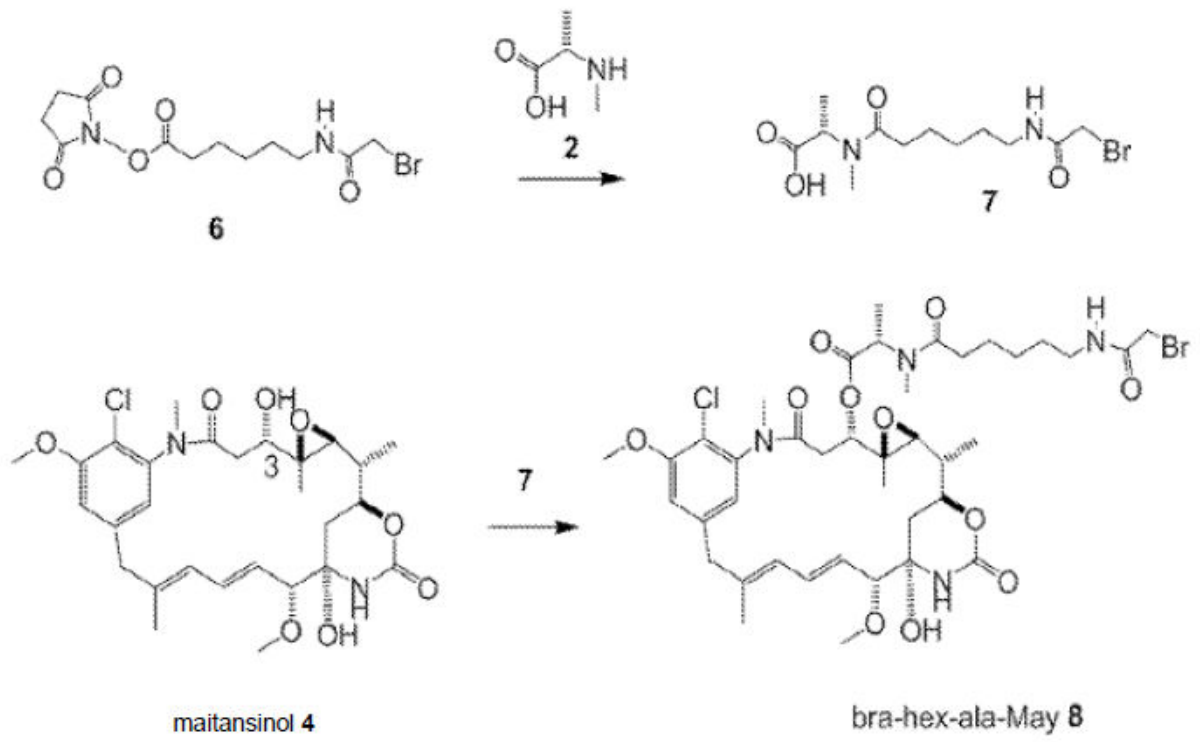


Figura 2

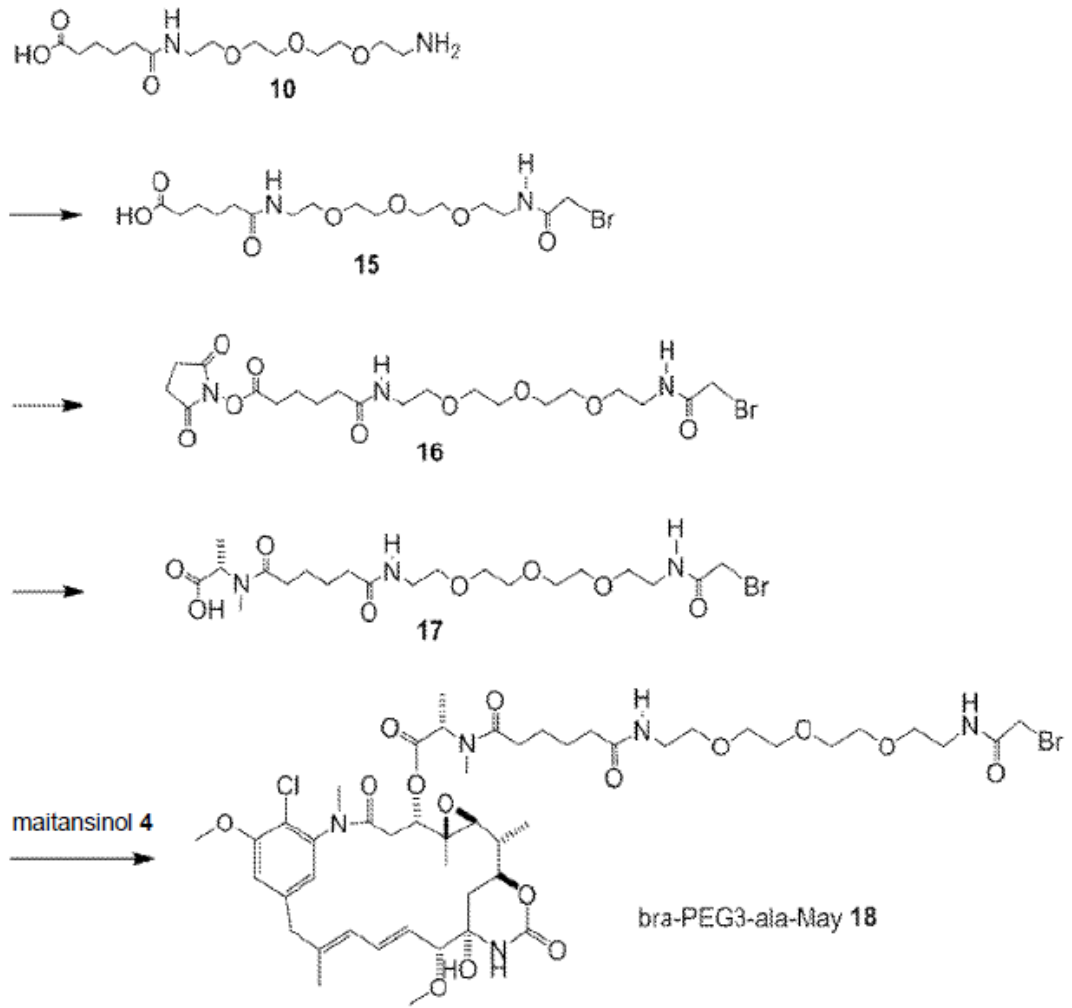


Figura 4

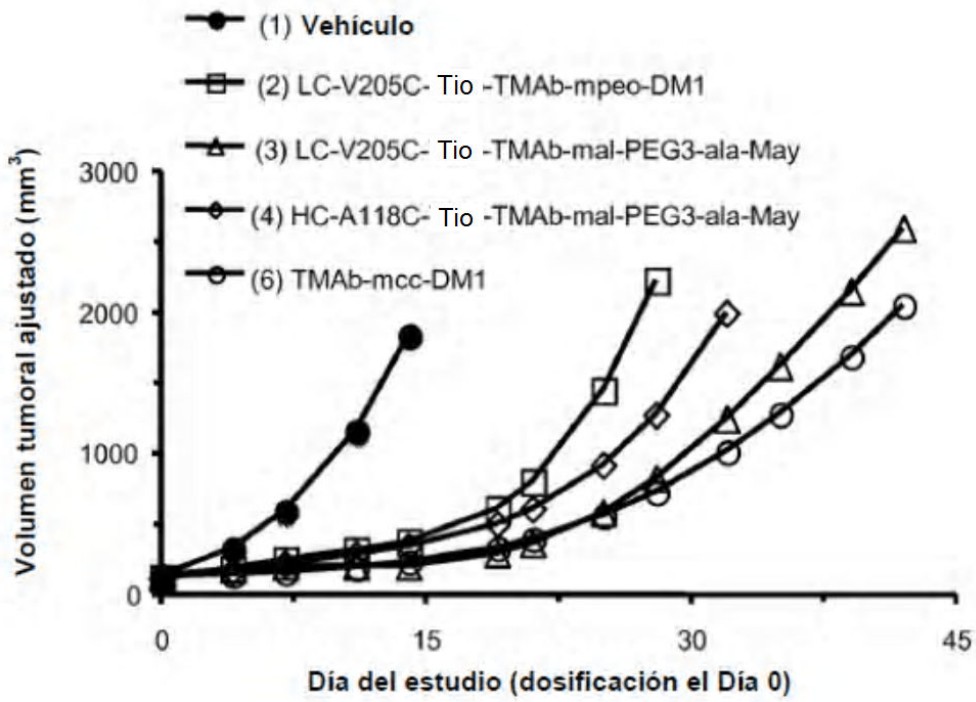


Figura 5a

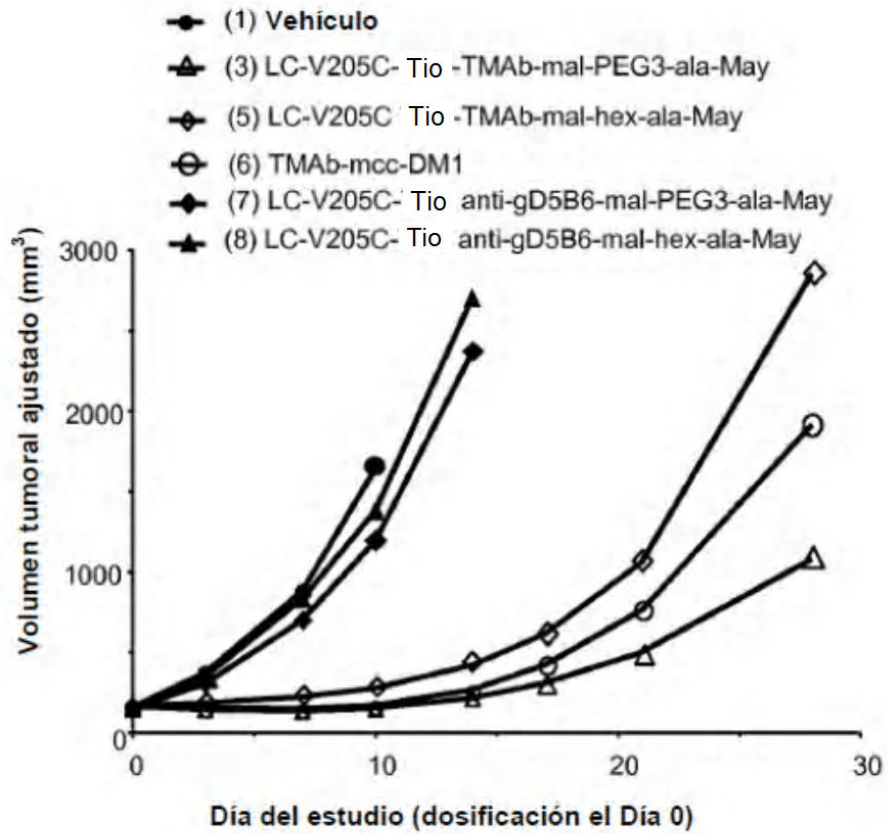
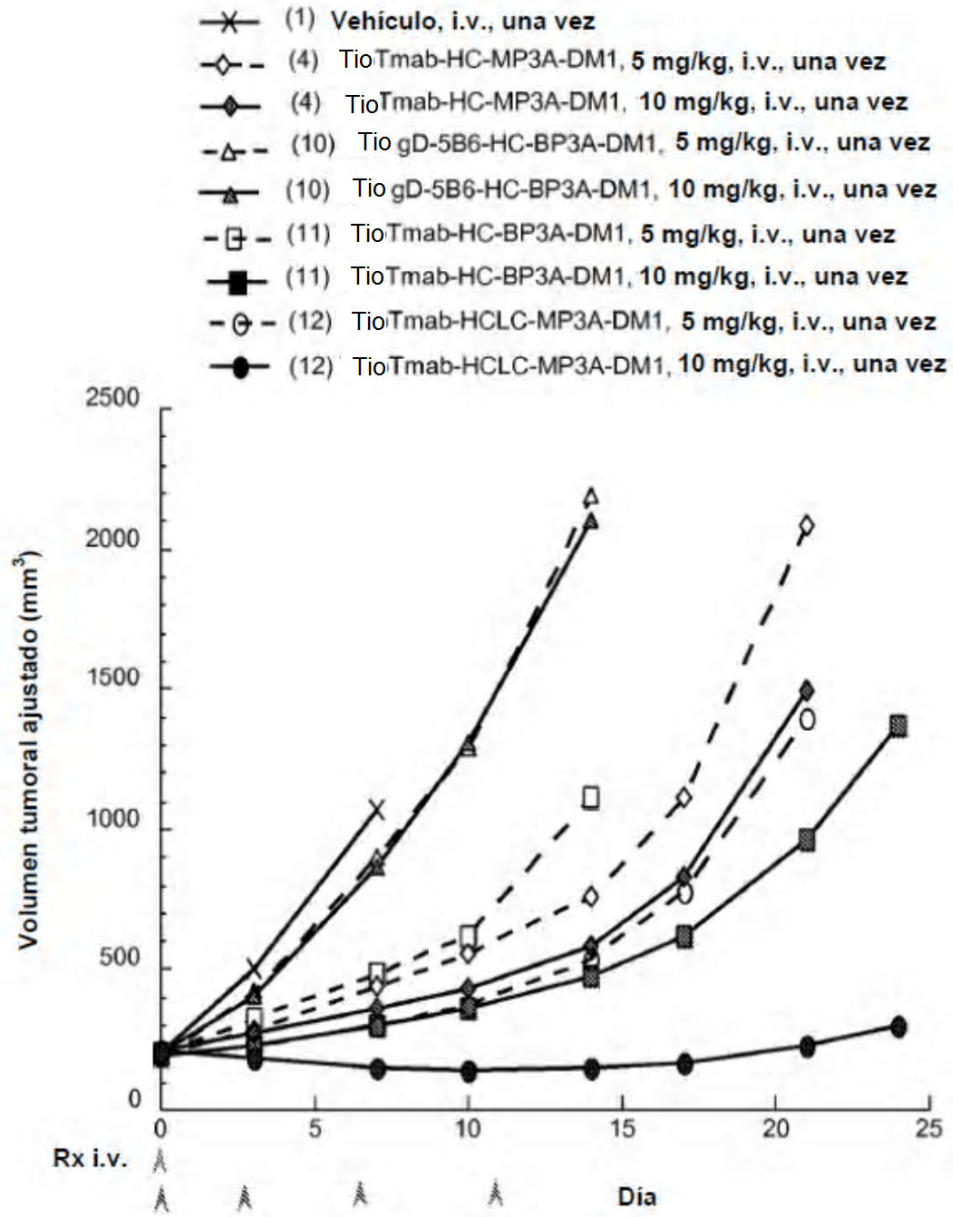


Figura 5b



Recogida PK

Figura 6