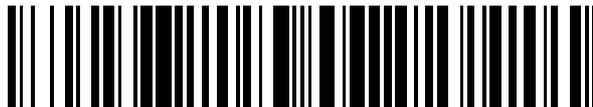


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 805**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2005 E 05811919 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 1791565**

54 Título: **Anticuerpos y conjugados modificados por ingeniería genética con cisteína**

30 Prioridad:

**23.09.2004 US 612468 P**  
**30.06.2005 US 696353 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.08.2016**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)**  
**1 DNA WAY**  
**SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**EIGENBROT, CHARLES W.;**  
**JUNUTULA, JAGATH REDDY;**  
**LOWMAN, HENRY;**  
**RAAB, HELGA E. y**  
**VANDLEN, RICHARD**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 579 805 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos y conjugados modificados por ingeniería genética con cisteína

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procesos para producir anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína, conjugados de anticuerpo-fármaco formados entre un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína y un resto de fármaco, a composiciones farmacéuticas y usos médicos de los conjugados anticuerpo-fármaco y a métodos de cribado de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína para detectar la reactividad del tiol.

15 **Antecedentes de la invención**

La terapia con anticuerpos se ha establecido para el tratamiento dirigido de pacientes con cáncer, afecciones inmunológicas y angiogénicas. En los intentos por descubrir dianas celulares eficaces para el diagnóstico del cáncer y la terapia con anticuerpos, los investigadores han buscado identificar polipéptidos transmembrana o de otro modo asociados a tumores que se expresan específicamente en la superficie de las células cancerosas en comparación con una célula o células normales, no cancerosas. La identificación de dichos polipéptidos antígenos de la superficie celular asociados a tumores, es decir, antígenos asociados a tumores (TAA), ha dado lugar a la capacidad de dirigirse específicamente a las células cancerosas para la destrucción a través de terapias basadas en anticuerpos.

El uso de conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), es decir, inmunoconjugados para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para eliminar o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Lambert, J. (2005) *Curr. Opin. in Pharmacology* 5:543-549; Wu et al (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drug Del. Rev.* 26:151-172; US 4975278) permite teóricamente la administración dirigida del resto de fármaco a los tumores y la acumulación intracelular en los mismos, donde la administración sistémica de estos fármacos no conjugados puede dar lugar a niveles inaceptables de toxicidad para las células normales, además de para las células del tumor que se pretende eliminar (Baldwin et al (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) *Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,*" in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al (ed.s), pp. 475-506). Con ello se busca la eficacia máxima con un mínimo de toxicidad. Los esfuerzos para diseñar y perfeccionar los ADC se han centrado en la selectividad de los anticuerpos monoclonales (mAb), así como en las propiedades de unión a fármacos y de liberación de fármacos (Lambert, J. (2005) *Curr. Opin. in Pharmacology* 5:543-549). En estas estrategias se ha descrito la utilidad tanto de los anticuerpos policlonales como de los anticuerpos monoclonales (Rowland et al (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183-87). Los fármacos utilizados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland et al (1986) *supra*). Las toxinas utilizadas en los conjugados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como la toxina de la difteria, toxinas de plantas tales como ricina, toxinas de molécula pequeña, tales como geldanamicina (Mandler et al (2000) *J. of the NatL Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:8618-8623) y caliqueamicina (Lode et al (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al (1993) *Cancer Res.* 53: 3336-3342). Las toxinas pueden llevar a cabo sus efectos citostáticos y citotóxicos mediante mecanismos que incluyen la unión a tubulina, unión a ADN o la inhibición de la topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con grandes anticuerpos o ligandos de receptores de proteínas.

Un conjugado anticuerpo-radioisótopo ha sido aprobado. ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) está compuesto de un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra sobre la superficie de linfocitos B normales y malignos y el radioisótopo <sup>111</sup>In o <sup>90</sup>Y que está unido por un enlace tiourea al quelante (Wiseman et al (2000) *Eur. J. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN® tiene actividad contra el linfoma no Hodgkin (LNH) de linfocitos B, la administración tiene como resultados citopenias intensas y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo anti-CD33 hu unido a caliqueamicina, se aprobó en 2000 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7): 686; patentes US-4970198; US-5079233; US-5585089; US-5606040; US-5693762; US-5739116; US-5767285; US-5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo anti-huC242 unido a través de un enlace disulfuro SPP al resto de fármaco maitansinoide, DM1 (Xie et al (2004) *J. of Pharm. and Exp. Ther.* 308(3): 1073-82), ha avanzado a la fase II de ensayos clínicos para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como el cáncer de colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal anti-antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) ligado al resto de fármaco maitansinoide, DM1, se encuentra en desarrollo para el potencial tratamiento de los tumores de próstata.

Los péptidos auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina (documento WO 02/088172), se han conjugado con: (i) anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos de Lewis Y en carcinomas); (ii) cAC10 que es específico de CD30 en tumores hematológicos (Klussman, et al (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15 (4): 765-773; Doronina et al (2003) *Nature Biotechnology* 21 (7): 778-784; Francisco et al (2003) *Blood* 102(4):1458-65); documento US 2004/0018194; (iii) anticuerpos anti-CD20, tales como rituxan (WO 04/032828) para el tratamiento de los cánceres que expresan el CD20 y afecciones inmunitarias; (iv) anticuerpos anti-EphB2R 2H9 y anti-IL-8 para el tratamiento de cáncer colorrectal (Mao et al (2004) *Cancer Research* 64(3):781-788); (v) anticuerpo E-selectina (Bhaskar et al (2003) *Cancer Res.* 63:6387-6394) y (vi) otros anticuerpos anti-CD30 (documento WO 03/043583). Las variantes de auristatina E se divulgan en los documentos US 5767237 y US 6124431. La monometil auristatina E conjugada con anticuerpos monoclonales se divulga en Senter et al, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volumen 45, Número 623 Resumen, presentado 28 de 2004. Los análogos de auristatina MMAE y MMAF se han conjugado con diversos anticuerpos (documento WO 2005/081711).

Los medios convencionales de unión, es decir, la unión a través de enlaces covalentes, de un resto de fármaco a un anticuerpo conduce generalmente a una mezcla heterogénea de moléculas en las que los restos de fármaco están asociados a un número de sitios en el anticuerpo. Por ejemplo, normalmente los fármacos citotóxicos se han conjugado a anticuerpos a través de los a menudo numerosos residuos de lisina de un anticuerpo, generando una mezcla heterogénea de conjugado anticuerpo-fármaco. Dependiendo de las condiciones de reacción, la mezcla heterogénea contiene generalmente una distribución de anticuerpos con de 0 a aproximadamente 8, o más, restos de fármaco adjunto. Además, dentro de cada subgrupo de conjugados con una relación particular entre número entero de restos de fármaco y anticuerpo, es una mezcla potencialmente heterogénea en la que el resto de fármaco está unido a varios sitios en el anticuerpo. Los métodos analíticos y de preparación son inadecuados para separar y caracterizar las moléculas de especies de conjugado anticuerpo-fármaco dentro de la mezcla heterogénea resultante de una reacción de conjugación. Los anticuerpos son biomoléculas grandes, complejas y estructuralmente diversas, a menudo con muchos grupos funcionales reactivos. Sus reactividades con reactivos enlazadores e intermedios fármaco-enlazador dependen de factores tales como el pH, la concentración, la concentración de sal y los co-disolventes. Además, el proceso de conjugación multietapa puede ser no reproducible debido a las dificultades en el control de las condiciones de reacción y la caracterización de los reactivos y productos intermedios.

Los tioles de la cisteína son reactivos a pH neutro, a diferencia de la mayoría de las aminas, que están protonadas y son menos nucleófilas a un pH cercano a 7. Ya que los grupos tiol libres (RSH, sulfhidrilo) son relativamente reactivos, las proteínas con residuos de cisteína a menudo existen en su forma oxidada como oligómeros unidos por disulfuro o tienen grupos disulfuro internos formando puentes. Las proteínas extracelulares en general no tienen tioles libres (Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, Londres, en la página 55). La cantidad de tiol libre en una proteína se puede estimar mediante el ensayo de Ellman estándar. La inmunoglobulina M es un ejemplo de un pentámero unido por disulfuro, mientras que la inmunoglobulina G es un ejemplo de una proteína con puentes disulfuro internos que las subunidades entre sí. En las proteínas, tales como esta, la reducción de los enlaces disulfuro con un reactivo tal como ditioneitol (DTT) o selenol (Singh et al (2002) *Anal. Biochem.* 304:147-156) es necesaria para generar el reactivo tiol libre. Este enfoque puede tener como resultado la pérdida de la estructura terciaria de los anticuerpos y la especificidad de unión al antígeno.

Los grupos tiol de la cisteína de los anticuerpos son generalmente más reactivos, es decir, más nucleófilos, hacia los reactivos de conjugación electrófilos que los grupos amina o hidroxilo de los anticuerpos. Los residuos de cisteína se han introducido en proteínas por técnicas de ingeniería genética para formar enlaces covalentes con ligandos o para formar nuevos enlaces disulfuro intramoleculares (Better et al (1994) *J. Biol. Chem.* 13:9644-9650; Bernhard et al (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:126-132; Greenwood et al (1994) *Therapeutic Immunology* 1:247-255; Tu et al (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96:4862-4867; Kanno et al (2000) *J. of Biotechnology*, 76:207-214; Chmura et al (2001) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98(15):8480-8484; documento US 6248564). Sin embargo, el diseño de los grupos tiol de la cisteína mediante la mutación de los diversos residuos de aminoácidos de una proteína en aminoácidos de cisteína es potencialmente problemático, particularmente en el caso de los residuos no emparejados (Cis libre) o en los que son relativamente accesibles para la reacción u oxidación. En las soluciones concentradas de la proteína, ya sea en el periplasma de *E. coli*, los sobrenadantes de cultivo, o en la proteína parcialmente o totalmente purificada, los residuos de Cis no emparejados en la superficie de la proteína pueden unirse y oxidarse para formar disulfuros intermoleculares y, por lo tanto, dímeros o multímeros de las proteínas. La formación de un dímero de disulfuro hace que la nueva Cis no sea reactiva para la conjugación con un fármaco, ligando u otro marcador. Por otra parte, si la proteína oxidativamente forma un enlace disulfuro intramolecular entre la Cis de nuevo diseño y un residuo de Cis existente, ambos grupos de Cis no están disponibles para la participación sitio activo y las interacciones en el sitio activo. Además, la proteína puede volverse inactiva o no específica, por un mal plegamiento o la pérdida de estructura terciaria (Zhang et al (2002) *Anal. Biochem.* 311:1-9).

El documento WO 2004/050849 se refiere a inmunotoxinas y su uso en el tratamiento de tumores.

El documento WO 03/049704 se refiere a anticuerpos para tratar el cáncer.

El documento WO 03/060080 se refiere a los dominios variables de la inmunoglobulina canina, anticuerpos caninizados y métodos para su fabricación y su uso.

El documento WO 94/06474 se refiere a un anticuerpo para el tratamiento contra *Helicobacter pylori*.

Shopes B., 1993, Molecular Immunology, Elmsford, NY, US, 30(6): 603-609 se refiere a una IgG humana diseñada por ingeniería genética con una flexibilidad limitada que inicia completamente la citólisis a través del complemento.

Hafner F. T. et al, 2000, Analytical Chemistry, 72(23): 5779-5786, se refiere a un inmunoensayo no competitivo de pequeños analitos a nivel femtomolar por electroforesis capilar con sonda de afinidad y su uso en el análisis directo de la digoxina usando un inmunorreactivo scFv marcado de manera uniforme.

Renard M. et al, 2003, Journal of Molecular Biology, Londres, GB, 326(1): 167-175, se refiere a la derivación de restricciones topológicas de datos funcionales para el diseño de inmunosensores fluorescentes sin reactivos.

Corneillie T. M. et al, 2004, Bioconjugate Chemistry, 15(6):1389-1391 se refiere a un anticuerpo monoclonal 2D12.5 mutante para G54C que tiene una mayor afinidad por los complejos de metales débilmente electrófilos.

Trail P. A. et al, 2003, Cancer Immunology, Immunotherapy: CII, 52(5): 328-337, se refiere a inmunoconjugados de anticuerpos monoclonales con fármaco para el tratamiento específico de cáncer.

Schelte P. et al, 2000, Bioconjugate Chemistry, ACS, Washington, DC, US, 11(1): 118-123, se refiere a la reactividad diferencial de las funciones de maleimida y bromoacetilo con tioles y su aplicación a la preparación de construcciones de diepítopos liposomales.

Lyons A. et al., 1990, Protein Engineering, Oxford University Press, Surrey, GB, 3(8):703-709, se refiere a la unión específica del sitio a anticuerpos recombinantes a través de la introducción de residuos de cisteína.

Wright S. K. et al, 1998, Analytical Biochemistry, 265(1):8-14, se refiere a una evaluación de los métodos para la cuantificación de las cisteínas en las proteínas.

## Sumario

En consecuencia, en una realización, la presente invención proporciona un proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína que comprende uno o más aminoácidos de cisteína libres que tiene un valor de reactividad del tiol en el intervalo de 0,6 a 1,0 y una secuencia en la cadena pesada seleccionada de las SEC ID NOS: 10, 11, 13, 14, 31, 34, 37, 38 y 42:

NSLRCEDTAV (SEQ ID NO:10)  
 LVTVCASASTKGPS (SEQ ID NO:11)  
 LVTVSSCSTKGPS (SEQ ID NO:13)  
 LVTVSSACTKGPS (SEQ ID NO:14)  
 HEDPEVKFNWYVDGCEVHNAKTKPR (SEQ ID NO:31)  
 YKCKVCNKALP (SEQ ID NO:34)  
 KGFYPCDIAVE (SEQ ID NO:37)  
 PPVLDCDGSFF (SEQ ID NO:38)  
 GQGTLLVTVSACSTKGPSVFPL (SEQ ID NO:42)

donde la cisteína en las SEQ ID NOS: 10, 11, 13, 14, 31, 34, 37, 38 y 42 es el aminoácido cisteína libre; o una secuencia en la cadena ligera seleccionada de las SEQ ID NOS: 17, 19, 20, 21, 22, 24, 25 y 27:

SLSASCGDRV (SEQ ID NO:17)  
 EIKRTCAAPSV (SEQ ID NO:19)  
 TCAAPCVFIFPP (SEQ ID NO:20)  
 FIFPPCDEQLK (SEQ ID NO:21)  
 DEQLKCGTASV (SEQ ID NO:22)  
 WKVDNCLQSGN (SEQ ID NO:24)  
 ALQSGCSQESV (SEQ ID NO:25)  
 GLSSPCTKSFN (SEQ ID NO:27)

donde la cisteína en las SEQ ID NOS: 17, 19, 20, 21, 22, 24, 25 y 27 es el aminoácido cisteína libre; en el que el proceso comprende sustituir uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo parental con el residuo de aminoácido cisteína libre, donde el anticuerpo parental se une selectivamente a un antígeno y el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína se une selectivamente al mismo antígeno que el anticuerpo parental; y en el que el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína es un anticuerpo humano, quimérico o humanizado.

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

5 Los residuos de aminoácidos cisteína libres pueden estar situados en las cadenas pesadas o ligeras, o en los dominios constantes o variables. Los fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, Fab, también se puede manipular con uno o más aminoácidos de cisteína en sustitución de los aminoácidos del fragmento de anticuerpo, para formar fragmentos de anticuerpos modificados con cisteína.

10 El proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína puede comprender:

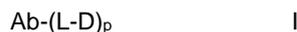
- (i) mutagenizar una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína;
- (ii) expresar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína; y
- (iii) aislar y purificar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína.

15 El proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína puede comprender expresar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína en una partícula viral seleccionada de un fago o una partícula de fagémido.

20 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de cribado de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína en cuanto a la reactividad del tiol que comprende:

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

30 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo (Ab) modificado por ingeniería genética con cisteína que comprende un aminoácido cisteína libre que tiene un valor de reactividad del tiol en el intervalo de 0,6 a 1,0; y un resto de fármaco (D) seleccionado de un maitansinoide, una auristatina, una dolastatina y una caliqueamicina, en el que el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína está unido a través de uno o más aminoácidos de cisteína libres mediante un resto enlazador (L) con D; teniendo el compuesto la Fórmula I:



40 donde p es 1, 2, 3, o 4; y en el que el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína se prepara por un proceso que comprende sustituir uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo parental con el uno o más aminoácidos cisteína libres, donde el anticuerpo parental se une selectivamente a un antígeno y el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína se une selectivamente al mismo antígeno que el anticuerpo parental, en el que el compuesto conjugado anticuerpo-fármaco comprende:

45 una o más secuencias de la cadena pesada seleccionada de las SEQ ID NOS: 10, 11, 13, 14, 31, 34, 37, 38 y 42:

- NSLRCEDTAV (SEQ ID NO:10)
- LVTVCSASTKGPS (SEQ ID NO:11)
- LVTVSSCSTKGPS (SEQ ID NO:13)
- LVTVSSACTKGPS (SEQ ID NO:14)
- HEDPEVKFNWYVDGCEVHNAKTKPR (SEQ ID NO:31)
- YKCKVCNKALP (SEQ ID NO:34)
- 55 KGFYPCDIAVE (SEQ ID NO:37)
- PPVLDCDGSFF (SEQ ID NO:38)
- QGQTLVTVSACSTKGPSVFPL (SEQ ID NO:42)

60 donde la cisteína en las SEQ ID NOS: 10, 11,13, 14, 31, 34, 37, 38 y 42 es el aminoácido cisteína libre; o una o más secuencias de la cadena ligera seleccionada de las SEQ ID NOS: 17, 19, 20, 21, 22, 24, 25 y 27:

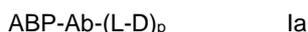
- SLSASCGDRV (SEQ ID NO:17)
- EIKRTCAAPSV (SEQ ID NO:19)
- TCAAPCVFIFPP (SEQ ID NO:20)
- 65 FIFPPCDEQLK (SEQ ID NO:21)
- DEQLKCGTASV (SEQ ID NO:22)

WKVDNCLQSGN (SEQ ID NO:24)  
 ALQSGCSQESV (SEQ ID NO:25)  
 GLSSPCTKSFN (SEQ ID NO:27)

5 donde la cisteína en las SEQ ID NOS: 17, 19, 20, 21, 22, 24, 25 y 27 es el aminoácido cisteína libre y en el que el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína es un ser anticuerpo humano, quimérico o humanizado.

10 Ejemplos de restos de fármaco incluyen DM1, MMAE y MMAF.

El conjugado anticuerpo-fármaco de Fórmula I puede comprender además una secuencia de péptido de unión a albúmina (ABP); teniendo la composición la Fórmula Ia:



15 Otro aspecto de la invención es una composición que comprende un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína o un conjugado anticuerpo-fármaco modificado por ingeniería genética con cisteína y un vehículo o diluyente fisiológicamente o farmacéuticamente aceptable. Esta composición para uso terapéutico es estéril y se puede liofilizar.

20 Otro aspecto de la invención incluye los usos médicos de los conjugados anticuerpo-fármaco y las composiciones divulgadas en la presente memoria. Las composiciones farmacéuticas incluyen combinaciones de compuestos de Fórmula I y uno o más agentes quimioterapéuticos.

25 En algunos aspectos, la presente invención incluye usos médicos de los conjugados anticuerpo-fármaco para el tratamiento del cáncer, por ejemplo donde cuando el cáncer se caracteriza por la sobreexpresión de un receptor ErbB mediante el uso de un conjugado anticuerpo-fármaco de un anticuerpo anti-ErbB.

30 Como alternativa o adicionalmente, la presente invención incluye usos médicos de los conjugados de la presente invención para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, por inhibición del crecimiento de células tumorales que sobreexpresan un receptor del factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en el receptor de HER2 y el receptor de EGF que comprende administrar a un paciente un compuesto conjugado anticuerpo-fármaco que se une específicamente a dicho receptor del factor de crecimiento y un agente quimioterapéutico en el que dicho conjugado anticuerpo-fármaco y dicho Como alternativa o adicionalmente, la presente invención incluye usos médicos de los conjugados de la presente invención para el tratamiento del cáncer en un paciente humano, por ejemplo, un paciente humano susceptible de padecer o diagnosticado con una afección caracterizada por la sobreexpresión del receptor ErbB2, que comprende administrar una cantidad eficaz de una combinación de un compuesto conjugado anticuerpo-fármaco y un agente quimioterapéutico.

#### 40 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra una representación tridimensional del fragmento de anticuerpo hu4D5Fabv7 derivada de las coordenadas de la cristalografía de rayos X. Las posiciones de la estructura de los ejemplos de residuos de Cis modificados por ingeniería genética de las cadenas pesada y ligera se numeran (de acuerdo con un sistema de numeración secuencial).

La Figura 1B muestra un esquema de numeración secuencial (fila superior), comenzando en el extremo N-terminal en comparación con el esquema de numeración de Kabat (fila inferior) para 4D5v7fabH. Las inserciones de la numeración de Kabat se indican por a, b, c.

Las figuras 2A y 2B muestran las mediciones de unión con la detección de la absorbancia a 450 nm de hu4D5Fabv8 y de las variantes de fago (TioFab) con Cis mutante de hu4D5Fabv8: (A) fago no biotinilado-hu4D5Fabv8 y (B) fago biotinilado-hu4D5Fabv8 (B) mediante el ensayo PHESELECTOR de interacciones con BSA (barra blanca), HER2 (barra rayada) o estreptavidina (barra sólida).

Las Figuras 3A y 3B muestran las mediciones de unión con la detección de la absorbancia a 450 nm de hu4D5Fabv8 (izquierda) y las variantes (TioFab) con Cis mutante de hu4D5Fabv8: (A) fago no biotinilado-hu4D5Fabv8 y (B) fago biotinilado-hu4D5Fabv8 mediante el ensayo PHESELECTOR para las interacciones con: BSA (barra blanca), HER2 (barra rayada) y estreptavidina (barra rellena). Las variantes de la cadena ligera están en el lado izquierdo y las variantes de la cadena pesada están en el lado derecho. Reactividad del tiol = DO<sub>450</sub> nm para la unión de estreptavidina + DO<sub>450</sub> nm para la unión a HER2 (anticuerpo).

La Figura 4A muestra los valores de accesibilidad de superficie fraccionarias de residuos de hu4D5Fabv8 de tipo silvestre. Los sitios de las cadenas ligeras están en el lado izquierdo y los sitios de las cadenas pesadas están en el lado derecho.

La Figura 4B muestra las mediciones de unión con la detección de la absorbancia a 450 nm de las variantes hu4D5Fabv8 biotinilado (izquierda) y mutante hu4D5Fabv8 Cis (TioFab) para las interacciones con HER2 (día 2), estreptavidina (SA) (día 2), HER2 (día 4) y SA (día 4). Las variantes Phage-hu4D5Fabv8 Cis se aislaron y se almacenaron a 4 °C. La conjugación con biotina se llevó a cabo el día 2 días o el día 4 seguido de los análisis PHESELECTOR para controlar su interacción con Her2 y estreptavidina como se describe en el Ejemplo 2 y

probar la estabilidad de los grupos tiol reactivos en las variantes TioFab manipuladas.

La Figura 5 muestra las mediciones con la detección de la absorbancia a 450 nm del conjugado biotina-maleimida-hu4D5Fabv8 (A121C) y el hu4D5Fabv8 de tipo silvestre no biotinilado para la unión a estreptavidina y HER2. Cada Fab se ensayó a 2 ng y 20 ng.

La Figura 6 muestra el análisis de ELISA con la detección de la absorbancia a 450 nm de ABP-hu4DSFabv8 biotinilado de tipo silvestre (wt) y los mutantes con cisteína de ABP-hu4D5Fabv8, V110C y A121C, para la unión con albúmina de conejo, estreptavidina (SA) y HER2.

La Figura 7 muestra el análisis ELISA con detección de la absorbancia a 450 nm de mutantes con cisteína ABP-hu4D5Fabv8 biotinilado (variantes TioFab): (de izquierda a derecha) variantes con una única Cis ABP-V110C, ABP-A121C y variantes con doble Cis ABP-V110C-A88C y ABP -V110C-A121C para la unión con albúmina de conejo, HER2 y estreptavidina (SA) y probando con Fab-HRP o SA-HRP.

La Figura 8 muestra la unión del fago TioFab biotinilado y un anticuerpo anti-fago HRP a HER2 (arriba) y estreptavidina (abajo).

La Figura 9 muestra un ejemplo de representación de una unión de un conjugado ABP-proteína de fusión fármaco-TioFab que se une al antígeno del receptor HER2. ABP = proteína de unión a la albúmina.

La Figura 10 muestra un ensayo de proliferación celular in vitro de células SK-BR-3 tratadas con -●- trastuzumab; -▲- trastuzumab-SMCC-DM1 y -◆- mutante con cisteína hu4D5Fabv8 - (A121C)-BMPEO-DM1.

La Figura 11 muestra un ensayo de proliferación celular in vitro de células SK-BR-3 tratadas con: trastuzumab -○-; -●-trastuzumab-SMCC-DM1; y -□- mutante con cisteína hu4D5Fabv8 (V110C) -BMPEO-DM1.

La Figura 12 muestra el cambio medio del volumen del tumor con el tiempo en ratones desnudos atímicos con aloinjertos de tumor mamario MMTV-HER2 Fo5, administrados en día 0 con: + Vehículo (tampón); -■- ABP-mutante con cisteína hu4D5Fabv8 (cadena ligera V110C)-DM1; y -●- ABP-mutante con cisteína hu4D5Fabv8 (cadena pesada de A121C)-DM1.

La Figura 13A muestra una representación animada de la unión del anticuerpo biotinilado a HER2 inmovilizado con la unión del anticuerpo secundario marcado con HRP para la detección de la absorbancia.

La Figura 13B muestra las mediciones de unión con la detección de la absorbancia a 450 nm de variantes de tio-trastuzumab conjugados con biotina-maleimida y trastuzumab de tipo silvestre no biotinilado en la unión a HER2 inmovilizado. De izquierda a derecha: V110C (una Cis), A121C (una Cis), V110C1A121C (Cis dobles) y trastuzumab. Cada variante tio IgG y trastuzumab se probó a 1,10 y 100 ng.

La figura 14A muestra una representación animada de la unión del anticuerpo biotinilado a HER2 inmovilizado con la unión de biotina a anti-IgG-HRP para la detección de absorbancia.

La Figura 14B muestra las mediciones de unión con la detección de la absorbancia a 450 nm de las de variantes tio-trastuzumab conjugadas con biotina-maleimida biotina y trastuzumab de tipo silvestre no biotinilado en la unión a estreptavidina inmovilizada. De izquierda a derecha V110C (una Cis), A121C (una Cis), V110C/A121C (Cis dobles) y trastuzumab. Cada variante de tio IgG y trastuzumab se probó a 1,10, y 100 ng.

La Figura 15 muestra el proceso general para preparar un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína (TioMab) expresado a partir del cultivo de células para la conjugación.

La Figura 16 muestra el análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante no reductor (arriba) y reductor (abajo) de las variantes Fc TioMab 2H9 (de izquierda a derecha, carriles 1-9): A339C; S337C; S324C; A287C; V284C; V282C; V279C; V273C, y 2H9 de tipo silvestre después de la purificación sobre Proteína A inmovilizada El carril de la derecha es una escalera de marcador de tamaño, que indica que las proteínas intactas son alrededor de 150 kDa, los fragmentos de cadena pesada de 50 kDa y los fragmentos de cadena ligera de 25 kDa.

La Figura 17A muestra el análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante no reductor (izquierda) y reductor (+ DTT) (derecha) de las variantes TioMab 2H) (de izquierda a derecha, carriles 1-4): L-V15C; S179C; S375C; S400C, después de la purificación sobre Proteína A inmovilizada

La Figura 17B muestra el análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante no reductor (izquierda) y reductor (+ DTT) (derecha) de las variantes TioMab 2H9 y 3A5 TioMab después de la purificación sobre Proteína A inmovilizada

La Figura 18 muestra el análisis de transferencia Western de variantes Tio-IgG biotiniladas. Las variantes TioMab 2H9 y 3A5 se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante reducida, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La presencia de anticuerpo y biotina conjugada se probaron con anti-IgG-HRP (arriba) y estreptavidina-HRP (abajo), respectivamente. Carril 1: 3A5 H-A121C. Carril 2: 3A5 L-V110C. Carril 3: 2H9H-A121C. Carril 4: 2H9 L-V110C. Carril 5: 2H9 tipo silvestre.

La Figura 19 muestra el análisis de ELISA para la unión de las variantes 2H9 biotiniladas a estreptavidina probando con anti-IgG-HRP y midiendo la absorbancia a 450 nm (diagrama de barras superior). El diagrama esquemático inferior representa el diseño experimental utilizado en el análisis ELISA.

La Figura 20 muestra un ensayo de proliferación celular in vitro de células SK-BR-3 tratadas con: -●- trastuzumab; -▲-trastuzumab-SMCC-DM1 con una carga de fármaco de 3,4 DM1/Ab; y -◆- tio-trastuzumab (A121C)-BMPEO-DM1 con una carga de fármaco de 1,6 DM1/Ab.

La Figura 21A muestra un ensayo de proliferación celular in vitro de células HT 1080EphB2 tratadas con: -○- anti-EphB2R 2H9 parental; y -○-tio 2H9 (A121C) BMPEO-DM1.

La Figura 21B muestra un ensayo de proliferación celular in vitro de células BT 474 tratadas con: -○- anti-EphB2R 2H9 parental; y -□- tio 2H9 (A121C) BMPEO-DM1.

La Figura 22 muestra un ensayo de proliferación celular in vitro de células PC3/neo tratadas con: -◆- 3A5 anti

MUC16-SMCC-DM1; y -■- tio 3A5 (A121C) BMPEO-DM1.

La Figura 23 muestra un ensayo de proliferación celular in vitro de células PC3/MUC16 tratadas con: -◆- 3A5 anti MUC16-SMCC-DM1; y -■- tio 3A5 (A121C) BMPEO-DM1.

La Figura 24 muestra un ensayo de proliferación celular in vitro de células OVCAR-3 tratadas con: -◆- 3A5 anti MUC16-SMCC-DM1; y -■- tio 3A5 (A121C) BMPEO-DM1.

La Figura 25 muestra el cambio de volumen medio del tumor de más de 21 días en ratones desnudos atímicos con aloinjertos de tumor mamario MMTV-HER2 Fo5, después de una sola dosis en el Día 0 con: + vehículo (tampón); -●- trastuzumab-SMCC-DM1 10 mg/kg, con una carga de fármaco de 3,4 DM1/Ab; -■- tio trastuzumab (A121C)-SMCC-DM1 21 mg/kg, con una carga de fármaco de 1,6 DM1/Ab; y -□- tio trastuzumab (A121C)-SMCC-DM1 10 mg/kg, con una carga de fármaco de 1,6 DM1/Ab.

### Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas

Ahora se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones de la invención, ejemplos de las cuales se ilustran en las estructuras y fórmulas que se acompañan. Aunque la invención se describirá junto con las realizaciones enumeradas, se entenderá que no se pretende limitar la invención a esas realizaciones. Por el contrario, la invención pretende cubrir todas las alternativas, modificaciones y equivalentes, que pueden incluirse dentro del alcance de la presente invención como se define por las reivindicaciones.

Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, que se podrían utilizar en la práctica de la presente invención. La presente invención no está en modo alguno limitada a los métodos y materiales descritos.

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención y son consistentes con: Singleton et al (1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd Ed., J. Wiley & Sons, New York, NY; and Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York.

### DEFINICIONES

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y frases como se utilizan en la presente memoria están destinados a tener los siguientes significados:

Cuando se utilizan nombres comerciales en la presente memoria, los solicitantes pretenden incluir de forma independiente la formulación con el nombre comercial del producto, el medicamento genérico y el principio(s) farmacéutico activo del nombre comercial del producto.

El término "anticuerpo" en la presente memoria se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Miller et al (2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunitario que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immuno Biology, 5ª Ed., Garland Publishing, Nueva York). Un antígeno diana en general, tiene numerosos sitios de unión, también llamados epítomos, reconocidos por las CDR en varios anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítopo diferente tiene una estructura diferente. Por lo tanto, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de una diana de interés o parte de la misma, incluyendo tales dianas, pero sin limitarse, a células cancerosas o células que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados a una enfermedad autoinmunitaria. La inmunoglobulina divulgada en la presente memoria puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas se pueden derivar de cualquier especie. En un aspecto, sin embargo, la inmunoglobulina es de origen humano, murino, o de origen de conejo.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión al antígeno o variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; minicuerpos (Olafsen et al (2004) Protein Eng. Design & Sel. 17(4):315-323), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de la complementariedad) y fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de los anteriores que se unen inmunoespecíficamente a los antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo de cadena única y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, al contrario que las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en el sentido de que se pueden sintetizar de forma no contaminada por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como el obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar de acuerdo con la presente invención pueden producirse por el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al (1975) *Nature* 256: 495, o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo: US 4816567; US 5807715). Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos de fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson et al (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks et al (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597; por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con, u homóloga, a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena(s) es idéntica con, u homóloga, a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies 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. USA*, 81: 6851-6855). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente memoria incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, simio, etc.) y las secuencias de la región constante humana.

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

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos pueden asignarse a diferentes "clases". Hay cinco clases principales de anticuerpos de inmunoglobulina intactas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse en otras "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , 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 en bisagra o formas sin bisagra (Roux et al (1998) *J. Immunol.* 161:4083-4090; Lund et al (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:7246-7256; documento US 2005/0048572; documento US 2004/0229310).

Un "receptor ErbB" es una proteína tirosina quinasa receptor que pertenece a la familia de receptores ErbB, cuyos miembros son mediadores importantes del crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular. La familia de receptores ErbB incluye cuatro miembros distintos incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1, HER1), HER2 (ErbB2 o p185neu), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tiro2). Un panel de anticuerpos anti-ErbB2 se ha caracterizado usando la línea celular del tumor de mama humano SKBR3 (Hudziak et al (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-72. La inhibición máxima se obtuvo con el anticuerpo llamado 4D5 que inhibió la proliferación celular en un 56 %. Otros anticuerpos en el panel redujeron la proliferación celular en menor grado en este ensayo. Se encontró también que el anticuerpo 4D5 sensibilizaba a las líneas celulares de tumor de mama que sobreexpresan ErbB2 a los efectos citotóxicos del TNF- $\alpha$  (documento US 5677171). Los anticuerpos anti-ErbB2 discutidos en Hudziak et al. se caracterizan adicionalmente en Fendly et al (1990) *Cancer Research* 50:1550-1558; Kotts et al. (1990) *In Vitro* 26(3):59A; Sarup et al (1991) *Growth Regulation* 1:72-82; Shepard et al. *J. (1991) Clin. Immunol.* 11(3):117-127; Kumar et al. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11(2):979-986; Lewis et al. (1993) *Cancer Immunol Immunother.* 37:255-263; Pietras et al. (1994) *Oncogene* 9:1829-1838; Vitetta et al. (1994) *Cancer Research* 54:5301-5309; Sliwkowski et al (1994) *J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665; Scott et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:14300-5;

D'souza et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91:7202-7206; Lewis et al. (1996) *Cancer Research* 56:1457-1465; and Schaefer et al. (1997) *Oncogene* 15:1385-1394.

El receptor ErbB generalmente comprenderá un dominio extracelular, que puede unirse a un ligando de ErbB; un dominio transmembrana lipófilo; un dominio tirosina quinasa intracelular conservado y un dominio de señalización carboxilo terminal que alberga varios residuos de tirosina que pueden ser fosforilados. El receptor ErbB puede ser un receptor ErbB de "secuencia nativa" o una "variante de la secuencia de aminoácidos" de la misma. Preferiblemente, el receptor ErbB es un receptor ErbB humano de secuencia nativa. Por consiguiente, un "miembro de la familia de receptores ErbB" es EGFR (ErbB 1), ErbB2, ErbB3, ErbB4 o cualquier otro receptor ErbB actualmente conocido o que se identifiquen en el futuro.

Los términos "ErbB1", "receptor del factor de crecimiento epidérmico", "EGFR" y "HER1" se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a EGFR como se divulga, por ejemplo, en Carpenter et al (1987) Ann. Rev. Biochem, 56:881-914, incluyendo formas mutantes de origen natural mutante del mismo (por ejemplo, un mutante de delección del EGFR como en Humphrey et al (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 87:4207-4211). El término erbB1 se refiere al gen que codifica el producto proteína EGFR. Se describen anticuerpos contra HER1, por ejemplo, en Murthy et al (1987) Arch. Biochem. Biophys. 252:549-560 y en el documento WO 9525167.

El término "ERRP" y las expresiones "proteína relacionada con el receptor EGF" y "proteína relacionada con el receptor del factor de crecimiento epidérmico" se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a ERRP como se divulga, por ejemplo, en los documentos US 6399743 y Publicación US N.º 2003/0096373.

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

"ErbB3" y "HER3" se refieren al polipéptido receptor como se divulga, por ejemplo, en las Patentes US-5183884 y US-5480968, así como Kraus et al (1989) Proc. Nat Acad. Sci. (USA) 86:9193-9197. Los anticuerpos contra ErbB3 se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes US-5183884, US-5480968 y en el documento WO 97/35885.

Los términos "ErbB4" y "HER4" en la presente memoria se refieren al polipéptido receptor como se divulga, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Europea EP 599.274; Plowman et al (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1746-1750; y Plowman et al (1993) Nature 366:473-475, incluyendo isoformas de los mismos, por ejemplo, como se divulga en el documento WO 99/19488. Anticuerpos contra HER4, se describen, por ejemplo, en el documento WO 02/18444.

Los anticuerpos frente a receptores ErbB están comercializados en diversas fuentes, incluyendo, por ejemplo, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, EE.UU.

El término "variante de la secuencia de aminoácidos" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren en cierta medida de un polipéptido de secuencia nativa. Generalmente, las variantes de la secuencia de aminoácidos poseerán al menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia con al menos un dominio de unión al receptor de un ligando de ErbB nativo o con por lo menos un dominio de unión al ligando de un receptor ErbB nativo, y preferiblemente, serán al menos aproximadamente 80 %, más preferiblemente, al menos aproximadamente 90 % homólogas de la secuencia con tal receptor o dominios de unión al ligando. Las variantes de la secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, delecciones y/o inserciones en ciertas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa. Los aminoácidos se designan por los nombres convencionales, códigos de una letra y de tres letras.

"Identidad de secuencia" se define como el porcentaje de residuos en la variante de la secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Métodos y programas de ordenador para la alineación son bien conocidos en la técnica. Uno de estos programas de ordenador es "Align 2", propiedad de Genentech, Inc., que se presentó con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991.

"Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" y "CCDA" se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células primarias que intervienen en la ADCC, los linfocitos, NK, expresan FcγRIII solo, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, (1991) "Annu. Rev. Immunol." 9:457-92. Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC, *in vitro*, tal como el descrito en las patentes US 5500362 y US 5821337. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo

animal tal como el divulgado en Clynes et al (1998) Proc. NAT. ACAD. SCL (USA) 95:652-656.

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

Las expresiones "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región constante Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es una secuencia nativa del FcR humano. Además, un FcR preferido es uno que se une un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor", que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo activador de inmunorreceptor con residuos de tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo inhibidor de inmunorreceptor con residuos de tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico. (Leer revisión en M. en Daëron, "Annu. Rev. Immunol." 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, "Annu. Rev. Immunol", 9:457-92 (1991); Capel et al (1994) Immunomethods 4:25-34; y de Haas et al (1995) J. Lab. Clin. Med. 126:330-41. Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término "FcR" en la presente memoria. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et al (1976) J. Immunol. 117: 587 y Kim et al (1994) J. Immunol 24: 249).

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

"Los anticuerpos nativos" son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada cadena pesada y ligera tienen también un extremo un dominio variable (V<sub>H</sub>) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V<sub>L</sub>) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, adoptando en gran medida una configuración de hoja β, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de hoja β. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (ver Kabat et al (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

La expresión "región hipervariable" cuando se usa en la presente memoria se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende generalmente residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat et al *supra*) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol., 196: 901-917). La "región marco" o residuos "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se definen aquí.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de unión al antígeno y todavía es capaz de reticularse con el antígeno.

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

15 El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi terminal de la cadena pesada del dominio CH1 incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente memoria para Fab' en el que el residuo(s) cisteína de los dominios constantes llevan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> se produjeron  
20 originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominadas kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.  
25

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "scFv" comprenden los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> dominios del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, ver Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). Los fragmentos scFv del anticuerpo anti-ErbB2 se describen en el documento WO 93/16185 y en las patentes US-5571894 y US-5587458.  
30

35 El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio pesado variable (VH) conectado a un dominio ligero variable (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH - VL). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más detalladamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448.  
40

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. La humanización es un método para transferir la información de unión al antígeno murino a un aceptor de anticuerpo humano no inmunogénico y ha dado lugar a muchos fármacos terapéuticamente útiles. El método de humanización comienza generalmente mediante la transferencia de las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) murinas en una estructura de anticuerpo (Jones et al, (1986) Nature 321:522-525). Estos anticuerpos injertados con CDR generalmente no conservan su afinidad original para la unión al antígeno, y de hecho, la afinidad está a menudo severamente deteriorada. Además de las CDR, para mantener la adecuada conformación de la CDR también deben incorporarse residuos del marco de anticuerpos no humanos seleccionados (Chothia et al (1989) Nature 342: 877). La transferencia de residuos estructurales de ratón clave al aceptor humano con el fin de apoyar la conformación estructural de las CDR injertadas se ha demostrado que restaura la unión al antígeno y la afinidad (Riechmann et al (1992) J. Mol. Biol. 224:487-499; Foote y Winter, (1992) J. Mol. Biol. 224:487-499; Presta et al (1993) J. Immunol. 151, 2623-2632; Werther et al (1996) J. Immunol. Methods 157:4986-4995; y Presta et al (2001) Thromb. Haemost 85:379-389). En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y generalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región  
45  
50  
55  
60  
65

constante de inmunoglobulina (Fc), generalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase el documento US 6407213; Jones et al (1986) Nature, 321:522-525; Riechmann et al (1988) Nature 332:323-329; y Presta, (1992) Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596.

5 Un "aminoácido con cisteína libre" se refiere a un residuo de aminoácido cisteína que ha sido introducido por ingeniería genética en un anticuerpo parental, tiene un grupo funcional tiol (-SH), y no está emparejado como un puente disulfuro intramolecular o intermolecular.

10 La expresión "valor de reactividad del tiol" es una caracterización cuantitativa de la reactividad de los aminoácidos con cisteína libre. El valor de reactividad del tiol es el porcentaje de un aminoácido con cisteína libre en un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína que reacciona con un reactivo que reacciona con tiol y se convierte en un valor máximo de 1. Por ejemplo, un aminoácido con cisteína libre en un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína que reacciona con un rendimiento del 100 % con un reactivo que reacciona con tiol, tal como un reactivo de biotina-maleimida, para formar un anticuerpo marcado con biotina tiene un valor de reactividad del tiol de 1,0. Otro aminoácido cisteína introducido por ingeniería genética en el mismo o diferente anticuerpo parental que reacciona con un rendimiento del 80 % con un reactivo que reacciona con tiol tiene un valor de reactividad del tiol de 0,8. Otro aminoácido cisteína introducido por ingeniería genética en el mismo o diferente anticuerpo parental que no reacciona totalmente con un reactivo que reacciona con tiol tiene un valor de reactividad del tiol de 0. La determinación del valor de reactividad del tiol de una cisteína en particular puede llevarse a cabo mediante el ensayo ELISA, espectroscopía de masas, cromatografía de líquidos, autorradiografía u otras pruebas analíticas cuantitativas.

25 Un "anticuerpo parental" es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o más residuos de aminoácidos se sustituyen por uno o más residuos de cisteína. El anticuerpo parental puede comprender una secuencia nativa o de tipo silvestre. El anticuerpo parental puede tener modificaciones de la secuencia de aminoácidos preexistentes (tales como adiciones, deleciones y/o sustituciones) en relación con otras formas nativas, de tipo silvestre o modificadas de un anticuerpo. Un anticuerpo parental puede ser dirigido contra un antígeno diana de interés, por ejemplo, un polipéptido biológicamente importante. También se contemplan los anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos glicolípidos asociados a tumor; véase el documento US 5091178).

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

35 Otros ejemplos de anticuerpos parentales incluyen los seleccionados de, y sin limitación, anticuerpo anti-receptor de estrógenos, anticuerpo anti-receptor de progesterona, anticuerpo anti-p53, anticuerpo anti-HER-2/neu, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-catepsina D, anticuerpo anti-Bcl-2, anticuerpo anti-e-cadherina, anticuerpo anti-CA125 y anticuerpo anti-CA15-3, anticuerpo, anti-CA19-9, anticuerpo anti-c-erbB-2, anticuerpo anti-glicoproteína P, anticuerpo anti-CEA, anticuerpo anti-proteína del retinoblastoma, anticuerpo anti-oncoproteína ras, anticuerpo anti-Lewis X, anticuerpo anti-Ki-67, anticuerpo anti-PCNA, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD4, anticuerpo anti-CD5, anticuerpo anti-CD7, anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD9/p24, anticuerpo anti-CD10, anticuerpo anti-CD11c, anticuerpo anti-CD13, anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-CD15, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-CD22, anticuerpo anti-CD23, anticuerpo anti-CD30, anticuerpo anti-CD31, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-CD34, anticuerpo anti-CD35, anticuerpo anti-CD38, anticuerpo anti-CD41, anticuerpo anti-LCA/CD45, anticuerpo anti-CD45RO, anticuerpo anti-CD45RA, anticuerpo anti-CD39, anticuerpo anti-CD100, anticuerpo anti-CD95/Fas, anticuerpo anti-CD99, anticuerpo anti-CD106, anticuerpo anti-ubiquitina, anticuerpo anti-CD71, anticuerpo anti-c-myc, anticuerpo anti-citoqueratinas, anticuerpo anti-vimentina, anticuerpo anti-proteínas del VPH, anticuerpo anti-cadenas ligeras kappa, anticuerpo anti-cadenas ligeras lambda, anticuerpo anti-melanosomas, anticuerpo anti-antígeno específico de la próstata, anticuerpo anti-S-100, anticuerpo anti-antígeno-tau, anticuerpo anti-fibrina, anticuerpo anti-queratina y anticuerpo anti-antígeno Tn.

55 Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95 % en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry, y más preferiblemente más de 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

65 Un anticuerpo "que se une" a una diana molecular o a un antígeno de interés, por ejemplo, el antígeno ErbB2, es uno capaz de unirse a ese antígeno con suficiente afinidad de tal forma que el anticuerpo sea útil en dirigirse a una célula que expresa el antígeno. Cuando el anticuerpo es uno que se une a ErbB2, por lo general, se unen

preferentemente ErbB2 frente a otros receptores ErbB y puede ser uno que no experimente una reacción cruzada significativa con otras proteínas tales como EGFR, ErbB3 o ErbB4. En tales realizaciones, el grado de unión del anticuerpo a estas proteínas no ErbB2 (por ejemplo, unión de la superficie celular a un receptor endógeno) será menor que 10 %, determinado mediante el análisis de separación celular por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). A veces, el anticuerpo anti-ErbB2 no sufrirá una reacción cruzada significativa con la proteína neu de rata, por ejemplo, como se describe en Schecter et al. (1984) Nature 312:513 y Drebin et al (1984) Nature 312:545-548.

Dianas moleculares para anticuerpos abarcados por la presente invención incluyen proteínas CD y sus ligandos, tales como, pero sin limitarse a: (i) CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34, CD40, CD79 $\alpha$  (CD79a) y CD79 $\beta$  (CD79b); (ii) miembros de la familia de receptores ErbB tales como el receptor EGF, HER2, HER3 o HER4; (iii) moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Macl, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM y  $\alpha$ v/ $\beta$ 3 integrina, incluyendo o bien las subunidades alfa o beta de la misma (por ejemplo anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); (iv) factores de crecimiento tales como VEGF; IgE; antígenos de grupos sanguíneos; receptor flk2/flt3; receptor de la obesidad (OB); receptor *mpl*, CTLA-4; proteína C, BR3, c-met, factor tisular,  $\beta$ 7 etc; y (v) antígenos asociados a tumores de la superficie celular y transmembrana (TAA).

A menos que se indique lo contrario, la expresión "anticuerpo monoclonal 4D5" se refiere a un anticuerpo que tiene residuos unión al antígeno de, o derivados de éste, el anticuerpo murino 4D5 (ATCC CRL 10463). Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 4D5 puede ser un anticuerpo monoclonal murino 4D5 o una variante del mismo, tal como un 4D5 humanizado. Ejemplos de anticuerpos 4D5 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 (trastuzumab, HERCEPTIN®) como en la patente US-5821337.

Los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en las que el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) un cambio o trastorno fisiológico indeseado, tal como el desarrollo o diseminación del cáncer. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, el alivio de los síntomas, la disminución del grado de la enfermedad, la estabilización (es decir, no empeoramiento) de la enfermedad, el retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Los que están en necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno o afección, así como los propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que se va a prevenir la afección o trastorno.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o afección en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento del tumor y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados al cáncer. En la medida en que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia puede medirse, por ejemplo, por la evaluación del tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o la determinación de la tasa de respuesta (RR).

El término "biodisponibilidad" se refiere a la disponibilidad sistémica (es decir, niveles en sangre/plasma) de una cantidad dada de fármaco administrado a un paciente. La biodisponibilidad es un término absoluto que indica la medición tanto del ritmo (velocidad) como de la cantidad total (extensión) del fármaco que alcanza la circulación general de una forma farmacéutica administrada.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza generalmente por un crecimiento celular no regulado. Un "tumor" comprende una o más células cancerosas. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico ("CPNM"), adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o cáncer 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 glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, además de cáncer de cabeza y cuello.

Un "cáncer que expresa ErbB" es aquel que comprende células que tienen la proteína ErbB presente en su superficie celular. Un "cáncer que expresa ErbB2" es aquel que produce niveles suficientes de ErbB2 en la superficie de células del mismo, de tal manera que un anticuerpo anti-ErbB2 se puede unir al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer.

Un cáncer que "sobrexpresas" un receptor antigénico es aquel que tiene niveles significativamente más altos del receptor, tales como ErbB2, en la superficie celular del mismo, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar causada por la amplificación génica o por el aumento de la transcripción o la traducción. La sobreexpresión del receptor se puede determinar en un ensayo de diagnóstico o pronóstico mediante la evaluación de los niveles incrementados de la proteína del receptor presente en la superficie de una célula (por ejemplo, mediante un ensayo de inmunohistoquímica; IHC). Como alternativa o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica el receptor en la célula, por ejemplo, mediante técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH; ver el documento WO 98/45479), la transferencia Southern o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR en tiempo real cuantitativa (RT-PCR).

Los tumores que sobreexpresan ErbB2 (HER2) son calificados por las puntuaciones de inmunohistoquímica que corresponden al número de copias de moléculas HER2 expresadas por célula y pueden determinarse bioquímicamente: 0=0-10.000 copias/célula, 1+ = al menos aproximadamente 200.000 copias/célula, 2+ = al menos aproximadamente 500.000 copias /célula, 3+ = aproximadamente  $1-2 \times 10^6$  copias/célula. La sobreexpresión de HER2 en el nivel 3+, que conduce a la activación independiente de ligando de la tirosina quinasa (Hudziak et al (1987) Proc. Natl Acad Sci. USA, 84: 7159-7163), se produce en aproximadamente el 30 % de los cánceres de mama, y en estos pacientes, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global se ven disminuidos (Slamon et al (1989) Science, 244:707-712; Slamon et al (1987) Science, 235:177-182).

La expresión "agente citotóxico" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o causa la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{60}\text{Co}$  e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo los análogos sintéticos y derivados de las mismas.

Una "enfermedad autoinmunitaria" en la presente memoria es una enfermedad o afección que surge de y va dirigida contra los propios tejidos u órganos de un individuo o un co-segregado o manifestación de las mismas o un trastorno resultante de las mismas. En muchas de estas afecciones autoinmunitarias e inflamatorias, puede existir una serie de marcadores clínicos y de laboratorio, incluyendo, pero sin limitarse a, hipergammaglobulinemia, niveles altos de autoanticuerpos, depósitos de complejos antígeno-anticuerpo en los tejidos, beneficio de los tratamientos con corticosteroides o inmunosupresores y agregados de células linfoides en los tejidos afectados. Sin limitarse a ninguna teoría en cuanto a la enfermedad autoinmunitaria media por linfocitos B, se cree que los linfocitos B demuestran un efecto patogénico en enfermedades autoinmunitarias humanas a través de una multitud de vías mecánicas, incluyendo la producción de autoanticuerpos, la formación del complejo inmunitarios, la activación de células dendríticas y linfocitos T, la síntesis de citoquinas, la liberación directa de quimiocinas y la provisión de un nido para la neo-linfogénesis ectópica. Cada una de estas vías puede participar en diferentes grados en la patología de las enfermedades autoinmunitarias. Una enfermedad autoinmunitaria puede ser una enfermedad específica de un órgano (es decir, la respuesta inmunitaria se dirige específicamente contra un sistema de órganos tales como el sistema endocrino, el sistema hematopoyético, la piel, el sistema cardiopulmonar, los sistemas gastrointestinales y el hígado, el sistema renal, el tiroides, las orejas, el sistema neuromuscular, el sistema nervioso central, etc.) o una enfermedad sistémica que puede afectar a múltiples sistemas orgánicos (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide, polimiositis, etc.).

El término "citostático" se refiere al efecto de limitar la función de las células, tales como limitar el crecimiento celular o la proliferación de las células.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen Erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), bortezomib (VELCADE®, Millenium Pharm.), fulvestrant (FASLODEX®, Astrazeneca), Sunitinib (SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), oxaliplatino (Eloxatin®, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), leucovorina, rapamicina (Sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (GSK572016, GlaxoSmithKline), lonafarnib (SCH 66336), sorafenib (BAY43-9006, Bayer Labs.) y gefitinib (IRESSA®, Astrazeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen); agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida y CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enedina (por ej., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma1I y caliqueamicina omega1I (Angew Chem Intl. Ed. Engl. (1994)33: 183-186); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bifosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y cromóforos relacionados, cromóforos de antibióticos enedina),

5 aclacinomisinas, actinomicina, antramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C,
 10 ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato y análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina,
 15 enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos anti tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; recuperador de ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; glucósido aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2- etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2°-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida;
 20 tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), formulación de nanopartículas manipuladas con albúmina de paclitaxel sin Cremophor ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y docetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; gemcitabina GEMZAR®; 6- tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NAVELBINE®;
 25 novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; Xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

30 También incluidos en esta definición de "agente quimioterapéutico" son: (i) agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores tales como anti-estrógenos y moduladores selectivos de receptores estrogénicos (SERM), incluyendo, por ejemplo, el tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON. (ii) inhibidores de la aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol
 35 MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FIMERA® y anastrozol ARIMIDEX®; (iii) antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; así como troxacitabina (un 1,3-dioxolano nucleósido análogo de citosina); (iv) inhibidores de la aromatasas; (v) inhibidores de la proteína quinasa; (vi) inhibidores de la quinasa de lípidos; (vii) oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación de células aberrantes,
 40 tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Ralf y H-Ras; (viii) ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; (ix) las vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®, rRH ABARELIX®; (x) agentes anti-angiogénicos, tales como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y (xi) sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

45 En la presente memoria, la expresión "fármaco dirigido a EGFR" se refiere a un agente terapéutico que se une a EGFR y, opcionalmente, inhibe la activación de EGFR. Ejemplos de tales agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Los ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase, el documento US 4943533, Mendelsohn et al.) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o cetuximab; ERBITUX®) y 225 reconformado humano (H225) (véase el documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); anticuerpos que se unen al EGFR mutante tipo II (patente US5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR, como se describe en el documento US 5891996 y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, como ABX-EGF (véase el documento WO 98/50433, Abgenix). El anticuerpo anti-EGFR se puede
 50 55 60 65

Los inhibidores de la proteína quinasa incluyen inhibidores de la tirosina quinasa que inhiben en cierta medida la actividad tirosina quinasa de una tirosina quinasa, como un receptor ErbB. Ejemplos de tales inhibidores incluyen los fármacos dirigidos a EGFR citados en el párrafo precedente, así como quinazolinas, tales como PD 153035.4-(3-cloroanilino) quinazolina, piridopirimidinas, pirimidopirimidinas, pirrolopirimidinas, como CGP 59326. CGP 60261 y CGP 62706 y pirazolopirimidinas, 4- (fenilamino)-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidinas, curcumina (diferuloil metano, 4,5-bis (4-fluoroanilino)ftalimida), tirfostinas que contienen restos nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas

antisentido (por ejemplo, aquellas que se unen al ácido nucleico que codifica ErbB); quinoxalinas (documento US 5804396); trifostinas (documento US 5804396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores de pan-ErbB, tales como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de imatinib (Gleevec; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); semaxanib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); o como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patentes: WO 99/09016 (American Cyanamid); WO 98/43960 (American Cyanamid); WO 97/38983 (Warner Lambert); WO 99/06378 (Warner Lambert); WO 99/06396 (Warner Lambert); WO 96/30347 (Pfizer, Inc); WO 96/33978 (Zeneca); WO 96/3397 (Zeneca) y WO 96/33980 (Zeneca).

Un "agente anti-angiogénico" se refiere a un compuesto que bloquea, o interfiere con, hasta cierto punto, el desarrollo de los vasos sanguíneos. El factor anti-angiogénico puede, por ejemplo, ser una molécula pequeña o anticuerpo que se une a un factor de crecimiento o receptor del factor de crecimiento implicado en la promoción de la angiogénesis. El factor anti-angiogénico preferido en la presente memoria es un anticuerpo que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

El término "citocina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen hormonas de crecimiento tales como la hormona de crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metionilo y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glicoproteínas, tales como hormona estimulante del foliculo (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral- $\alpha$  y  $\beta$ ; sustancia inhibidora de Müller; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento de plaquetas, factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como el interferón  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ; factores estimulantes de las colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral como TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$  y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y el ligando kit (KL). Tal como se utiliza en la presente memoria, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

El término "profármaco" tal como se utiliza en esta solicitud se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco original y es capaz de ser enzimáticamente o hidrolíticamente activada o convertida en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella et al "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery" Directed Drug Delivery, Borchardt et al (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen  $\beta$ -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituidos, profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituidos, 5-fluorocitosina y otros profármacos 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivarse en una forma profármaco para su uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para la administración de un fármaco (tal como los anticuerpos anti-ErbB2 divulgados en la presente memoria y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

El término "prospecto" se utiliza para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, contraindicaciones y/o advertencias sobre el uso de tales productos terapéuticos.

"Expresión en fagos" es una técnica por la cual los polipéptidos variantes se expresan como proteínas de fusión con una proteína de la cubierta en la superficie del fago, por ejemplo, fagos filamentosos, partículas. Una utilidad de la expresión en fagos radica en el hecho de que grandes bibliotecas de variantes de proteínas aleatorias se pueden clasificar rápidamente y de manera eficiente en cuanto a aquellas secuencias que se unen a una molécula diana con alta afinidad. La expresión de las bibliotecas de péptidos y proteínas en fagos se ha utilizado para el cribado de millones de polipéptidos para detectar aquellos que tienen propiedades de unión específicas. Para la expresión de péptidos pequeños al azar y proteínas pequeñas se han usado métodos de expresión en fago polivalentes, generalmente a través de fusiones con cualquiera de pIII o pVIII del fago filamentososo (Wells y Lowman, (1992) Curr. Opin. Struct. Biol., 3: 355-362, y las referencias citadas en el mismo). En la expresión de fagos monovalente, una biblioteca de proteína o péptido se fusiona con una proteína de la envoltura del fago o una porción del mismo y se

expresa a bajos niveles en presencia de la proteína de tipo silvestre. Los efectos de la avidéz se reducen con respecto al fago polivalente de modo que la clasificación se hace sobre la base de la afinidad del ligando intrínseco y se usan vectores fagémidos, que simplifican las manipulaciones de ADN. Lowman and Wells, *Methods: A companion to Methods in Enzymology*, 3:205-0216 (1991). La expresión en fagos incluye técnicas para la producción de moléculas similares a anticuerpos (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immunobiology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York, p627-628; Lee et al).

Un "fagémido" es un vector de plásmido que tiene un origen de replicación bacteriano, por ejemplo, Co1E1 y una copia de una región intergénica de un bacteriófago. El fagémido puede usarse en cualquier bacteriófago conocido, incluyendo bacteriófago filamentoso y bacteriófago lambda. El plásmido también contendrá generalmente un marcador seleccionable para la resistencia a los antibióticos. Los segmentos de ADN clonados en estos vectores pueden propagarse como plásmidos. Cuando se proporcionan células que albergan estos vectores con 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 del ADN del plásmido y las partículas de fago para envoltura. El fagémido puede formar partículas de fago infecciosas o no infecciosas. Este término incluye fagémidos que contienen un gen de proteína de la envoltura del fago o un fragmento de la misma unido a un gen polipéptido heterólogo como una fusión de genes de tal manera que el polipéptido heterólogo se expresa en la superficie de la partícula del fago.

"Enlazador", "unidad enlazadora" o "enlace" se refiere a un resto químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo con un resto de fármaco. En diversas realizaciones, un enlazador se especifica como L. Los enlazadores incluyen un radical divalente tal como un alquildiólo, un arileno, un heteroarileno, restos tales como:  $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ , unidades repetitivas de alquiloxi (por ejemplo, polietilenoxi, PEG, polimetilenoxi) y alquilamino (por ejemplo, polietilenoamino, Jeffamine™) y éster de diácido y amidas, incluyendo succinato, succinamida, diglicolato, malonato y caproamida.

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

Las definiciones estereoquímicas y convenciones utilizadas en la presente memoria generalmente siguen lo descrito en S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York y Eliel, E. and Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada en un plano. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S, se utilizan para denotar la configuración absoluta de la molécula alrededor de su centro(s) quiral. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación de la luz polarizada en un plano por el compuesto, significando (-) o 1 que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos, excepto que son imágenes especulares uno del otro. Un estereoisómero específico también puede ser referido como un enantiómero y una mezcla de tales isómeros a menudo se denomina mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o un racemato, la cual puede ocurrir cuando no ha habido una estereoselección o estereoespecificidad en una reacción química o proceso. Los términos "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, carentes de actividad óptica.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente memoria, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un ADC. Ejemplos de sales incluyen, pero no se limitan, a sales sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluensulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que estabiliza la carga en el compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

"Solvato farmacéuticamente aceptable" se refiere a una asociación de una o más moléculas de disolvente y un ADC. Ejemplos de disolventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.

Las siguientes abreviaturas se usan en la presente memoria y tienen las definiciones indicadas: BME es beta-mercaptoetanol, Boc es N-(t-butoxicarbonil), cit es citrulina (ácido 2-amino-5-ureido pentanoico), dap es dolaproína, DCC es 1,3-diciclohexilcarbodiimida, DCM es diclorometano, DEA es dietilamina, DEAD es dietilazodicarboxilato, DEPC es dietilfosforilcianidato, DIAD es diisopropilazodicarboxilato, DIEA es *N,N*-diisopropiletilamina, dil es dolaisoleucina, DMA es dimetilacetamida, DMAP es 4-dimetilaminopiridina, DME es etilenglicol dimetil éter (o 1,2-dimetoxietano), DMF es *N,N*-dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfóxido, doe es dolafenina, dov es *N,N*-dimetilvalina, DTNB es 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico), DTPA es ácido dietilentriaminopentaacético, DTT es ditioneitol, 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'*-tetrametiluronio, HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, HPLC es cromatografía líquida de alto rendimiento, ile es isoleucina, lys es lisina, MeCN (CH<sub>3</sub>CN) es acetonitrilo, MeOH es metanol, Mtr es 4-anisildifenilmetil (o 4-metoxitritil), nor es (1*S*, 2*R*)-(+)-norefedrina, PAB es p-aminobencilcarbamoil, PBS es solución salina tamponada con fosfato (pH 7), PEG es polietilenglicol, Ph es fenilo, Pnp es p-nitrofenilo, MC es 6-maleimidocaproilo, phe es L-fenilalanina, PyBrop es hexafluorofosfato de bromo-*tris*-pirrolidino, SEC es cromatografía de exclusión por tamaño, Su es succinimida, TFA es ácido trifluoroacético, TLC es cromatografía en capa fina. UV es ultravioleta, y val es valina.

### ANTICUERPOS MANIPULADOS CON CISTEÍNA

Los compuestos de la divulgación incluyen anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína donde uno o más aminoácidos de un anticuerpo de tipo silvestre o anticuerpo parental se sustituyen con un aminoácido cisteína. Cualquier forma de anticuerpo puede ser modificado por ingeniería genética de este modo, es decir, mutado. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo Fab parental puede ser diseñado para formar un Fab modificado por ingeniería genética con cisteína, referido aquí como "TioFab". De manera similar, un anticuerpo monoclonal parental puede ser diseñado para formar un "TioMab". Debe tenerse en cuenta que la mutación de sitio único produce un único residuo de cisteína modificado por ingeniería genética en un TioFab, mientras que una mutación de sitio único produce dos residuos cisteína modificados por ingeniería genética en un TioMab, debido a la naturaleza dimérica de los anticuerpos IgG. Los mutantes con residuos de cisteína (Cis) ("modificados por ingeniería genética") se evalúan en cuanto a la reactividad de los grupos tiol de la cisteína. El valor de la reactividad tiol es un término relativo, numérico en el intervalo de 0 a 1,0 y se puede medir por cualquier anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína. Los valores de la reactividad del tiol de los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína de la divulgación están en los intervalos de 0,6 a 1,0; 0,7 a 1,0; o 0,8 a 1,0.

Los métodos de diseño, selección y preparación de la invención permiten anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína que son reactivos con funcionalidad electrófila. Estos métodos permiten otros compuestos conjugados de anticuerpos tales como compuestos conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) con moléculas del fármaco en sitios designados, diseñados selectivos. Los residuos de cisteína reactivos en la superficie de un anticuerpo permiten conjugar específicamente un resto de fármaco a través de un grupo reactivo tiol tal como maleimida o haloacetilo. La reactividad nucleófila de la funcionalidad tiol de un residuo de Cis frente a un grupo maleimida es aproximadamente 1000 veces mayor en comparación con cualquier otra funcionalidad de aminoácidos en una proteína, tal como un grupo amino de residuos de lisina o el grupo amino N-terminal. La funcionalidad tiol específica en reactivos yodoacetilo y maleimida puede reaccionar con grupos amina, pero a pH más alto (> 9,0) y se requieren tiempos de reacción más largos (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach. Academic Press, Londres).

Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína de la divulgación conservan preferentemente la capacidad de unión de sus anticuerpos homólogos parentales de tipo silvestre. Por lo tanto, los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a los antígenos. Tales 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 supervivencia celular, factores de regulación de proliferación celular, moléculas asociadas a (por ejemplo, moléculas conocidas o que se sospecha que contribuyen funcionalmente) el desarrollo o la diferenciación de tejidos, linfocinas, citocinas, moléculas implicadas en la regulación del ciclo celular, moléculas que participan en la vasculogénesis y moléculas asociadas (por ejemplo, moléculas conocidas o que se sospecha que contribuyen funcionalmente) a la angiogénesis. El antígeno asociado a un tumor puede ser un factor de diferenciación de clúster (es decir, una proteína CD). Un antígeno al cual se puede unir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína puede ser un miembro de un subconjunto de una de las categorías mencionadas anteriormente, en el que el otro subconjunto(s) de dicha categoría comprende otras moléculas/antígenos que tienen una característica distinta (con respecto al antígeno de interés).

El anticuerpo parental puede ser también un anticuerpo humanizado seleccionado de 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 (WO 93/21319) y anticuerpos humanizados 2C4 como se describe en la presente memoria.

65

Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína de la divulgación pueden unirse específicamente y eficazmente al sitio con un reactivo que reacciona con tiol. El reactivo que reacciona con tiol puede ser un reactivo enlazador multifuncional, es decir, un reactivo marcador de afinidad (por ejemplo un reactivo enlazador de biotina), un marcador de detección (por ejemplo, un reactivo fluoróforo), un reactivo de inmovilización de la fase sólida (por ejemplo SEPHAROSE™, poliestireno o vidrio), o un intermedio fármaco-enlazador. Un ejemplo de un reactivo que reacciona con tiol es N-etilmaleimida (NEM). En un ejemplo de realización, la reacción de un TioFab con un reactivo enlazador de biotina proporciona un TioFab biotinilado mediante el cual se puede detectar y medir la presencia y la reactividad del residuo de cisteína modificado por ingeniería genética. La reacción de un TioFab con un reactivo enlazador multifuncional proporciona un TioFab con un enlazador funcionalizado que puede reaccionar adicionalmente con un reactivo que es un resto de fármaco u otro marcador. La reacción de un TioFab con un intermedio enlazador de un fármaco proporciona un conjugado TioFab-fármaco.

Ejemplos de métodos descritos aquí pueden aplicarse en general a la identificación y producción de anticuerpos, y más en general, a otras proteínas a través de la aplicación de las etapas de diseño y cribado descritas en este documento.

Este enfoque 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 de tiol reactiva (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, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Hermanson, G. in *Bioconjugate Techniques* (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671). La pareja puede ser un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina tal como la doxorubicina o la toxina pertussis), un fluoróforo tal como un colorante fluorescente como fluoresceína o rodamina, un agente quelante para la formación de imágenes o metal radioterapéutico, un marcador de peptidilo o no peptidilo o etiqueta de detección, 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 de ejemplo, hu4D5Fabv8 de la presente invención están principalmente en el dominio constante de un anticuerpo, que está bien conservado a través de todas las especies de anticuerpos. Estos sitios deben ser ampliamente aplicables a otros anticuerpos, sin más necesidad de diseño estructural o del conocimiento de las estructuras de anticuerpos específicos y sin interferencias en las propiedades de unión al antígeno inherentes a los dominios variables de unión al anticuerpo.

Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína que pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra los receptores de superficie celular y antígenos asociados a tumores (TAA). Tales anticuerpos pueden ser utilizados como anticuerpos desnudos (sin conjugarse a un resto de fármaco o de marcador) o como conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de Fórmula I. Los antígenos asociados a tumores son conocidos en la técnica, y pueden prepararse 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 la terapia del cáncer, los investigadores han intentado identificar polipéptidos transmembrana o de otro modo asociados a tumores que se expresan específicamente en la superficie de uno o más tipos particulares de células cancerosas en comparación con una o más células no cancerosas normales. A menudo, dichos polipéptidos asociados a tumores se expresan más abundantemente en la superficie de las células cancerosas en comparación con la superficie de las células no cancerosas. La identificación de dichos polipéptidos antígenos de la superficie celular asociados a tumores ha dado lugar a la capacidad de dirigirse específicamente a las células cancerosas para la destrucción a través de terapias basadas en anticuerpos.

Ejemplos de TAA incluyen, pero no se limitan a, TAA (1)-(36) enumerados a continuación. Por conveniencia, se enumera a continuación la información relativa a estos antígenos, todos los cuales son conocidos en la técnica e incluye nombres, nombres alternativos, números de acceso GenBank y de referencia(s) primaria(s), siguiendo las convenciones de identificación de secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI). Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas que corresponden a TAA (1)-(36) están disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank. Los antígenos asociados a tumores dirigidos por anticuerpos incluyen todas las secuencias de aminoácidos variantes e isoformas que poseen al menos aproximadamente 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 biológicas o características como un TAA que tiene una secuencia que se encuentra en las referencias citadas. Por ejemplo, un TAA que tiene una secuencia variante en general es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo que se une específicamente al TAA con la secuencia correspondiente en la lista.

#### ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMORES (1)-(36)

(1) BMPR1B (receptor de la proteína morfogenética ósea tipo 1B, N.º de acceso de Genbank. NM\_001203) ten Dijke, P., et al *Science* 264 (5155):101-104 (1994), *Oncogene* 14 (11):1377-1382 (1997); WO2004063362 (Reivindicación 2); WO2003042661 (Reivindicación 12); US2003134790-A1 (Página 38-39); WO2002102235 (Reivindicación 13; Página 296); WO2003055443 (Página 91-92); WO200299122 (Ejemplo 2;

- Página 528-530); WO2003029421 (Reivindicación 6); WO2003024392 (Reivindicación 2; Fig 112);  
 WO200298358 (Reivindicación 1; Página 183); WO200254940 (Página 100-101); WO200259377 (Página 349-  
 350); WO200230268 (Reivindicación 27; Página 376); WO200148204 (Ejemplo; Fig 4) NP\_001194 receptor de la  
 proteína morfogenética ósea tipo 1B /pid=NP\_001194.1-Referencias cruzadas: MIM:603248; NP\_001194.1;  
 5 AY065994
- (2) E16 (LAT1, SLC7A5, N.º de acceso de 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); WO2004048938 (Ejemplo 2); WO2004032842 (Ejemplo IV); WO2003042661 (Reivindicación 12);  
 10 WO2063016475 (Reivindicación 1); WO200278524 (Ejemplo 2);  
 WO200299074 (Reivindicación 19; Página 127-129); WO200286443 (Reivindicación 27; Páginas 222, 393);  
 WO2003003906 (Reivindicación 10; Página 293); WO200264798 (Reivindicación 33; Página 93-95);  
 WO200014228.(Reivindicación 5; Página 133-136); US2003224454 (Fig 3); WO2003025138 (Reivindicación 12;  
 15 Página 150);  
 NP\_003477 familia de vehículos de soluto 7 (vehículo de aminoácidos catiónicos, sistema y+), miembro 5  
 /pid=NP\_003477.3 - Homo sapiens Referencias cruzadas: MIM:600182; NP\_003477.3; NM\_015923;  
 NM\_003486\_1
- (3) STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata, N.º de acceso de Genbank.  
 20 NM\_012449) Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96  
 (25):14523-14528); WO004065577 (Reivindicación 6); WO2004027049 (Fig 1L); EP1394274 (Ejemplo 11);  
 WO2004016225 (Reivindicación 2); WO2003042661 (Reivindicación 12); US2003157089 (Ejemplo 5);  
 US2003185830 (Ejemplo 5); US2003064397 (Fig 2); WO200289747 (Ejemplo 5; Página 618-619);  
 25 WO2003022995 (Ejemplo 9; Fig 13A, Example 53; Página 173, Example 2; Fig 2A);  
 NP\_036581 antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata Referencias cruzadas:  
 MIM:604415; NP\_036581.1; NM\_012449\_1
- (4) 0772P (CA125, MUC16, N.º de acceso de Genbank. AF361486) J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375  
 (2001)); WO2004045553 (Reivindicación 14); WO200292836 (Reivindicación 6; Fig 12); WO200283866  
 30 (Reivindicación 15; Página 116-121); US2003124140 (Ejemplo 16); Referencias cruzadas: GI:34501467;  
 AAK741203; AF361486\_1
- (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina, N.º de acceso de Genbank.  
 35 NM\_005823) Yamaguchi, N., et al Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96  
 (20):11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1):136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37):21984-  
 21990 (1995)); WO2003101283 (Reivindicación 14); (WO2002102235 (Reivindicación 13; Página 287-288);  
 WO2002101075 (Reivindicación 4; Página 308-309); WO200271928 (Página 320-321); WO9410312 (Página 52-  
 57); Referencias cruzadas: MIM:601051; NP\_005814.2; NM\_005823\_1
- (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIB, SLC34A2, familia de vehículos de soluto 34 (fosfato sódico), miembro 2, vehículo  
 40 de fosfato dependiente de sodio tipo II 3b, N.º de acceso de 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); WO2004022778 (Reivindicación 2); EP1394274 (Ejemplo 11);  
 45 WO2002102235 (Reivindicación 13; Página 326); EP875569 (Reivindicación 1; Página 17-19); WO200157188  
 (Reivindicación 20; Página 329); WO2004032842 (Ejemplo IV); WO200175177 (Reivindicación 24; Página 139-  
 140); Referencias cruzadas: MIM:604217; NP\_006415.1; NM\_006424\_1
- (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete  
 50 repeticiones de trombospondina (tipo 1 y similar a tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplasmático  
 corto, (semaforina) 5B, N.º de acceso de Genbank. AB040878) Nagase T., et al (2000) DNA Res. 7 (2):143-150);  
 WO2004000997 (Reivindicación 1); WO2003003984 (Reivindicación 1); WO200206339 (Reivindicación 1;  
 Página 50); WO200188133 (Reivindicación 1; Página 41-43, 48-58); WO2003054152 (Reivindicación 20);  
 WO2003101400 (Reivindicación 11);  
 55 Acceso: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC:10737;
- (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, gen RIKEN cDNA 2700050C12,  
 N.º de acceso de Genbank. AY358628); Ross et al (2002) Cancer Res. 62:2546-2553;  
 60 US2003129192 (Reivindicación 2); US2004044180 (Reivindicación 12); US2004044179 (Reivindicación 11);  
 US2003096961 (Reivindicación 11); US2003232056 (Ejemplo 5); WO2003105758 (Reivindicación 12);  
 US2003206918 (Ejemplo 5); EP1347046 (Reivindicación 1); WO2003025148 (Reivindicación 20);  
 Referencias cruzadas: GI:37182378; AAQ88991.1; AY358628\_1
- (9) ETBR (receptor de endotelina tipo B, N.º de acceso de Genbank. AY275463);  
 65 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. U.S.A.* 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 JB., 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; WO004045516 (Reivindicación 1); WO2004048938 (Ejemplo 2); WO2004040000 (Reivindicación 151); WO2003087768 (Reivindicación 1); WO200301647 (Reivindicación 1); WO2003016475 (Reivindicación 1); WO200261087 (Fig 1); WO200301649 (Fig 6); WO2003025138 (Reivindicación 12; Página 144); WO200198351 (Reivindicación 1; Página 124-125); EP522868 (Reivindicación 8; Fig 2); WO200177172 (Reivindicación 1; Página 297-299); US2003109676; US6518404 (Fig 3); US5773223 (Reivindicación 1a; Col 31-34); WO004001004;
- (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, N.º de acceso de Genbank. NM\_017763); WO2003104275 (Reivindicación 1); WO2004046342 (Ejemplo 2); WO2003042661 (Reivindicación 12); WO2003083074 (Reivindicación 14; Página 61); WO2003018621 (Reivindicación 1); WO2003024392 (Reivindicación 2; Fig 93); WO200166689 (Ejemplo 6);
- (11) STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen asociado al cáncer de próstata 1, proteína asociada al cáncer de próstata 1, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata 2, proteína de la próstata de seis dominios transmembrana, N.º de acceso de Genbank. AF455138) *Lab. Invest.* 82 (11):1573-1582 (2002); WO2003087306; US2003064397 (Reivindicación 1; Fig 1); WO200272596 (Reivindicación 13; Página 54-55); WO200172962 (Reivindicación 1; Fig 4B); WO2003104270 (Reivindicación 11); WO2003104270 (Reivindicación 16); US2004005598 (Reivindicación 22); WO2003042661 (Reivindicación 12); US2003060612 (Reivindicación 12; Fig 10); WO200226822 (Reivindicación 23; Fig 2); WO200216429 (Reivindicación 12; Fig 10); Referencias cruzadas: GI:22655488; AAN04080.1; AF455138\_1
- (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico de potencial de receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4, N.º de acceso de Genbank. NM\_017636) Xu, X.Z, et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (19):10692-10697 (2001), *Cell* 109 (3):397-407 (2002), *J. Biol. Chem.* 278 (33):30813-30820 (2003); US2003143557 (Reivindicación 4); WO200040614 (Reivindicación 14; Página 100-103); WO200210382 (Reivindicación 1; Fig 9A); WO2003042661 (Reivindicación 12); WO200230268 (Reivindicación 27; Página 391); US2003219806 (Reivindicación 4); 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.º de acceso de Genbank. NP\_003203 o NM\_003212) Ciccociola, A., et al *EMBO J.* 8 (7):1987-1991 (1989), *Am. J. Hum. Genet.* 49 (4):555-565 (1991); US2003224411 (Reivindicación 1); WO2003083041 (Ejemplo 1); WO2003034984 (Reivindicación 12); WO200288170 (Reivindicación 2; Página 52-53); WO2003024392 (Reivindicación 2; Fig 58); WO200216413 (Reivindicación 1; Página 94-95, 105); WO200222808 (Reivindicación 2; Fig 1); US5854399 (Ejemplo 2; Col 17-18); US5792616 (Fig 2); Referencias cruzadas: MIM:187395; NP\_003203.1; NM\_003212\_1
- (14) CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus de Epstein Barr) o Hs.73792 N.º de acceso de 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. U.S.A.* 84,9194-9198,1987; Barel M., et al *Mol. Immunol.* 35,1025-1031,1998; Weis JJ., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., et al (1993) *J. Immunol.*150, 5311-5320; WO2004045520 (Ejemplo 4); US2004005538 (Ejemplo 1); WO2003062401 (Reivindicación 9); WO2004045520 (Ejemplo 4); WO9102536 (Fig 9.1.-9.9); WO2004020595 (Reivindicación 1); Acceso: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.
- (15) CD79b (CD79B, CD79β, Igb (inmunoglobulina beta asociada), B29, N.º de acceso de Genbank. NM\_000626 o 11038674) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2003) 100 (7):4126-4131, *Blood* (2002) 100 (9):3068-3076, Muller et al (1992) *Eur.J. Immunol.* 22 (6):1621-1625; WO2004016225 (Reivindicación 2, Fig 140); WO2003087768. US2004101874 (Reivindicación 1. página 102); WO2003062401 (Reivindicación 9); WO200278524 (Ejemplo 2); US2002150573 (Reivindicación 5, página 15); US5644033; WO2003048202 (Reivindicación 1, páginas 306 y 309); WO 99/558658, US6534482 (Reivindicación 13, Fig 17A/B); WO200055351 (Reivindicación 11, páginas 1145-1146); Referencias cruzadas: MIM:147245; NP\_000617.1; NM\_000626\_1

- (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a de anclaje de fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C, N.º de acceso de 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. U.S.A. 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J., et al (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768-775; WO2004016225 (Reivindicación 2); WO2003077836; WO200138490 (Reivindicación 5; Fig 18D-1-18D-2); WO2003097803 (Reivindicación 12); WO2003089624 (Reivindicación 25); Referencias cruzadas: MIM:606509; NP\_1103912; NM\_030764\_1
- (17) HER2 (ErbB2, N.º de acceso de 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. U.S.A. 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M., et al J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004; Kuhns JJ., 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;  
WO2004048938 (Ejemplo 2); WO2004027049 (Fig 1I); WO2004009622; WO2003081210; WO2003089904 (Reivindicación 9); WO2003016475 (Reivindicación 1); US2003118592; WO2003008537 (Reivindicación 1); WO2003055439 (Reivindicación 29; Fig 1A-B); WO2003025228 (Reivindicación 37; Fig 5C); WO200222636 (Ejemplo 13; Página 95-107); WO200212341 (Reivindicación 68; Fig 7); WO200213847 (Página 71-74); WO200214503 (Página 114-117); WO200153463 (Reivindicación 2; Página 41-46); WO200141787 (Página 15); WO200044899 (Reivindicación 52; Fig 7); WO200020579 (Reivindicación 3; Fig 2); US5869445.(Reivindicación 3; Col 31-38); WO9630514 (Reivindicación 2; Página 56-61); EP1439393 (Reivindicación 7); WO2004043361 (Reivindicación 7); WO2004022709; WO200100244 (Ejemplo 3; Fig 4); Acceso: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1.
- (18) NCA (CEACAM6, N.º de acceso de 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. U.S.A. 99:16899-16903,2002; WO2004063709; EP1439393 (Reivindicación 7); WO2004044178 (Ejemplo 4); WO2004031238; WO2003042661 (Reivindicación 12); WO200278524 (Ejemplo 2); WO200286443 (Reivindicación 27; Página 427); WO200260317 (Reivindicación 2); Acceso: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728;
- (19) MDP (DPEP1, N.º de acceso de Genbank. BC017023)  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26):16899-16903 (2002); WO2003016475 (Reivindicación 1); WO200264798 (Reivindicación 33; Página 85-87); JP05003790 (Fig 6-8); WO9946284 (Fig 9); Referencias cruzadas: MIM:179780; AAH17023.1; BC017023\_1
- (20) IL20R $\alpha$  (IL20Ra, ZCYTOR7, N.º de acceso de 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; EP1394274 (Ejemplo 11); US2004005320 (Ejemplo 5); WO2003029262 (Página 74-75); WO2003002717 (Reivindicación 2; Página 63); WO200222153 (Página 45-47); US2002042366 (Página 20-21); WO200146261 (Página 57-59); WO200146232 (Página 63-65); WO9837193 (Reivindicación 1; Página 55-59); Acceso: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.
- (21) Brevican (BCAN, BEHAB, N.º de acceso de Genbank. AF229053) Gary S.C.. et al Gene 256, 139-147, 2000; Clark H.F., et al Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Strausberg RL., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; US2003186372 (Reivindicación 11); US2003186373 (Reivindicación 11); US2003119131 (Reivindicación 1; Fig 52); US2003119122 (Reivindicación 1; Fig 52); US2003119126 (Reivindicación 1); US2003119121 (Reivindicación 1; Fig 52); US2003119129 (Reivindicación 1); US2003119130 (Reivindicación 1); US2003119128 (Reivindicación 1; Fig 52); US2003119125 (Reivindicación 1); WO2003016475 (Reivindicación 1); WO200202634 (Reivindicación 1);
- (22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5. N.º de acceso de Genbank. NM\_04442) Chan,J. and 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)); WO2003042661 (Reivindicación 12); WO200053216 (Reivindicación 1; Página 41); WO2004065576 (Reivindicación 1); WO2004020583 (Reivindicación 9); WO2003004529 (Página 128-132); WO200053216 (Reivindicación 1; Página 42); Referencias cruzadas: MIM:600997; NP\_004433.2; No\_004442\_1
- (23) ASLG659 (B7h, N.º de acceso de Genbank. AX092328)  
US20040101899 (Reivindicación 2); WO2003104399 (Reivindicación 11); WO2004000221 (Fig 3); US2003165504 (Reivindicación 1); US2003124140 (Ejemplo 2); US2003065143 (Fig 60); WO2002102235 (Reivindicación 13; Página 299);

- US2003091580 (Ejemplo 2); WO200210187 (Reivindicación 6; Fig 10); WO200194641 (Reivindicación 12; Fig 7b); WO200202624 (Reivindicación 13; Fig 1A-1B); US2002034749 (Reivindicación 54; Página 45-46); WO200206317 (Ejemplo 2;
- 5      Página 320-321, Reivindicación 34; Página 321-322); WO200271928 (Página 468-469); WO200202587 (Ejemplo 1; Fig 1); WO200140269 (Ejemplo 3; Páginas 190-192); WO200036107 (Ejemplo 2; Página 205-207); WO2004053079 (Reivindicación 12); WO2003004989 (Reivindicación 1); WO200271928 (Página 233-234, 452-453); WO 0116318;
- 10     (24) PSCA (Precursor del antígeno de las células madre prostáticas, N.º de acceso de Genbank. AJ297436) Reiter RE., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95,1735-1740,1998; Gu Z, et al Oncogene 19, 1288-1296,2000; Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):783-788; WO2004022709, EP1394274 (Ejemplo 11); US2004018553 (Reivindicación 17); WO2003008537 (Reivindicación 1);
- 15     WO200281646 (Reivindicación 1; Página 164); WO2003003906 (Reivindicación 10; Página 288); WO200140309 (Ejemplo 1; Fig 17); US2001055751 (Ejemplo 1; Fig 1b); WO200032752 (Reivindicación 18; Fig 1); WO9851805 (Reivindicación 17; Página 97); WO9851824 (Reivindicación 10; Página 94); WO9840403 (Reivindicación 2; Fig 1B); Acceso: 043653; EMBL; AF043498; AAC39607.1.
- 20     (25) GEDA (N.º de acceso de Genbank. AY260763); proteína de tipo compañero de fusión de la HMGIC de lipoma AAP14954 /pid=AAP14954.1 – Especie Homo sapiens: Homo sapiens (humano) WO2003054152 (Reivindicación 20); WO2003000842 (Reivindicación 1); WO2003023013 (Ejemplo 3, Reivindicación 20); US2003194704 (Reivindicación 45);
- 25     Referencias cruzadas: GI:30102449; AAP14954.1; AY260763\_1
- (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, receptor BLyS 3, BR3, N.º de acceso de Genbank. AF116456); receptor de BAFF/pid=NP\_443177.1 - Homo sapiens Thompson, J.S., et al Science 293 (5537), 2108-2111 (2001); WO2004058309; WO2004011611;
- 30     WO2003045422 (Ejemplo; Página 32-33); WO2003014294 (Reivindicación 35; Fig 6B); WO2003035846 (Reivindicación 70; Página 615-616); WO200294852 (Col 136-137); WO200238766 (Reivindicación 3; Página 133); WO200224909 (Ejemplo 3; Fig 3); Referencias cruzadas: MIM:606269; NP\_443177.1; NM\_052945\_1; AF132600
- 35     (27) CD22 (isoforma CD22-B del receptor de linfocitos B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, N.º de acceso de Genbank. AK026467); Wilson et al (1991) J. Exp. Med. 173:137-146; WO2003072036 (Reivindicación 1; Fig 1); Referencias cruzadas: MIM:107266; NP\_001762.1; NM\_001771\_1
- 40     (28) CD79a (CD79A, CD79 $\alpha$ , inmunoglobulina alfa asociada, una proteína específica de linfocitos B que interacciona covalentemente con la Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie con moléculas de IgM, transduce una señal implicada en la diferenciación de linfocitos B), pl: 4.84, MW: 25028 TM: 2 [P] Gene Chromosome: 19q13.2, N.º de acceso de Genbank. NP\_001774.10) WO2003088808, US20030228319; WO2003062401 (Reivindicación 9); US2002150573 (Reivindicación 4, páginas 13-14);
- 45     WO9958658 (Reivindicación 13, Fig 16); WO9207574 (Fig 1); 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;
- 50     (29) CXCR5 (receptor del linfoma de Burkitt 1, un receptor acoplado a la proteína G que se activa por la quimiocina CXCL13, interviene en la migración de linfocitos y en 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: 854 MW: 41959 TM: 7 [P] Gene Chromosome: 11q23.3, N.º de acceso de Genbank. NP\_001707.1)
- 55     WO2004040000; WO2004015426; US2003105292 (Ejemplo 2); US6555339 (Ejemplo 2); WO200261087 (Fig 1); WO200157188 (Reivindicación 20, página 269); WO200172830 (páginas 12-13); WO200022129 (Ejemplo 1, páginas 152-153, Ejemplo 2, páginas 254-256); WO9928468 (Reivindicación 1, página 38); US5440021 (Ejemplo 2, col 49-52); WO9428931 (Páginas 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;
- 60     (30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula MHC de clase II (antígeno Ia) que une los péptidos y los presenta a los linfocitos T CD4+); 273 aa, pl: 656 MW: 30820 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 6p21.3, N.º de acceso de Genbank. NP\_002111.1) Tonnelle et al (1985) EMBOJ. 4(11):2839-2847; Jonsson et al (1989) Immunogenetics 29(6):411-413; Beck et al (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441; Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903; 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
- 65

Antigens 59:512-519; WO9958658 (Reivindicación 13, Fig 15); US6153408 (Col 35-38); US5976551 (col 168-170); US6011146 (col 145-146); Kasahara et al (1989) Immunogenetics 30(1):66-68; Larhammar et al (1985) J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119;

5 (31) P2X5 (canal iónico activado por ligando del receptor purinérgico P2X 5, canal iónico activado por ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión sináptica y la neurogénesis, cuya deficiencia puede contribuir a la fisiopatología de la inestabilidad idiopática del detrusor); 422 aa, pl: 7.63, MW: 47206 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 17p13.3, N.º de acceso de Genbank. NP\_002552.2)  
Le et al (1997) FEBS Lett. 418(1-2):195-199; WO2004047749; WO2003072035 (Reivindicación 10); Touchman  
10 et al (2000) Genome Res. 10:165-173; WO200222660 (Reivindicación 20); WO2003093444 (Reivindicación 1); WO2003087768 (Reivindicación 1); WO2003029277 (Página 82);

(32) CD72 (antígeno de diferenciación de linfocitos B CD72, Lyb-2) SECUENCIA DE PROTEÍNAS COMPLETA Full maeaity...tafrfpd (1..359; 359 aa), pl: 8.66, MW: 40225 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 9p13.3, N.º de acceso de Genbank. NP\_001773.1)  
15 WO2004042346 (Reivindicación 65); WO2003026493 (Páginas 51-52, 57-58); WO200075655 (Páginas 105-106); Von Hoegen et al (1990) J. Immunol. 144(12):4870-4877; Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903;

20 (33) LY64 (antígeno linfocitario 64 (RP105), proteína de membrana tipo I de la familia de proteínas con repeticiones ricas en leucina (LRR), regula la activación de linfocitos B y la apoptosis, la pérdida de función está asociada a una mayor actividad en pacientes con lupus eritematoso sistémico); 661 aa, pl: 6.20, MW: 74147 TM: [P] Gene Chromosome: 5q12, N.º de acceso de Genbank. NP\_005573.1)  
25 US2002193567; WO9707198 (Reivindicación 11, páginas 39-42); Miura et al (1996) Genomics 38(3):299-304; Miura et al (1998) Blood 92:2815-2822; WO2003083047; WO9744452 (Reivindicación 8, páginas 57-61); WO200012130 (Páginas 24-26);

(34) FcRH1 (proteína de tipo receptor Fc 1, un supuesto receptor del dominio Fc de inmunoglobulina que contiene los dominios similares a Ig tipo C2 e ITAM, puede tener un papel en la diferenciación de linfocitos B); 429 aa, pl: 5.28, MW: 46925 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 1q21-1q22, N.º de acceso de Genbank. NP\_443170.1) WO2003077836; WO200138490 (Reivindicación 6, Fig 18E-1-18-E-2); Davis et al (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):9772-9777; WO2003089624 (Reivindicación 8); EP1347046 (Reivindicación 1); WO2003089624 (Reivindicación 7);

35 (35) IRTA2 (receptor 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas asociado a la translocación, un supuesto inmunorreceptor con posibles papeles en el desarrollo de los linfocitos B y la linfomagénesis; en algunas neoplasias de linfocitos B se produce alteración de la regulación del gen mediante translocación); 977 aa, pl: 6.88 MW: 106468 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 1q21, N.º de acceso de Genbank. Humano:AF343662, AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; Ratón:AK089756, AY158090, AY506558; NP\_112571.1 WO2003024392 (Reivindicación 2, Fig 97); Nakayama et al (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124-127; WO2003077836; WO200138490 (Reivindicación 3, Fig 18B-1-18B-2);

45 (36) TENB2 (TMEFF2, tomorregulina, TPEF, HPP1, TR, supuesto proteoglicano transmembrana, relacionado con Familia EGF/herregulina de los factores de crecimiento y folistatina); 374 aa, Acceso NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP\_057276; NCBI Gene: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; N.º de acceso de Genbank. AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436  
WO2004074320 (SEQ ID NO 810); JP2004113151 (SEQ ID NOS 2,4, 8); WO2003042661 (SEQ ID NO 580);  
50 WO2003009814 (SEQ ID NO 411); EP1295944 (Páginas 69-70); WO200230268 (Página 329); WO200190304 (SEQ ID NO 2706); US2004249130; US2004022727; WO2004063355; US2004197325; US2003232350; US2004005563; US2003124579; Horie et al (2000) 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. Oct 15;94(2):178-84.

55 El anticuerpo parental también puede ser una proteína de fusión que comprende una secuencia de péptido de unión a albúmina (ABP) (Dennis et al. (2002). "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; 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, página 35038; (ii) US 20040001827 en [0076] SEQ ID NOS: 9-22 y (iii) WO 01/45746 en las páginas 12-13, SEQ ID NOS: z1-z14.  
60

## MUTAGÉNESIS

65 El ADN que codifica una variante de una secuencia de aminoácidos del polipéptido de partida se prepara por varios métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, la preparación por mutagénesis dirigida al sitio (o mediada por oligonucleótidos), mutagénesis por PCR y mutagénesis de cassette de un ADN

preparado anteriormente que codifica el polipéptido. Las variantes de anticuerpos recombinantes pueden ser construidas también mediante manipulación de fragmentos de restricción o mediante PCR de extensión por solapamiento con los oligonucleótidos sintéticos. Los cebadores mutagénicos codifican la sustitución(s) del codón de cisteína. Se pueden emplear técnicas de mutagénesis estándar para generar ADN que codifica tales anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína mutantes. Los detalles generales pueden encontrarse 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 y Wiley-Interscience, Nueva York, N. Y., 1993.

La mutagénesis dirigida es un método para preparar variantes de sustitución, es decir, proteínas mutantes. Esta técnica es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Carter (1985) et al *Nucleic Acids Res.* 13: 4431-4443; Ho et al (1989) *Gen (Amst.)* 77:51-59; y Kunkel et al (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82: 488). En resumen, en la realización de la mutagénesis dirigida al sitio de ADN, el ADN de partida se altera hibridando primero un oligonucleótido que codifica la mutación deseada con una sola hebra de tal ADN de partida. Después de la hibridación, se utiliza una ADN polimerasa para sintetizar una segunda hebra entera, usando el oligonucleótido hibridado como cebador, y utilizando la cadena sencilla del ADN de partida como molde. Así, el oligonucleótido que codifica la mutación deseada se incorpora en el ADN de doble cadena resultante. La mutagénesis dirigida al sitio puede llevarse a cabo dentro del gen que expresa la proteína que se mutageniza en un plásmido de expresión y el plásmido resultante puede ser secuenciado para confirmar la introducción de las mutaciones de sustitución de cisteína deseadas (Liu et al (1998) *J. Biol. Chem.* 273:20252-20260). Los protocolos y formato de mutagénesis dirigida al sitio incluyen los que están disponibles comercialmente, por ejemplo QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA).

La mutagénesis por PCR también es adecuada para hacer variantes de secuencia de aminoácidos del polipéptido de partida. Ver Higuchi, (1990) en *PCR Protocols*, pp.177-183, Academic Press; Ito et al (1991) *Gen* 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 utilizan pequeñas cantidades de ADN molde como material de partida en una PCR, los cebadores que difieren ligeramente en la secuencia de la región correspondiente en un ADN molde se pueden utilizar para generar cantidades relativamente grandes de un fragmento de ADN específico que difiere de la secuencia molde sólo en las posiciones donde los cebadores difieren del molde.

Otro método para preparar 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 a mutar. Se identifican el codón o codones en el ADN de partida a mutar. Debe haber un sitio de endonucleasa de restricción único en cada lado del sitio(s) de mutación identificado. Si no existen tales sitios de restricción, pueden generarse usando el método de mutagénesis mediada por oligonucleótidos descrito anteriormente para introducirlos en localizaciones apropiadas en el ADN del polipéptido de partida. El ADN del plásmido se corta en estos sitios para linealizarlo. Se sintetiza un oligonucleótido de doble cadena que codifica la secuencia del ADN entre los sitios de restricción pero que contiene la mutación(es) deseada usando técnicas estándar, en el que las dos hebras del oligonucleótido se sintetizan por separado y luego se hibridan juntas utilizando técnicas estándar. Este oligonucleótido de doble cadena se conoce como el cassette. Este casete está diseñado para tener extremos 5' y 3' que son 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 puede ser confirmado mediante secuenciación de ADN.

Las mutaciones individuales también son generadas por mutagénesis dirigida de oligonucleótidos utilizando ADN plasmídico de doble hebra como molde mediante mutagénesis basada en PCR (Sambrook y Russel, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition; Zoller et al (1983) *Methods Enzymol.* 100:468-500; Zoller, MJ. y Smith, M. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10:6487-6500).

En la presente invención, se usó hu4D5Fabv8 expresado en el fago M13 (Gerstner et al (2002) "Sequence Plasticity In The Antigen-Binding Site Of A Therapeutic Anti-HER2 Antibody", *J Mol.* 321: 851-62) para los experimentos como un sistema modelo. Las mutaciones de cisteína se introdujeron en las construcciones hu4D5Fabv8-fago, hu4D5Fabv8 y ABP-hu4D5Fabv8. Las preparaciones de hu4D5-TioFab-fago se llevaron a cabo utilizando el método de precipitación con polietilenglicol (PEG) como se describió anteriormente (Lowman, Henry B. (1998) *Methods in Molecular Biology (Totowa, New Jersey)* 87 (Combinatorial Peptide Library Protocols) 249- 264).

Los oligonucleótidos se preparan por el método de síntesis de fosforamidita (US 4415732; US 4458066; Beaucage, S. and Iyer, R. (1992) "Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach", *Tetrahedron* 48:2223-2311). El método de la fosforamidita implica además la adición cíclica de unidades monoméricas de nucleótido con un resto 3' fosforamidita reactivo a una cadena de oligonucleótido en crecimiento en un soporte sólido compuesto de vidrio de poro controlado o de poliestireno altamente reticulado y lo más comúnmente en la dirección 3' a 5' en la cual el nucleósido 3' terminal está unido al soporte sólido en el principio de la síntesis (US 5262530). El método se practica generalmente usando sintetizadores disponibles comercialmente automatizados (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los oligonucleótidos pueden marcarse químicamente con restos no

isotópicos para la detección, captura, estabilización u otros fines (Andrus, A. "Chemical methods for 5' non-isotopic labelling of PCR probes and primers" (1995) en PCR 2: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, pp. 39-54; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671; Keller, G. and Manak, M. en DNA Probes Second Edition (1993), Stockton Press, New York, pp. 121-23).

## 5 ENSAYO PHESELECTOR

El ensayo PHESELECTOR (ELISA de fagos para la selección de tioles reactivos) permite la detección de grupos cisteína reactivos en anticuerpos en un formato de ELISA de fagos. El proceso de recubrimiento de la proteína (por ejemplo anticuerpo) de interés en las superficies del pocillo, seguido de la incubación con las partículas de fago y, a continuación el anticuerpo secundario marcado con HRP con detección de absorbancia se detalla en el Ejemplo 2. Las proteínas mutantes expresadas en el fago se pueden seleccionar de una manera rápida, robusta y con alto rendimiento. Se pueden producir bibliotecas de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína y someterse a selección de unión utilizando el mismo enfoque para identificar sitios adecuadamente reactivos de incorporación de Cis libre de bibliotecas de fagos de proteínas aleatorias de anticuerpos u otras proteínas. Esta técnica incluye hacer la reacción de las proteínas mutantes de cisteína que se expresan en fagos con un reactivo de afinidad o grupo informador que también es reactivo con tiol. La Figura 8 ilustra el Ensayo PHESELECTOR mediante una representación esquemática que representa la unión de Fab o TioFab a HER2 (arriba) y TioFab biotinilado a estreptavidina (abajo).

## 20 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El ADN que codifica los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína se aísla fácilmente y se secuencian utilizando procedimientos convencionales (por ej., usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN podría colocarse en vectores de expresión, que luego son transfectados en células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o de otras células hospedadoras de mamífero, tales como células de mieloma (US 5807715; US 2005/0048572; US 2004/0229310) que de otro modo no producen la proteína del anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los rendimientos de los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína hu4D5Fabv8 fueron similares a hu4D5Fabv8 de tipo silvestre. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo incluyen Skerra et al (1993) Curr. Opinión in Immunol. 5: 256-262 y Pluckthun (1992) Immunol. Revs. 130: 151-188.

Después del diseño y selección, los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína, por ejemplo, TioFabs, con residuos de Cis no emparejados altamente reactivos, se pueden producir por: (i) expresión en una célula bacteriana, por ejemplo, sistema de *E. coli* o un sistema de cultivo de células de mamífero (WO 01/00245), por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO) y (ii) purificación utilizando técnicas de purificación de proteínas comunes (Lowman et al (1991) J. Biol. Chem. 266(17):10982-10988).

Los TioFabs se expresaron después de la inducción en 34B8, una cepa de *E. coli* no supresora (Baca et al (1997) Journal of Biological Chemistry 272(16):10678-84). Véase el ejemplo 3a. El sedimento celular cosechado se resuspendió en PBS (solución salina tamponada con fosfato), la lisis total de células se llevó a cabo mediante el paso a través de un microfluidizador y los TioFabs se purificaron por cromatografía de afinidad con proteína G SEPHAROSE™ (Amersham). Los TioFabs se conjugaron con biotina-PEO-maleimida como se ha descrito anteriormente y los TioFabs biotinilados se purificaron adicionalmente por cromatografía de filtración en gel Superdex-200™ (Amersham), que eliminó la biotina libre-PEO-maleimida y la fracción oligomérica de TioFabs.

## 50 ANÁLISIS DE ESPECTROSCOPIA DE MASAS

Se empleó el análisis de cromatografía líquida de ionización por electronebulización y espectrometría de masas (LC-ESI-MS) para la determinación del peso molecular exacto de Fab conjugado con biotina (Cole, R.B. Electro Spray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation And Applications. (1997) Wiley, New York). La secuencia de aminoácidos del péptido hu4D5Fabv8 (A121C) biotinilado se determinó por digestión trípica seguida por análisis de LC-ESI-MS en tándem (Tabla 4, Ejemplo 3b).

El fragmento de anticuerpo Fab hu4D5Fabv8 contiene aproximadamente 445 residuos de aminoácidos, incluyendo 10 residuos de Cis (cinco en la cadena ligera y cinco en la cadena pesada). La estructura de alta resolución del fragmento variable 4D5 humanizado (Fv4D5) se ha establecido, ver: Eigenbrot et al "X-Ray Structures Of The Antigen-Binding Domains From Three Variants Of Humanized Anti-P185her2 Antibody 4D5 And Comparison With Molecular Modeling" (1993) J Mol Biol. 229:969-995). Todos los residuos de Cis están presentes en forma de enlaces disulfuro, por lo tanto, estos residuos no tienen ningún grupo tiol reactivo para conjugarse con el fármaco-maleimida (a no ser tratados con un agente reductor). Por lo tanto, el residuo Cis recién modificado por ingeniería genética, puede permanecer sin emparejar y es capaz de reaccionar con, es decir, conjugarse con un reactivo enlazador electrófilo o intermedio fármaco-enlazador, tal como un fármaco-maleimida. La figura 1A muestra una

representación tridimensional del fragmento de anticuerpo hu4D5Fabv8 derivado por las coordenadas de cristal de rayos X. Las posiciones de estructura de los residuos de Cis modificados por ingeniería genética de las cadenas pesada y ligera se numeran de acuerdo con un sistema de numeración secuencial. Este sistema de numeración secuencial se correlaciona con el sistema de numeración de Kabat (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD) para la variante 4d5v7fabH de trastuzumab de acuerdo con la Figura 1B que muestra el esquema de numeración secuencial (fila superior), comenzando en el extremo N-terminal, se diferencia del esquema de numeración de Kabat (fila inferior) mediante inserciones señaladas por a, b, c. Usando el sistema de numeración de Kabat, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, un FR o CDR del dominio variable. Los sitios variantes de la cadena pesada modificados por ingeniería genética con cisteína se identifican por la numeración secuencial y los esquemas de numeración de Kabat en la siguiente tabla:

Variantes de cadena pesada 4D5Fab	Numeración secuencial	Numeración de Kabat
A40C	Ala-40	Ala-40
A88C	Ala-88	Ala-84
S119C	Ser-119	Ser-112
S120C	Ser-120	Ser-113
A121C	Ala-121	Ala-114
S122C	Ser-122	Ser-115
A175C	Ala-175	Ala-168

Los Fabs mutantes de Cis-fagémido M13 (Figuras 3A y 3B) pueden seleccionarse rápidamente en comparación con las proteínas Fab. La unión del fagémido-TioFab al antígeno y a la estreptavidina se puede ensayar mediante el recubrimiento de HER2 y estreptavidina, respectivamente, en placas de ELISA seguido de ensayo con anti-Fab-HRP (peroxidasa de rábano picante) como se describe en el Ejemplo 2 y se representa en la Figura 8. Este método permitió el control simultáneo del efecto sobre la unión al antígeno y la reactividad del grupo tiol por el residuo de Cis modificado por ingeniería genética/molécula de biotina conjugada. Además, el método puede ser aplicado para detectar los grupos tiol reactivos de cualquier proteína expresada en el fago M13. Los fagémido-TioFabs conjugados o no conjugados se purifican mediante precipitación con PEG simple.

El fragmento de unión a antígeno de 4D5 humanizado (hu4D5Fab) se expresa bien en *E. coli* y se ha expresado en un bacteriófago (Garrard et al (1993) Gene 128: 103-109). El fragmento de anticuerpo Fab hu4D5Fabv8 se expresó en el fago M13 como un sistema modelo en el ensayo basado en ELISA para investigar la reactividad del tiol. La Figura 8 es una representación gráfica del ensayo PHESELECTOR, que representa la unión de un fago TioFab biotinilado y un anticuerpo anti-fago-HRP a HER2 (arriba) y estreptavidina (abajo). Se seleccionaron inicialmente cinco residuos de aminoácidos (L-Ala43, H-Ala40, H-Ser119, Ala121 y H-H-Ser122) a partir de información de la estructura cristalina como remotos respecto a la superficie de unión al antígeno (Eigenbrot et al (1993) J Mol Biol. 229: 969-995). La estructura cristalina de rayos X de la base de datos de proteínas se designa como 1FVC. Los residuos de Cis fueron diseñados en estas posiciones por mutagénesis dirigida al sitio. Las preparaciones TioFab-fago se aislaron y se hicieron reaccionar con el reactivo de biotinilación.

Las variantes conjugadas y no conjugadas con biotina se ensayaron para HER2 y la unión a estreptavidina utilizando un ensayo PHESELECTOR basado en ELISA (Figura 8, Ejemplo 2) con un anticuerpo anti-fago conjugado con HRP (peroxidasa de rábano picante). La interacción de fago-hu4D5Fabv8 no biotinilado (Figura 2A) y fago-hu4D5Fabv8 biotinilado (Figura 2B) con BSA (barra en blanco), HER2 (barra gris) o estreptavidina (barra rellena) se controló a través de un anticuerpo anti-M13-peroxidasa de rábano picante (HRP) mediante el desarrollo de una reacción de HRP estándar y midiendo la absorbancia a 450 nm. La absorbancia producida por la rotación de un sustrato colorimétrico se midió a 450 nm. La reactividad de TioFab con HER2 mide la unión al antígeno. La reactividad de TioFab con estreptavidina mide el grado de biotinilación. La reactividad de TioFab con BSA es un control negativo para la interacción no específica. Como se ve en la Figura 2A, todas las variantes TioFab-fago tienen una unión similar a HER2 en comparación con la del 4D5Fabv8-fago de tipo silvestre. Además, la conjugación con biotina no interfirió en la unión de TioFab a HER2 (Figura 2B).

Sorprendentemente e inesperadamente, las muestras TioFabs-fago mostraron niveles variables de actividad de unión a estreptavidina. De todos los fagos TioFabs ensayados, el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína A121C exhibió la reactividad del tiol máxima. Aunque hu4D5Fabv8-fago de tipo silvestre se incubó con las mismas cantidades de biotina-maleimida, estos fagos tenían poca unión a estreptavidina, lo que indica que los residuos de cisteína preexistentes (que participan en formación de enlaces disulfuro) de hu4D5Fabv8 y de las proteínas de la cubierta del fago M13 no interferían con la conjugación específica del sitio de biotina-maleimida. Estos resultados demuestran que el ensayo ELISA de fagos se puede utilizar con éxito para seleccionar grupos tiol reactivos en la superficie de Fab.

El ensayo PHESELECTOR permite cribar grupos tiol reactivos en anticuerpos. Un ejemplo es la identificación de la variante A121C por este método. La molécula Fab entera puede buscarse eficazmente para identificar más variantes

de tioFab con grupos tiol reactivos. Un parámetro, la accesibilidad superficial fraccionada, se empleó para identificar y cuantificar la accesibilidad de disolvente a los residuos de aminoácidos en un polipéptido. La accesibilidad superficial puede expresarse como el área superficial ( $\text{\AA}^2$ ) que puede ponerse en contacto por una molécula de disolvente, por ejemplo, agua. El espacio de agua ocupado es aproximadamente como una esfera de 1,4  $\text{\AA}$  de radio.

5 El software está libremente disponible o susceptible a licencia (Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom, Fax: (+44) 1925 603825, o por internet: [www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html](http://www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html)) como la Suite CCP4 de programas de cristalografía que emplean algoritmos para calcular la accesibilidad superficial de cada aminoácido de una proteína con coordenadas derivadas de cristalografía de rayos X (The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50:760-763).

10 Dos ejemplos de módulos de software ejemplo que realizan los cálculos de accesibilidad superficial son "AREAIMOL" y "SURFACE", basados en los algoritmos de B. Lee y F.M. Richards (1971) J. Mol. Biol. 55: 379-400. AREAIMOL define la superficie accesible al disolvente de una proteína en el sitio del centro de una esfera de sonda (que representa una molécula de disolvente) ya que rueda sobre la superficie de van der Waals de la proteína.

15 AREAIMOL calcula el área superficial accesible al disolvente generando puntos de superficie sobre una esfera extensa alrededor de cada átomo (a una distancia del centro del átomo igual a la suma del radio del átomo y la sonda) y eliminando aquellos que se encuentran dentro de esferas equivalentes asociadas a átomos vecinos. AREAIMOL encuentra el área accesible al disolvente de átomos en un archivo de coordenadas PDB y resume el área accesible por residuo, por cadena y para la molécula completa. Áreas accesibles (o diferencias de áreas) para átomos individuales pueden escribirse a un archivo de salida pseudo-PDB. AREAIMOL supone un único radio para

20 cada elemento y sólo reconoce un número limitado de elementos diferentes. A los tipos de átomos desconocidos (es decir, los que no están en la base de datos interna de AREAIMOL) se les asignará el radio por defecto de 1,8  $\text{\AA}$ . La lista de átomos reconocidos es:

Átomo	Número atómico	Radio de van der Waals ( $\text{\AA}$ )
C	6	1,80
N	7	1,65
O	8	1,60
Mg	12	1,60
S	16	1,85
P	15	1,90
Cl	17	1,80
Co	27	1,80

25 AREAIMOL y SURFACE informan accesibilidades absolutas, es decir, el número de Angstroms (A) cuadrados. La accesibilidad superficial fraccionada se calcula por referencia a un estado patrón relevante para un aminoácido dentro de un polipéptido. El estado de referencia es el tripéptido Gly-X-Gly en la que X es el aminoácido de interés, y el estado de referencia debería ser una conformación 'extendida', es decir, como aquellas en cadenas beta. La conformación extendida maximiza la accesibilidad de X. Un área accesible calculada se divide entre el área

30 accesible en un estado de referencia del tripéptido Gly-X-Gly e informa el cociente, que es la accesibilidad fraccionada. El porcentaje de accesibilidad es la accesibilidad fraccionada multiplicada por 100.

Otro algoritmo a modo de ejemplo para calcular la accesibilidad superficial se basa en el módulo SOLV del programa xsae (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basilea) que calcula la accesibilidad fraccionada de un residuo de

35 aminoácido con respecto a una esfera de agua basada en las coordenadas de rayos X del polipéptido.

La accesibilidad superficial fraccionada para cada aminoácido en hu4D5Fabv7 se calculó usando la información de la estructura cristalina (Eigenbrot et al. (1993) J Mol Biol. 229: 969-995). Los valores de accesibilidad superficial fraccionada para los aminoácidos de la cadena ligera y la cadena pesada de hu4D5Fabv7 se muestran en orden

40 descendente en la Tabla 1.

Tabla 1.

**hu4D5Fabv7-cadena ligera**

SER	A	202	frac	acc=	101,236	ASP	A	151	frac	acc=	41,586
GLY	A	41	frac	acc=	90,775	SER	A	12	frac	acc=	40,633
GLY	A	157	frac	acc=	88,186	ASN	A	210	frac	acc=	40,158
ASP	A	1	frac	acc=	87,743	SER	A	63	frac	acc=	39,872
SER	A	156	frac	acc=	83,742	ARG	A	66	frac	acc=	39,669
GLY	A	57	frac	acc=	81,611	PRO	A	8	frac	acc=	39,297
SER	A	168	frac	acc=	79,680	SER	A	65	frac	acc=	39,219
SER	A	56	frac	acc=	79,181	SER	A	77	frac	acc=	38,820
LYS	A	169	frac	acc=	77,591	THR	A	180	frac	acc=	38,296
SER	A	60	frac	acc=	75,291	ASP	A	185	frac	acc=	38,234
THR	A	109	frac	acc=	74,603	THR	A	31	frac	acc=	38,106
CYS	A	214	frac	acc=	72,021	THR	A	94	frac	acc=	37,452
LYS	A	126	frac	acc=	71,002	THR	A	93	frac	acc=	37,213
SER	A	67	frac	acc=	66,694	THR	A	197	frac	acc=	36,709

ES 2 579 805 T3

ARG	A	18	frac	acc=	66,126	SER	A	182	frac	acc=	36,424
ASN	A	152	frac	acc=	65,415	GLY	A	128	frac	acc=	35,779
SER	A	127	frac	acc=	65,345	LYS	A	207	frac	acc=	35,638
LYS	A	190	frac	acc=	65,189	ASP	A	17	frac	acc=	35,413
LYS	A	145	frac	acc=	63,342	GLY	A	200	frac	acc=	35,274
GLN	A	199	frac	acc=	62,470	GLU	A	165	frac	acc=	35,067
GLU	A	143	frac	acc=	61,681	ALA	A	112	frac	acc=	34,912
GLN	A	3	frac	acc=	59,976	GLN	A	79	frac	acc=	34,601
LYS	A	188	frac	acc=	59,680	VAL	A	191	frac	acc=	33,935
ARG	A	24	frac	acc=	59,458	SER	A	208	frac	acc=	33,525
PHB	A	53	frac	acc=	58,705	LYS	A	39	frac	acc=	33,446
SER	A	9	frac	acc=	58,446	GLU	A	123	frac	acc=	32,486
GLN	A	27	frac	acc=	57,247	THR	A	69	frac	acc=	32,276
ALA	A	153	frac	acc=	56,538	SER	A	76	frac	acc=	32,108
SER	A	203	frac	acc=	55,864	HIS	A	189	frac	acc=	31,984
LYS	A	42	frac	acc=	54,730	ARG	A	108	frac	acc=	31,915
GLY	A	16	frac	acc=	54,612	ASN	A	158	frac	acc=	31,447
LYS	A	45	frac	acc=	54,464	VAL	A	205	frac	acc=	31,305
PRO	A	204	frac	acc=	53,172	SER	A	14	frac	acc=	31,094
GLU	A	213	frac	acc=	53,084	GLN	A	155	frac	acc=	30,630
ALA	A	184	frac	acc=	52,556	GLU	A	187	frac	acc=	30,328
VAL	A	15	frac	acc=	52,460	ARG	A	211	frac	acc=	30,027
SER	A	7	frac	acc=	51,936	LYS	A	183	frac	acc=	29,751
LEU	A	154	frac	acc=	51,525	ASN	A	138	frac	acc=	29,306
GLN	A	100	frac	acc=	51,195	ASP	A	170	frac	acc=	29,041
SER	A	10	frac	acc=	49,907	SER	A	159	frac	acc=	27,705
THR	A	5	frac	acc=	48,879	GLN	A	147	frac	acc=	27,485
THR	A	206	frac	acc=	48,853	THR	A	22	frac	acc=	27,121
ASP	A	28	frac	acc=	48,758	ALA	A	43	frac	acc=	26,801
GLY	A	68	frac	acc=	48,690	ARG	A	142	frac	acc=	26,447
THR	A	20	frac	acc=	48,675	LEU	A	54	frac	acc=	25,882
ASP	A	122	frac	acc=	47,359	ASP	A	167	frac	acc=	25,785
PRO	A	80	frac	acc=	46,984	THR	A	129	frac	acc=	23,880
SER	A	52	frac	acc=	46,917	ALA	A	144	frac	acc=	23,652
SER	A	26	frac	acc=	46,712	VAL	A	163	frac	acc=	22,261
TYR	A	92	frac	acc=	46,218	PRO	A	95	frac	acc=	20,607
LYS	A	107	frac	acc=	45,912	ALA	A	111	frac	acc=	19,942
GLU	A	161	frac	acc=	45,100	LYS	A	103	frac	acc=	18,647
VAL	A	110	frac	acc=	44,844	LEU	A	181	frac	acc=	18,312
GLU	A	81	frac	acc=	44,578	THR	A	72	frac	acc=	18,226
PRO	A	59	frac	acc=	44,290	GLU	A	195	frac	acc=	18,006
ASN	A	30	frac	acc=	42,721	THR	A	178	frac	acc=	17,499
GLN	A	160	frac	acc=	42,692	THR	A	85	frac	acc=	17,343
SER	A	114	frac	acc=	42,374	ASP	A	70	frac	acc=	17,194
PRO	A	40	frac	acc=	41,928	LEU	A	11	frac	acc=	16,568
PHE	A	116	frac	acc=	16,406	LEU	A	125	frac	acc=	2,398
THR	A	97	frac	acc=	16,204	PRO	A	96	frac	acc=	2,387
ARG	A	61	frac	acc=	16,192	LEU	A	47	frac	acc=	2,180
TYR	A	49	frac	acc=	16,076	ALA	A	51	frac	acc=	1,837
SER	A	50	frac	acc=	15,746	PHE	A	118	frac	acc=	1,779
LYS	A	149	frac	acc=	15,510	PHE	A	62	frac	acc=	1,581
GLU	A	55	frac	acc=	14,927	ALA	A	25	frac	acc=	1,538
LEU	A	201	frac	acc=	14,012	VAL	A	133	frac	acc=	1,315
GLY	A	64	frac	acc=	13,735	ASP	A	82	frac	acc=	1,141
GLY	A	212	frac	acc=	13,396	LEU	A	179	frac	acc=	0,872
PHE	A	98	frac	acc=	12,852	GLN	A	124	frac	acc=	0,787
THR	A	74	frac	acc=	12,169	MET	A	4	frac	acc=	0,778
SER	A	171	frac	acc=	11,536	SER	A	177	frac	acc=	0,693
PRO	A	141	frac	acc=	11,073	SER	A	131	frac	acc=	0,693
PHE	A	83	frac	acc=	10,871	LEU	A	135	frac	acc=	0,654
THR	A	164	frac	acc=	10,325	PHE	A	71	frac	acc=	0,593
ALA	A	32	frac	acc=	9,971	TRP	A	35	frac	acc=	0,448
HIS	A	198	frac	acc=	9,958	PHE	A	209	frac	acc=	0,395
VAL	A	146	frac	acc=	9,861	TYR	A	186	frac	acc=	0,259
SER	A	121	frac	acc=	9,833	LEU	A	78	frac	acc=	0,157
ALA	A	13	frac	acc=	9,615	VAL	A	196	frac	acc=	0,000

ES 2 579 805 T3

GLU	A	105	frac	acc=	9,416	VAL	A	132	frac	acc=	0,000
SER	A	162	frac	acc=	9,304	VAL	A	104	frac	acc=	0,000
ILE	A	117	frac	acc=	8,780	VAL	A	33	frac	acc=	0,000
HIS	A	91	frac	acc=	8,557	VAL	A	29	frac	acc=	0,000
ALA	A	193	frac	acc=	8,547	TYR	A	192	frac	acc=	0,000
GLN	A	37	frac	acc=	8,442	TYR	A	86	frac	acc=	0,000
VAL	A	58	frac	acc=	8,281	TYR	A	36	frac	acc=	0,000
PRO	A	120	frac	acc=	8,095	THR	A	102	frac	acc=	0,000
GLN	A	38	frac	acc=	6,643	SER	A	174	frac	acc=	0,000
PRO	A	113	frac	acc=	6,594	PHE	A	139	frac	acc=	0,000
GLY	A	101	frac	acc=	6,558	LEU	A	136	frac	acc=	0,000
TYR	A	140	frac	acc=	5,894	LEU	A	73	frac	acc=	0,000
VAL	A	115	frac	acc=	5,712	ILE	A	75	frac	acc=	0,000
TYR	A	87	frac	acc=	4,539	ILE	A	48	frac	acc=	0,000
SER	A	176	frac	acc=	4,106	ILE	A	21	frac	acc=	0,000
ILE	A	2	frac	acc=	4,080	GLN	A	90	frac	acc=	0,000
ASN	A	137	frac	acc=	3,906	GLN	A	89	frac	acc=	0,000
TRP	A	148	frac	acc=	3,676	CYS	A	194	frac	acc=	0,000
GLY	A	99	frac	acc=	3,550	CYS	A	134	frac	acc=	0,000
PRO	A	44	frac	acc=	3,543	CYS	A	88	frac	acc=	0,000
LEU	A	175	frac	acc=	3,488	CYS	A	23	frac	acc=	0,000
VAL	A	19	frac	acc=	3,420	ALA	A	130	frac	acc=	0,000
ILE	A	106	frac	acc=	3,337	ALA	A	84	frac	acc=	0,000
PRO	A	119	frac	acc=	2,953	ALA	A	34	frac	acc=	0,000
LEU	A	46	frac	acc=	2,887						
GLN	A	6	frac	acc=	2,860						
TYR	A	173	frac	acc=	2,825						
VAL	A	150	frac	acc=	2,525						
GLN	A	166	frac	acc=	2,525						
THR	A	172	frac	acc=	2,436						
<b>hu4D5Fabv7-cadena pesada</b>											
SER	B	179	frac	acc=	99,479	PRO	B	14	frac	acc=	45,729
GLY	B	42	frac	acc=	95,850	THR	B	54	frac	acc=	45,503
GLU	B	1	frac	acc=	87,276	THR	B	200	frac	acc=	45,369
GLY	B	66	frac	acc=	84,541	LEU	B	177	frac	acc=	45,337
ASP	B	102	frac	acc=	83,794	GLY	B	8	frac	acc=	44,898
SER	B	75	frac	acc=	80,567	SER	B	7	frac	acc=	43,530
GLY	B	140	frac	acc=	80,344	THR	B	69	frac	acc=	43,503
ASN	B	211	frac	acc=	79,588	PRO	B	220	frac	acc=	43,378
GLY	B	197	frac	acc=	78,676	LYS	B	208	frac	acc=	43,138
ASP	B	62	frac	acc=	77,716	LYS	B	30	frac	acc=	42,380
GLY	B	103	frac	acc=	77,176	ALA	B	23	frac	acc=	41,952
SER	B	163	frac	acc=	76,664	GLU	B	46	frac	acc=	41,430
SER	B	139	frac	acc=	74,946	SER	B	25	frac	acc=	41,323
LYS	B	213	frac	acc=	74,442	ARG	B	87	frac	acc=	41,282
ALA	B	165	frac	acc=	74,339	LYS	B	124	frac	acc=	40,888
THR	B	167	frac	acc=	73,934	ASN	B	28	frac	acc=	40,529
SER	B	122	frac	acc=	72,870	GLN	B	3	frac	acc=	39,824
SER	B	194	frac	acc=	71,959	THR	B	123	frac	acc=	39,306
PRO	B	41	frac	acc=	71,540	SER	B	63	frac	acc=	38,867
THR	B	198	frac	acc=	68,668	GLY	B	56	frac	acc=	38,582
SER	B	222	frac	acc=	68,128	GLY	B	169	frac	acc=	38,469
LYS	B	43	frac	acc=	67,782	THR	B	172	frac	acc=	38,421
GLY	B	26	frac	acc=	67,782	PRO	B	209	frac	acc=	38,309
THR	B	138	frac	acc=	65,826	GLY	B	101	frac	acc=	38,040
ASP	B	31	frac	acc=	64,222	TYR	B	109	frac	acc=	36,829
GLY	B	15	frac	acc=	64,172	LYS	B	221	frac	acc=	36,520
SER	B	168	frac	acc=	62,100	GLY	B	44	frac	acc=	35,147
SER	B	120	frac	acc=	61,332	GLY	B	181	frac	acc=	34,735
LYS	B	76	frac	acc=	61,092	THR	B	58	frac	acc=	34,457
GLY	B	141	frac	acc=	59,419	GLY	B	9	frac	acc=	34,254
SER	B	137	frac	acc=	59,179	VAL	B	5	frac	acc=	34,198
TYR	B	57	frac	acc=	58,916	ALA	B	121	frac	acc=	33,049
GLU	B	89	frac	acc=	58,483	SER	B	127	frac	acc=	32,390
SER	B	180	frac	acc=	56,289	GLY	B	10	frac	acc=	32,230
LYS	B	65	frac	acc=	55,044	SER	B	71	frac	acc=	30,659

ES 2 579 805 T3

ASP	B	215	frac	acc=	54,656	ASP	B	73	frac	acc=	30,245
GLN	B	13	frac	acc=	53,719	LEU	B	115	frac	acc=	29,867
GLN	B	112	frac	acc=	53,215	LEU	B	11	frac	acc=	29,825
TYR	B	105	frac	acc=	51,940	ASN	B	84	frac	acc=	29,765
ALA	B	88	frac	acc=	51,602	SER	B	210	frac	acc=	28,656
GLY	B	164	frac	acc=	50,259	GLU	B	155	frac	acc=	28,162
PRO	B	192	frac	acc=	49,826	SER	B	160	frac	acc=	26,526
THR	B	158	frac	acc=	49,694	CYS	B	223	frac	acc=	26,270
THR	B	142	frac	acc=	48,896	GLY	B	16	frac	acc=	26,158
ASN	B	55	frac	acc=	48,344	ILE	B	202	frac	acc=	26,068
LYS	B	136	frac	acc=	48,312	GLN	B	82	frac	acc=	25,836
ARG	B	19	frac	acc=	48,082	SER	B	193	frac	acc=	25,550
PRO	B	156	frac	acc=	47,366	ASN	B	77	frac	acc=	25,418
PRO	B	174	frac	acc=	47,157	ARG	B	59	frac	acc=	25,301
LYS	B	217	frac	acc=	47,102	VAL	B	93	frac	acc=	25,254
GLN	B	199	frac	acc=	46,650	THR	B	74	frac	acc=	24,902
SER	B	17	frac	acc=	45,980	GLU	B	219	frac	acc=	24,778
SER	B	85	frac	acc=	45,824	ASN	B	206	frac	acc=	24,647
VAL	B	170	frac	acc=	24,549	PRO	B	154	frac	acc=	6,767
TYR	B	52	frac	acc=	24,298	PRO	B	133	frac	acc=	6,767
ALA	B	175	frac	acc=	23,804	TRP	B	99	frac	acc=	6,502
LYS	B	216	frac	acc=	23,277	THR	B	32	frac	acc=	6,291
VAL	B	214	frac	acc=	23,150	LEU	B	45	frac	acc=	4,649
GLY	B	125	frac	acc=	22,802	VAL	B	128	frac	acc=	4,515
ASN	B	162	frac	acc=	22,245	ILE	B	51	frac	acc=	4,307
ALA	B	72	frac	acc=	22,166	SER	B	186	frac	acc=	4,084
ALA	B	40	frac	acc=	21,974	PHE	B	173	frac	acc=	3,969
LEU	B	18	frac	acc=	20,273	ARG	B	38	frac	acc=	3,734
THR	B	212	frac	acc=	20,170	TRP	B	47	frac	acc=	3,561
LEU	B	182	frac	acc=	19,619	VAL	B	118	frac	acc=	3,409
TYR	B	33	frac	acc=	19,398	ALA	B	24	frac	acc=	3,376
THR	B	190	frac	acc=	19,365	TYR	B	95	frac	acc=	3,242
VAL	B	176	frac	acc=	18,941	GLU	B	6	frac	acc=	3,216
SER	B	21	frac	acc=	18,929	ALA	B	144	frac	acc=	3,167
SER	B	119	frac	acc=	18,877	ILE	B	70	frac	acc=	1,958
THR	B	91	frac	acc=	18,237	GLY	B	111	frac	acc=	1,868
ASP	B	151	frac	acc=	17,849	LEU	B	4	frac	acc=	1,808
THR	B	114	frac	acc=	17,601	TYR	B	201	frac	acc=	1,758
SER	B	134	frac	acc=	17,571	LEU	B	148	frac	acc=	1,744
LEU	B	196	frac	acc=	17,090	PHE	B	68	frac	acc=	1,708
TYR	B	60	frac	acc=	16,575	VAL	B	188	frac	acc=	1,315
TYR	B	183	frac	acc=	15,968	CYS	B	22	frac	acc=	0,935
VAL	B	2	frac	acc=	15,901	TRP	B	161	frac	acc=	0,876
PRO	B	130	frac	acc=	15,342	LEU	B	131	frac	acc=	0,654
LEU	B	166	frac	acc=	15,268	VAL	B	205	frac	acc=	0,495
GLY	B	100	frac	acc=	15,003	ALA	B	92	frac	acc=	0,356
PHE	B	27	frac	acc=	14,383	ALA	B	79	frac	acc=	0,356
ASN	B	204	frac	acc=	13,873	VAL	B	64	frac	acc=	0,263
PHE	B	104	frac	acc=	13,836	ILE	B	29	frac	acc=	0,227
TYR	B	80	frac	acc=	13,490	VAL	B	218	frac	acc=	0,000
VAL	B	159	frac	acc=	12,782	VAL	B	189	frac	acc=	0,000
ARG	B	67	frac	acc=	12,362	VAL	B	149	frac	acc=	0,000
GLN	B	178	frac	acc=	12,131	VAL	B	116	frac	acc=	0,000
HIS	B	171	frac	acc=	11,412	VAL	B	48	frac	acc=	0,000
SER	B	184	frac	acc=	11,255	VAL	B	37	frac	acc=	0,000
ARG	B	98	frac	acc=	11,115	TYR	B	152	frac	acc=	0,000
PRO	B	53	frac	acc=	11,071	TYR	B	94	frac	acc=	0,000
GLN	B	39	frac	acc=	11,037	TRP	B	36	frac	acc=	0,000
SER	B	195	frac	acc=	10,909	SER	B	187	frac	acc=	0,000
ASP	B	108	frac	acc=	10,525	SER	B	97	frac	acc=	0,000
LEU	B	185	frac	acc=	10,464	MET	B	107	frac	acc=	0,000
GLY	B	113	frac	acc=	10,406	MET	B	83	frac	acc=	0,000
THR	B	78	frac	acc=	10,213	LEU	B	145	frac	acc=	0,000
THR	B	117	frac	acc=	9,990	LEU	B	86	frac	acc=	0,000
LYS	B	150	frac	acc=	9,447	LEU	B	81	frac	acc=	0,000
VAL	B	157	frac	acc=	9,323	LEU	B	20	frac	acc=	0,000

## ES 2 579 805 T3

VAL	B	12	frac	acc=	9,207	ILE	B	34	frac	acc=	0,000
TRP	B	110	frac	acc=	9,069	HIS	B	207	frac	acc=	0,000
ALA	B	143	frac	acc=	8,903	HIS	B	35	frac	acc=	0,000
SER	B	135	frac	acc=	8,897	GLY	B	146	frac	acc=	0,000
PHE	B	129	frac	acc=	8,895	CYS	B	203	frac	acc=	0,000
ARG	B	50	frac	acc=	8,639	CYS	B	147	frac	acc=	0,000
ALA	B	61	frac	acc=	8,547	CYS	B	96	frac	acc=	0,000
ALA	B	132	frac	acc=	7,882	ASP	B	90	frac	acc=	0,000
VAL	B	191	frac	acc=	7,366	ALA	B	106	frac	acc=	0,000
PRO	B	126	frac	acc=	7,258	ALA	B	49	frac	acc=	0,0000
PHE	B	153	frac	acc=	6,918						

Se aplicaron los siguientes dos criterios para identificar los residuos de hu4D5Fabv8 que pueden ser diseñados para sustituir con residuos de Cis:

- 5 1. Los residuos de aminoácidos que están completamente enterrados se eliminan, es decir, menos de 10 % de accesibilidad superficial fraccionada. La Tabla 1 muestra que hay 134 residuos (cadena ligera) y 151 (cadena pesada) de hu4D5Fabv8 que son más del 10 % accesibles (accesibilidad superficial fraccionada). Los diez primeros residuos accesibles Ser, Ala y Val fueron seleccionados debido a su estrecha similitud estructural con Cis con respecto a otros aminoácidos, introduciendo sólo las limitaciones estructurales mínimas en el anticuerpo mediante las nuevas manipulaciones con Cis. También se pueden cribar otros sitios de sustitución de cisteína y pueden ser útiles para la conjugación.
- 10 2. Los residuos se clasifican en función de su papel en las interacciones funcionales y estructurales de Fab. Se seleccionaron los residuos que no están involucrados en las interacciones con el antígeno y distantes de los enlaces disulfuro existentes. Los residuos de Cis recién modificados por ingeniería genética deben ser distintos de, y no interferir con, la unión al antígeno ni desemparejar con cisteínas implicadas en la formación de enlaces disulfuro.
- 15

Los siguientes residuos de hu4D5Fabv8 poseían los criterios anteriores y se seleccionaron para ser reemplazado con Cis: L-V15, LA43, L-V110, L-A144, L-S168, H-A88, H-A121, H-S122, H-A175 y H-S179 (mostrado en la Figura 1).

La reactividad del tiol puede ser generalizada a cualquier anticuerpo en el que la sustitución de aminoácidos con aminoácidos cisteína reactivos pueda hacerse dentro de los intervalos en la cadena ligera seleccionados de: L-10 a L-20; L-38 a L-48; L-105 a L-115; L-139 a L-149; L-163 a L-173; y dentro de los intervalos en la cadena pesada seleccionados de: H-35 a H-45; H-83 a H-93; H-114 a H-127 y H-170 a H-184 y en la región Fc dentro de los intervalos seleccionados de H-268 a H-291; H-319 a H-344; H-370 a H-380 y H-395 a H-405.

La reactividad del tiol también puede ser generalizada a ciertos dominios de un anticuerpo, tales como el dominio constante de la cadena ligera (CL) y los dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Las sustituciones de cisteína que resulta en valores de reactividad del tiol de 0,6 y mayores se pueden hacer en los dominios constantes de cadena pesada de anticuerpos intactos,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ : IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, respectivamente, incluyendo la IgG subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. IgA e IgA2.

Es evidente a partir de los datos de la estructura cristalina que los 10 mutantes Cis seleccionados están muy lejos del sitio de combinación del antígeno, tales como la interfaz con HER2 en este caso. Estos mutantes pueden ser probados experimentalmente para efectos indirectos sobre las interacciones funcionales. Las reactividades del tiol de todas las variantes Fab Cis se midieron y se calcularon como se describe en los Ejemplos 1 y 2, y se presentan en la Tabla 2. Los residuos de L-V15C, L-V110C, H-A88C y H-A121C tienen grupos tiol reactivos y estables (Figuras 3A y 3B). Los mutantes V15C, V110C, A144C, S168C son variantes de Cis de la cadena ligera. Los mutantes A88C, A121C, A175C, S179C son variantes de Cis de la cadena pesada. Era sorprendente e inesperado que los sitios con alta accesibilidad superficial fraccionada no tuvieron la más alta reactividad de tiol tal como se calcula mediante el ensayo PHESELECTOR (Tabla 2). En otras palabras, la accesibilidad superficial fraccionada (Tablas 1, 2) no se correlacionaron con la reactividad tiol (Tabla 2). De hecho, los residuos de Cis modificados por ingeniería genética en los sitios con moderada accesibilidad superficial de 20 % a 80 % (Figura 4A, Tabla 1), o sitios parcialmente expuestos, como los residuos de Ala o Val, presentaban una reactividad del tiol mejor, es decir,  $> 0,6$ , (Figura 3B, Tabla 2) que la Cis introducida en los residuos de Ser, necesitando por lo tanto el uso del ensayo PHESELECTOR en la selección de sitios reactivos con tiol ya que la información de la estructura cristalina por sí sola no es suficiente para seleccionar estos sitios (Figura 3B y 4A ).

Los datos de reactividad del tiol se muestran en las figuras 3A y 3B para los residuos de aminoácidos de los mutantes 4D5 TioFab Cis: (3A) fago-TioFabs no biotinilado (control) y (3B) biotinilado. Los grupos tiol reactivos en la superficie del anticuerpo/Fab se identificaron mediante un ensayo de PHESELECTOR para la interacción de fago-hu4D5Fabv8 no biotinilado (3A) y fago-hu4D5Fabv8 biotinilado (3B) con BSA (barra en blanco), HER2 (barra) o estreptavidina (barra rellena). El ensayo se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 2. Las variantes de la cadena ligera están en el lado izquierdo y las variantes de la cadena pesada están en el lado derecho. La unión de

los mutantes 4D5 TioFab Cis no biotinilado es baja como se esperaba, pero se mantenía una fuerte unión a HER2. La relación entre la unión a estreptavidina y a HER2 de los mutantes de Cis 4D5 TioFab biotinilados da los valores de reactividad del tiol de la Tabla 2. La absorbancia de fondo a 450 nm o cantidades pequeñas de unión a proteína no específicas de los mutantes de Cis 4D5 TioFab biotinilados con BSA es también evidente en la Figura 3B. Los valores de accesibilidad superficial fraccionada de los residuos de aminoácidos seleccionados que fueron sustituidos con un residuo de Cis se muestran en la Figura 4A. La accesibilidad superficial fraccionada se calculó a partir de la estructura hu4D5Fabv7 disponible y se muestra en la Tabla 1 (Eigenbrot et al. (1993) J Mol Biol. 229: 969-995). Los parámetros conformacionales de las estructuras hu4D5Fabv7 y hu4D5Fabv8 son muy constantes y permiten la determinación de cualquier correlación entre los cálculos de la accesibilidad superficial fraccionada de hu4D5Fabv7 y la reactividad del tiol de los mutantes de cisteína hu4D5Fabv8. La reactividad del tiol medido de los residuos de Cis del fago TioFab introducidos en los residuos parcialmente expuestos (Ala o Val) tienen mejor reactividad del tiol en comparación con los introducidos en los residuos de Ser (Tabla 2). Se puede observar a partir de los mutantes de Cis TioFab de la Tabla 2 que hay poca o ninguna correlación entre los valores de reactividad del tiol y la accesibilidad superficial fraccionada.

Los aminoácidos en las posiciones L-15, L-43, L-110, L-144, L-168, H-40, H-88, H-119, H-121, H-122, H-175 y H-179 de un anticuerpo pueden generalmente ser mutados (sustituidos) con aminoácidos de cisteína libres. Intervalos dentro de los 5 residuos de aminoácidos en cada lado de estas posiciones también pueden ser sustituidos por aminoácidos de cisteína libre, es decir, L-10 a L-20; L-38 a L-48; L-105 a L-115; L-139 a L-149; L-163 a L-173; H-35 a H-45; H-83 a H-93; H-114 a H-127 y H-170 a H-184, así como los intervalos en la región Fc seleccionada de H-268 a H-291; H-319 a H-344; H-370 a H-380 y H-395 a H-405, para producir los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína de la invención.

Tabla 2. Reactividad del tiol de los fago-TioFabs

Construcción fago-TioFab	Reactividad del tiol	Accesibilidad superficial fraccionada (%) de la Tabla 1)
hu4D5Fabv8-wt	0.125	-
L-V15C	0.934	52.46
L-A43C	0.385	26.80
L-V110C	0.850	44.84
L-A144C	0.373	23.65
L-S168C	0.514	79.68
H-A40C	0.450	21.97
H-A88C	0.914	51.60
H-S119C	0.680	18.88
H-A121C	0.925	33.05
H-S122C	0.720	72.87
H-A175C	0.19	23.80
H-S179C	0.446	99.48

L = cadena ligera, H = cadena pesada, A = alanina, S = serina, V = valina, C = cisteína  
 La reactividad del tiol se mide como la relación entre la DO<sub>450nm</sub> para la unión a estreptavidina y la DO<sub>450nm</sub> para la unión a HER2 (anticuerpo) (Ejemplo 2). El valor de reactividad del tiol de 1 indica la biotinilación completa del tiol de la cisteína.

Se seleccionaron dos variantes de Cis de la cadena ligera (L-V15C y L-V110C) y dos de la cadena pesada (H-A88C y H-A121C) para el análisis adicional, ya que estas variantes mostraban la mayor reactividad del tiol (Tabla 2).

A diferencia de la purificación del fago, la preparación de Fab puede requerir 2-3 días, dependiendo de la escala de producción. Durante este tiempo, los grupos tiol pueden perder reactividad debido a la oxidación. Para investigar la estabilidad de los grupos tiol en hu4D5Fabv8-fago, se midió la estabilidad de la reactividad del tiol de los fago-tioFabs (Figura 4B). Después de la purificación del TioFab-fago, en el día 1, día 2 y día 4, todas las muestras fueron conjugadas con biotina-PEO-maleimida y se ensayaron con ensayo ELISA de fagos (PHESELECTOR) para determinar la unión a HER2 y estreptavidina. L-V15C, L-V110C, H-A88C y H-A121C retienen cantidades significativas de reactividad del tiol en comparación con otras variantes TioFab (Figura 4B).

ANTICUERPOS MANIPULADOS CON CISTEINA MARCADOS

Los anticuerpos de la invención modificados por ingeniería genética con cisteína pueden conjugarse con cualquier resto marcador que pueda unirse covalentemente al anticuerpo mediante un grupo tiol de cisteína reactivo, (Singh et al. (2002) Anal. Biochem. 304: 147-15; Harlow E. y Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 2ª ed. CRC Press, Boca Raton, FL). El marcador unido puede servir para: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con un segundo marcador para modificar la señal detectable proporcionada por el primero o segundo marcador, por ejemplo, para dar FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia); (iii)

estabilizar interacciones o aumentar la afinidad de unión, con antígeno o ligando; (iv) afectar la movilidad, por ejemplo, movilidad electroforética o permeabilidad a células, por carga, hidrofobia, forma u otros parámetros físicos, o (v) proporcionar un resto de captura, para modular la afinidad de ligandos, unión a anticuerpo/antígeno o complejación iónica.

Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína marcados pueden ser útiles en ensayos de diagnóstico, por ejemplo, para detectar la expresión de un antígeno de interés en células específicas, tejidos o suero. Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo normalmente se marcará con un resto detectable. Existen numerosos marcadores que pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías:

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

Los complejos metal-quelato adecuados como marcadores de anticuerpos para los experimentos de estudios de imagen se divulgan en: los documentos US 5342606; US 5428155; US 5316757; US 5480990; US 5462725; US 5428139; US 5385893; US 5739294; US 5750660; US 5834456; Hnatowich et al (1983) *J. Immunol. Methods* 65:147-157; Meares et al (1984) *Anal. Biochem.* 142:68-78; Mirzadeh et al (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:59-65; Meares et al (1990) *J. Cancer* 1990, Suppl. 10:21-26; Izard et al (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:346-350; Nikula et al (1995) *Nucl. Med. Biol.* 22:387-90; Camera et al (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:955-62; Kukis et al (1998) *J. Nucl. Med.* 39:2105-2110; Verel et al (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Camera et al (1994) *J. Nucl. Med.* 21:640-646; Ruegg et al (1990) *Cancer Res.* 50:4221-4226; Verel et al (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Lee et al (2001) *Cancer Res.* 61:4474-4482; Mitchell, et al (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1105-1112; Kobayashi et al (1999) *Bioconjugate Chem.* 10:103-111; Miederer et al (2004) *J. Nucl. Med.* 45:129-137; DeNardo et al (1998) *Clinical Cancer Research* 4:2483-90; Blend et al (2003) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 18:355-363; Nikula et al (1999) *J. Nucl. Med.* 40:166-76; Kobayashi et al (1998) *J. Nucl. Med.* 39:829-36; Mardirosian et al (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:65-74; Roselli et al (1999) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 14:209-20.

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

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

Ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

- (i) Peroxidasa de rábano picante (HRP) con peroxidasa de hidrógeno como sustrato, en el que la peroxidasa de hidrógeno oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB));
- (ii) fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromogénico; y
- (iii)  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosidasa.

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

Un marcador puede conjugarse indirectamente con un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de marcadores mencionados anteriormente con avidina o estreptavidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a estreptavidina y, por tanto, el marcador puede conjugarse con el anticuerpo de este modo indirecto. Como alternativa, para lograr la conjugación indirecta del marcador con la variante de polipéptido, la variante de polipéptido se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente se conjuga con una variante de polipéptido anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). Por tanto, puede lograrse la conjugación indirecta del marcador con la variante de polipéptido (Hermanson, G. (1996) en *Bioconjugate Techniques* Academic Press, San Diego).

La variante de polipéptido de la presente invención puede emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ELISA, ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pág. 147-158, CRC Press, Inc.).

Un marcador de detección puede ser útil para localizar, visualizar y cuantificar un evento de unión o reconocimiento. Los anticuerpos marcados de la invención pueden detectar receptores de la superficie celular. Otro uso para los anticuerpos detectablemente marcados es un método de inmunocaptura basada en perlas que comprende conjugar una perla con un anticuerpo marcado fluorescente y detectar una señal de fluorescencia tras la unión de un ligando. Las metodologías de detección de la unión similares utilizan el efecto de la resonancia de plasmones superficiales (SPR) para medir y detectar interacciones anticuerpo-antígeno.

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

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

Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína marcados de la invención son útiles como biomarcadores y sondas para estudios de imagen por los diversos métodos y técnicas de estudios de imagen biomédicas y moleculares tales como: (i) RMN (resonancia magnética nuclear); (ii) MicroCT (tomografía computerizada); (iii) SPECT (tomografía computerizada por emisión de fotón único); (iv) PET (tomografía de emisión de positrones) Chen et al. (2004) *Bioconjugate Chem.* 15:41-49; (v) bioluminiscencia; (vi) fluorescencia; y (vii) ultrasonidos. La inmunoescintigrafía es un procedimiento de obtención de imágenes en el que anticuerpos marcados con sustancias radiactivas se administran a un animal o paciente humano y se toma una imagen de sitios en el cuerpo en los que se localiza el anticuerpo (documento US 6528624). Los biomarcadores de obtención de imágenes pueden medirse objetivamente y evaluarse como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Los biomarcadores pueden ser de varios tipos: tipo 0 son marcadores de la historia de una enfermedad y establecen una correlación longitudinal con índices clínicos conocidos, por ejemplo, evaluación de RMN de inflamación sinovial en artritis reumatoide; los marcadores de tipo I capturan el efecto de una intervención según un mecanismo de acción, aun cuando el mecanismo pueda no asociarse a un desenlace clínico; los marcadores de tipo II sirven como criterios de valoración indirectos en los que

el cambio en, o señal de, el biomarcador predice un beneficio clínico para "validar" la respuesta elegida como diana, tal como la erosión ósea medida en artritis reumatoide por CT. Por tanto los biomarcadores de obtención de imágenes pueden proporcionar información terapéutica farmacodinámica (PD) sobre: (i) expresión de una proteína diana, (ii) unión de un agente terapéutico a la proteína diana, es decir, selectividad, y (iii) datos farmacocinéticos de eliminación y semivida. Las ventajas de los biomarcadores de obtención de imágenes *in vivo* con respecto a los biomarcadores basados en laboratorio incluyen: tratamiento no invasivo, cuantificable, evaluación del cuerpo entero, dosificación y evaluación repetitiva, es decir, múltiples momentos temporales y efectos posiblemente transferibles de resultados preclínicos (animal pequeño) a clínicos (ser humano). Para algunas aplicaciones, la obtención de imágenes biológicas suplanta o minimiza el número de experimentos en animales en estudios preclínicos.

Marcadores para obtención de imágenes con radionúclidos incluyen radionúclidos, tales como  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{241}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{211}\text{At}$ , o  $^{213}\text{Bi}$ . El ion radionúclido metálico puede estar complejo con un enlazador quelante tal como DOTA. Los reactivos de enlazadores tales como DOTA-maleimida (4-maleimidobutiramidobencil-DOTA) pueden prepararse mediante la reacción de aminobencil-DOTA con ácido 4-maleimidobutírico (Fluka) activado con cloroformiato de isopropilo (Aldrich), siguiendo el procedimiento de Axworthy et al (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4) : 1802-1807). Los reactivos de DOTA-maleimida reaccionan con los aminoácidos de cisteína libres de los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína y proporcionan un ligando de complejación con metal sobre el anticuerpo (Lewis et al. (1998) Bioconj. Chem. 9:72-86). Los reactivos de marcado de enlazadores quelantes tales como DOTA-NHS (éster de mono-*N*-hidroxisuccinimida de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético) están comercialmente disponibles (Macrocylics, Dallas, TX). La obtención de imágenes diana del receptor con anticuerpos marcados con radionúclidos puede proporcionar un marcador de la activación de la ruta por detección y cuantificación de acumulación progresiva de anticuerpos en tejido tumoral (Albert y col. (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210). Los radiometales conjugados pueden continuar con la degradación intracelular tras la lisosómica.

Los métodos de marcaje de péptidos son bien conocidos. Ver 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, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Glazer et al (1975) Chemical Modification of Proteins Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) Chemical Reagents for Protein Modification, Vols. I and II, CRC Press, New York; Pfliegerer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", Modern Methods in Protein Chemistry, H. Tschesche, Ed., Walter DeGruyter, Berlin and New York; and Wong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez et al (2004) Chem.Eur. J. 10:1149-1155; Lewis et al (2001) Bioconjugate Chem. 12:320-324; Li et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:110-115; Mier et al (2005) Bioconjugate Chem. 16:240-237.

Los péptidos y proteínas marcados con dos restos, un indicador fluorescente e inhibidor de la fluorescencia, en suficiente proximidad se someten a transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Los grupos indicadores son normalmente colorantes fluorescentes que son excitados por luz a cierta longitud de onda y transfieren energía a un grupo aceptor, o inhibidor de la fluorescencia, con el desplazamiento de Stokes apropiado para la emisión a brillo máximo. Los colorantes fluorescentes incluyen moléculas con aromaticidad prolongada, tales como fluoresceína y rodamina, y sus derivados. El indicador fluorescente puede inhibirse parcialmente o significativamente por el resto inhibidor de la fluorescencia en un péptido intacto. Tras la escisión del péptido por una peptidasa o proteasa puede medirse un aumento detectable en la fluorescencia (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assay of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248: 18-34).

Los anticuerpos marcados de la invención también pueden usarse como agente de purificación por afinidad. En este proceso, el anticuerpo marcado se inmoviliza sobre una fase sólida tal como una resina Sephadex o papel de filtro usando métodos muy conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el antígeno que va a purificarse, y después el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra, excepto el antígeno que va a purificarse, que está unido a la variante de polipéptido inmovilizada. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón glicina, pH 5, 0, que liberará el antígeno de la variante de polipéptido.

Los reactivos de marcado normalmente llevan funcionalidad reactiva que puede reaccionar (i) directamente con un tiol de la cisteína de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína para formar el anticuerpo marcado, (ii) con un reactivo de enlazador para formar un producto intermedio de enlazador-marcador o (iii) con un anticuerpo de enlazador para formar el anticuerpo marcado. La funcionalidad reactiva de reactivos de marcado incluye: maleimida, haloacetilo, yodoacetamida, éster de succinimidilo (por ejemplo, NHS, *N*-hidroxisuccinimida), isotiocianato, cloruro de sulfonilo, 2, 6-diclorotriazinilo, éster de pentafluorofenilo y fosforamidito, aunque también pueden usarse otros grupos funcionales.

Un ejemplo de grupo funcional reactivo es el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo (NHS) de un sustituyente de grupo carboxilo sustituyente de un marcador detectable, por ejemplo, biotina o un colorante fluorescente. El éster de NHS del marcador puede formarse previamente, aislarse, purificarse y/o caracterizarse, o puede formarse *in situ* y

hacerse reaccionar con un grupo nucleófilo de un anticuerpo. Normalmente, la forma carboxilo del marcador se activa haciendo reaccionar con alguna combinación de un reactivo de carbodiimida, por ejemplo, dicitclohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida, o un reactivo de uronio, por ejemplo, TSTU (tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil) N,N,N', N'-tetrametiluronio), HBTU (hexafluorofosfato de (O-benzotriazol-1-il) -N, N,N,N'-tetrametiluronio) o HATU (hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il) -N,N,N',N'-tetrametiluronio), un activador, tal como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y N-hidroxisuccinimida para dar el éster de NHS del marcador. En algunos casos, el marcador y el anticuerpo pueden acoplarse por activación *in situ* del marcador y reacción con el anticuerpo para formar el conjugado marcador-anticuerpo en una etapa. Otros reactivos activantes y de acoplamiento incluyen TBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazo-1-il)-1,3,3-tetrametiluronio), TFFH (2-fluoro-hexafluorofosfato de N,N',N",N"-tetrametiluronio), PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio), EEDQ (2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidro-quinolina), DCC (dicitclohexilcarbodiimida) ; DIPCDI (diisopropilcarbodiimida) , MSNT (1- (mesitilen-2-sulfonil)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol) y haluros arilsulfonilo, por ejemplo, cloruro de triisopropilbencenosulfonilo.

#### 15 CONJUGACIÓN DE BIOTINA-MALEIMIDA CON TIOFABS

Las propiedades de los TioFab anteriormente descritas fueron establecidas en la presencia de fago debido a que la fusión del Fab a la proteína de la cubierta del fago puede alterar potencialmente la accesibilidad o reactividad del tiol de la Cis. Por lo tanto, las construcciones de TioFab se clonaron en un vector de expresión bajo el promotor de la fosfatasa alcalina (Chang et al (1987) Gen 55: 189-196) y la expresión del TioFab se indujo mediante células de *E. coli* en crecimiento en el medio libre de fosfato. Los TioFabs se purificaron en una columna de Proteína G SEPHAROSE™ y se analizaron en geles de SDS-PAGE reductores y no reductores. Estos análisis permiten la evaluación de si los TioFabs retuvieron su grupo tiol reactivo o si se volvieron inactivos mediante la formación de enlaces disulfuro intramoleculares o intermoleculares. Los TioFabs L-V15C, L-V110C, H-A88C y H-A121C se expresaron y se purificaron por cromatografía en columna de Proteína G-SEPHAROSE™ (ver secciones Métodos para más detalles). Las proteínas purificadas se analizaron en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras (con DTT) y no reductoras (sin DTT) condiciones. Se pueden utilizar otros agentes reductores tales como BME (beta-mercaptoetanol) en el gel para escindir grupos disulfuro intercatenarios. Es evidente a partir del análisis en gel de SDS-PAGE que la fracción principal (-90 %) de TioFab está en la forma monomérica, mientras que hu4D5Fabv8 de tipo silvestre está esencialmente en la forma monomérica (47 kDa).

TioFab (A121C) y hu4D5Fabv8 de tipo silvestre se incubaron con exceso de 100 veces de biotina-maleimida durante 3 horas a temperatura ambiente y los Fab biotinizados se cargaron en una columna de filtración en gel Superdex-200™. Esta etapa de purificación fue útil en la separación de Fab monomérico de Fab oligomérico y también del exceso de biotina-maleimida libre (o fármaco citotóxico libre).

La Figura 5 muestra la validación de las propiedades de TioFab variantes en ausencia del contexto del fago. Las proteínas de fusión sin fago, hu4D5Fabv8 y hu4D5Fabv8-A121C (TioFab-A121C), se expresaron y se purificaron usando perlas de proteína-G agarosa seguido de incubación con un exceso de 100 veces molar de biotina-maleimida. Se comparó la unión a estreptavidina y HER2 de un TioFab modificado por ingeniería genética con Cis biotinizado y un Fab de tipo silvestre no biotinizado. El grado de conjugación de biotina (la interacción con estreptavidina) y su capacidad de unión a HER2 se controlaron mediante análisis ELISA. Cada Fab se ensayó a 2 ng y 20 ng.

El A121C-TioFab biotinizado retuvo una unión a HER2 comparable a la de hu4D5Fabv8 de tipo silvestre (Figura 5). El Fab de tipo silvestre y A121C-TioFab se purificaron por cromatografía en columna de filtración en gel. Las dos muestras se ensayaron para la unión a HER2 y estreptavidina mediante ELISA usando anticuerpo de cabra anti-Fab-HRP como anticuerpo secundario. Tanto el de tipo silvestre (barra en blanco) como TioFab (barra punteada) tienen una unión similar a HER2 pero sólo TioFab retuvo la unión estreptavidina. Sólo se observó un nivel de fondo de interacción con estreptavidina con hu4D5Fabv8 de tipo silvestre no biotinizado (Figura 5). El análisis de espectro de masas (LC-ESI-MS) TioFab (A121C) biotinizado dio como resultado un pico principal con 48294.5 daltons en comparación con hu4D5Fabv8 de tipo silvestre (47737 daltons). La diferencia de 537,5 daltons entre las dos moléculas se corresponde exactamente con una sola conjugando biotina-maleimida con el TioFab. Los resultados de la secuenciación de proteínas por espectrometría de masas (análisis LC-ESI-espectrometría de masas en tándem) confirmaron además que la molécula de biotina conjugada estaba en el residuo Cis recién diseñados (Tabla 4, Ejemplo 3).

#### 60 CONJUGACIÓN ESPECÍFICA DEL SITIO DE BIOTINA-MALEIMIDA AL PÉPTIDO DE UNIÓN A ALBÚMINA (ABP)-TIOFABS S

La unión de la proteína al plasma puede ser un medio eficaz para mejorar las propiedades farmacocinéticas de las moléculas de vida corta. La albúmina es la proteína más abundante en el plasma. Los péptidos de unión a albúmina del suero (ABP) pueden alterar la farmacodinámica de proteínas de dominios activos fusionadas que incluyen alteración de la captación, penetración y difusión en el tejido. Estos parámetros farmacodinámicos pueden modularse por selección específica de la secuencia de péptidos de unión a la albúmina del suero apropiada (documento US 20040001827). Una serie de péptidos de unión a albúmina se identificaron por cribados de

expresión en fago (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 compuestos de la invención incluyen secuencias de ABP enseñadas por: (i) Dennis et al (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 en las Tablas III y IV, página 35038; (ii) documento US 20040001827 en [0076] SEQ ID NOS: 9-22 y (iii) documento WO 01/45746 en las páginas 12-13, SEQ ID NOS: z1-z14.

Los péptidos de unión a albúmina (ABP)-Fab son modificados por ingeniería genética fusionando un péptido de unión a albúmina con, por ejemplo, el extremo C de la cadena pesada de Fab en la relación estequiométrica 1:1 (1 ABP/1 Fab) . Se mostró que la asociación de estos ABP-Fab a albúmina aumentaba su semivida más de 25 veces en conejos y ratones. Por tanto, los residuos de Cis reactivos anteriormente descritos pueden introducirse en estos ABP-Fab y usarse para la conjugación específica del sitio con fármacos citotóxicos, seguido de estudios en animales *in vivo*. La figura 9 muestra un gráfico de un conjugado de una fusión péptido de unión a albúmina-Fab (ABP-Fab) con enlazador de fármaco.

Ejemplos de secuencias de péptidos de unión a albúmina a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, las secuencias de aminoácidos enumeradas en SEQ ID NOS: 1-5:

CDKTHTGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO:1  
 QRLMEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO:2  
 QRLIEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO:3  
 RLIEDICLPRWGCLWEDD SEQ ID NO:4  
 DICLPRWGCLW SEQ ID NO:5

El péptido de unión a albúmina (ABP) une secuencias de albúmina de múltiples especies (ratón, rata, conejo, bovino, rhesus, babuino, y humanos) con  $K_d$  (conejo) = 0,3  $\mu$ M. El péptido de unión a albúmina no compete con ligandos conocidos por unirse a la albúmina y tiene una semivida ( $T_{1/2}$ ) en conejo de 2,3 h. Las proteínas ABP-TioFab se purificaron en BSA-SEPHAROSE™ seguido de conjugación de biotina-maleimida y la purificación por cromatografía en columna Superdex-S200 como se describe en las secciones anteriores. Las proteínas biotiniladas purificadas fueron homogéneas y carentes de cualquier forma oligomérica (Ejemplo 4).

La Figura 6 muestra las variantes péptido de unión a albúmina (ABP)-TioFab. Los análisis ELISA se llevaron a cabo para ensayar la capacidad de unión de ABP-hu4D5Fabv8-wt, ABP-hu4D5Fabv8-V110C y ABP-hu4D5Fabv8-A121C con albúmina de conejo, estreptavidina y HER2. Los ABP-TioFab biotinilados son capaces de unirse a la albúmina y HER2 con una afinidad similar a la de ABP-hu4D5Fabv8 de tipo silvestre como se confirmó por ELISA (Figura 6) y análisis de la cinética de unión BIAcore (Tabla 3). Una placa de ELISA se recubrió con albúmina, HER2 y SA como se ha descrito. La unión de ABP-TioFab biotinilados a la albúmina, HER2 y SA se ensayaron con anti-Fab HRP. Los ABP-TioFab biotinilados eran capaces de unirse a estreptavidina en comparación con ABP-hu4D5Fabv8 tipo silvestre control no biotinilado lo que indica que los ABP-TioFab se conjugaron con biotina-maleimida como los TioFab de una manera específica del sitio ya que se utilizaron los mismos mutantes Cis para ambas variantes (figura 6).

Tabla 3. Análisis de la cinética BIAcore para la unión de HER2 y albúmina de conejo a ABP-hu4D5Fabv8 de tipo silvestre biotinilado y TioFabs

Anticuerpo	$K_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$K_{off}$ ( $s^{-1}$ )	(nM)
Unión a HER2			
tipo silvestre	4,57 x 10 <sup>5</sup>	4,19 x 10 <sup>-5</sup>	0,0917
V110C	4,18 x 10 <sup>5</sup>	4,05 x 10 <sup>-5</sup>	0,097
A121C	3,91 x 10 <sup>5</sup>	4,15 x 10 <sup>-5</sup>	0,106
Unión a albúmina de conejo			
tipo silvestre	1,66 x 10 <sup>5</sup>	0,0206	124
V110C	2,43 x 10 <sup>5</sup>	0,0331	136
A121C	1,70 x 10 <sup>5</sup>	0,0238	140

ABP = péptido de unión a albúmina

Como alternativa, un péptido de unión a albúmina puede enlazarse con el anticuerpo mediante unión covalente a través de un resto enlazador.

#### DISEÑO DE ABP-TIOFAB CON DOS GRUPOS TIOL LIBRES POR FAB

Los resultados anteriores indican que las cuatro variantes (L-V15C, L-V110C, H-A88C y H-A121C) tioFab (anticuerpos Fab modificados por ingeniería genética con cisteína) tienen grupos tiol reactivos que se pueden utilizar para la conjugación específica del sitio con un reactivo marcador, reactivo enlazador o intermedio fármaco-enlazador. L-V15C puede ser expresado y purificado pero con rendimientos relativamente bajos. Sin embargo los rendimientos de expresión y purificación de las variantes L-V110C, H-A88C y H-A121C fueron similares a los de hu4D5Fabv8. Por lo tanto estos mutantes se pueden utilizar para el análisis adicional y recombinar para obtener más

de un grupo tiol por Fab. Con vistas a este objetivo, se construyeron un grupo tiol en la cadena ligera y uno en la cadena pesada para obtener dos grupos tiol por molécula de Fab (L-V110C/HA88C y L-V110C/H-A121C). Estas dos variantes dobles de Cis se expresaron en un sistema de expresión de *E. coli* y se purificaron. Se encontró que la homogeneidad de los ABP-TioFab purificados biotinilados era similar a la de las variantes individuales de Cis.

Se investigaron los efectos del diseño y obtención de dos residuos de Cis reactivos por Fab (Figura 7). La presencia de una segunda biotina se ensayó determinando la unión de ABP-TioFab biotinilado a SA usando estreptavidina-HRP (Figura 7). Para el análisis de HER2/Fab, se revistió una placa de ELISA con HER2 y se ensayó con anti-Fab HRP. Para el análisis de SA/Fab, se revisión una placa de ELISA con SA y se ensayó con anti-Fab HRP. Para el análisis de SA/SA, se revisión una placa de ELISA se revistió con SA y se ensayó con SA-HRP. La Figura 7. Los análisis de ELISA para la interacción de las variantes Cis ABP-hu4D5Fabv8 biotiniladas con HER2, estreptavidina (SA), HER2/Fab, 10 SA /Fab y SA/SA indican que las interacciones fueron controlados por anti-Fab-HRP, SA-HRP, respectivamente. SA/Fab controla la presencia de biotina sola por Fab y más de una biotina por Fab se controla por análisis de SA/SA. La unión de HER2 con dobles mutantes Cis es similar a la de las variantes de Cis individuales (Figura 7). Sin embargo, el grado de biotinilación en dobles mutantes Cis fue mayor en comparación con una las variantes de una sola Cis debido a la existencia de más de un grupo tiol libre por molécula de Fab (Figura 7).

**MANIPUACIÓN DE VARIANTES TIO IgG DE TRASTUZUMAB**

La cisteína se introdujo en el anticuerpo monoclonal de longitud completa, trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech Inc.) en determinados residuos. Los mutantes Cis sencillos H-A88C, H-A121C y L-V110C de trastuzumab, y los mutantes dobles de cis V110C-A121C y V110C-A121C de trastuzumab se expresaron en células CHO (ovario de hámster chino) mediante fermentación transitoria en medios que contienen cisteína 1 mM. La secuencia de la cadena pesada mutante A88C (450 aa) es la SEQ ID NO: 6. La secuencia de la cadena pesada mutante A121C (450 aa) es la SEQ ID NO: 7. La secuencia de la cadena ligera mutante V110C (214 aa) es la SEQ ID NO: 8.

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFNFKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY  
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRCEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSS  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGG  
PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
QQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

**SEQ ID NO:6**

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFNFKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY  
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSS  
CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGG  
PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
QQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

**SEQ ID NO:7**

**DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS  
RFSQSRSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTCAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT  
LSKADYEXHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

**SEQ ID NO:8**

De acuerdo con una realización, los anticuerpos tio-trastuzumab anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína comprenden una o más de las siguientes secuencias de cadena pesada de la región variable con un amino ácido cisteína libre (SEQ ID NOS: 9-16).

Mutante	Secuencia	SEQ ID NO:
A40C	WVRQCPGKGL	SEQ ID NO:9
A88C	NSLRCEDTAV	SEQ ID NO:10
S119C	LTVCSASTKGPS	SEQ ED NO:11
S120C	LTVSCASTKGPS	SEQ ID NO:12

A121C	LVTVSSCSTKGPS	SEQ ID NO:13
S122C	LVTVSSACTKGPS	SEQ ID NO:14
A175C	HTFPCVLQSSGLYS	SEQ ID NO:15
S179C	HTFPAVLQCSGLYS	SEQ ID NO:16

De acuerdo con otra realización, los anticuerpos tio-trastuzumab modificados por ingeniería genética con cisteína comprenden una o más de las siguientes secuencias de la cadena ligera de la región variable con un amino ácido cisteína libre (SEQ ID NOS: 17-27).

5

Mutante	Secuencia	SEQ ID NO:
V15C	SLSASCGDRV	SEQ ID NO:17
A43C	QKPGKCPKLLI	SEQ ID NO:18
V110C	EIKRTCAAPSV	SEQ ID NO:19
S114C	TCAAPCVFIFPP	SEQ ID NO:20
S121C	FIFPPCDEQLK	SEQ ID NO:21
S127C	DEQLKCGTASV	SEQ ID NO:22
A144C	FYPRECKVQWK	SEQ ID NO:23
A153C	WKVDNCLQSGN	SEQ ID NO:24
N158C	ALQSGCSQESV	SEQ ID NO:25
S168C	VTEQDCKDSTY	SEQ ID NO:26
V205C	GLSSPCTKSFN	SEQ ID NO:27

Las variantes de IgG tio-trastuzumab de longitud completa resultantes se analizaron para determinar la reactividad del tiol y la actividad de unión a HER2. La figura 13A muestra una representación animada de la unión del anticuerpo biotinilado a HER2 inmovilizada y al anticuerpo secundario marcado con HRP para la detección de absorbancia. La Figura 13B muestra las mediciones de unión a HER2 inmovilizado con la detección de la absorbancia a 450 nm (de izquierda a derecha): trastuzumab tipo silvestre (WT) no biotinilado, variantes de tio-trastuzumab conjugadas con biotina-maleimida V110C (cis sencilla), A121C (cis sencilla) y V110C-A121C (cis dobles). Cada variante tio IgG y trastuzumab se ensayó a 1,10 y 100 ng. Las mediciones muestran que los TioMab anti-HER2 biotinilados retienen la actividad de unión a HER2.

10

15

La figura 14A muestra una representación animada de una unión de un anticuerpo biotinilado a HER2 inmovilizada con la unión de biotina a anti-IgG-HRP para la detección de la absorbancia. La Figura 14B muestra las mediciones de unión con la detección de la absorbancia a 450 nm de variantes de tio-trastuzumab conjugado con biotina-maleimida y trastuzumab de tipo silvestre no biotinilado en la unión a estreptavidina. De izquierda a derecha: V110C (cis sencilla), A121C (cis sencilla), V110C/A121C (cis doble) y trastuzumab. Cada variante de tio IgG trastuzumab y trastuzumab parental se ensayó a 1, 10 y 100 ng. Las mediciones muestran que los TioMabs HER2 tienen una alta reactividad tiol.

20

25

La cisteína se introdujo en el anticuerpo anti-EphB2R 2H9 de longitud completa en ciertos residuos. El mutante cis sencillo H-A121C de 2H9 se expresó en células CHO (ovario de hámster chino) mediante fermentación transitoria en medios que contienen cisteína 1 mM. La secuencia de la cadena pesada mutante (450 aa) de 2H9 A121C es la SEQ ID NO: 28.

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMHWVRQAPGKGLEWVGFINPSTGYTDY  
 NQKFKDRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCTRRPKIPRANVFWGQGLVTVSS  
 CSTKGPSVFPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
 PSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
 STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
 QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK**

**SEQ ID NO:28**

30

Los anticuerpos tio-2H9 modificados por ingeniería genética con cisteína comprenden las siguientes secuencias de la cadena pesada de la región constante Fc con un amino ácido cisteína libre (SEQ ID NOS: 29-38).

Mutante	Secuencia	SEQ ID NO:
V273C	HEDPECKFNWYVDGVEVHNAKTKPR	SEQ ID NO:29
V279C	HEDPEVKFNWYCDGVEVHNAKTKPR	SEQ ID NO:30
V282C	HEDPEVKFNWYVDGCEVHNAKTKPR	SEQ ID NO:31
V284C	HEDPEVKFNWYVDGVECHNAKTKPR	SEQ ID NO:32
A287C	HEDPEVKFNWYVDGVEVHNCKTKPR	SEQ ID NO:33

S324C	YKCKVCNKALP	SEQ ID NO:34
S337C	IEKTICKAKGQPR	SEQ ID NO:35
A339C	IEKTISKCKGQPR	SEQ ID NO:36
S375C	KGFYPCDIAVE	SEQ ID NO:37
S400C	PPVLDCDGSFF	SEQ ID NO:38

La Figura 16 muestra el análisis SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) desnaturalizante no reductor (arriba) y reductor (abajo) de las variantes de Fc TioMab 2H9 (de izquierda a derecha, carriles 1-9): A339C; S337C; S324C; A287C; V284C; V282C; V279C y V273C, con el tipo silvestre 2H9, después de la purificación sobre la Proteína A inmovilizada. El carril de la derecha es una escalera marcador de tamaño, indicando que las proteínas intactas son aproximadamente de 150 kDa, los fragmentos de cadena pesada de 50 kDa y los fragmentos de cadena ligera de aproximadamente 25 kDa. La figura 17A muestra el análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida no reductor (izquierda) y reductor (derecha) de las variantes de TioMab 2H9 (de izquierda a derecha, carriles 1-4): L-V15C; S179C; S375C; S400C, después de la purificación sobre la Proteína A inmovilizada. La Figura 17B muestra el análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante no reductor (izquierda) y reductor (+DTT) (derecha) de las variantes de TioMab adicionales 2H9 y 3A5 después de la purificación sobre la Proteína A inmovilizada. Las variantes de TioMab 2H9 (en el Fab así como la región Fc) se expresaron y purificaron como se describe. Como se ve en las figuras 16, 17A y 17B, todas las proteínas son homogéneas en SDS-PAGE seguido por el procedimiento de reducción y la oxidación del Ejemplo 11 para preparar TioMab reactivos para la conjugación (Ejemplo 12).

La cisteína se introdujo en el anticuerpo anti-MUC16 3A5 de longitud completa en ciertos residuos. El mutante de Cis sencillo H-A121C de 3A5 se expresó en células CHO (ovario de hámster chino) mediante fermentación transitoria en medios que contienen cisteína 1 mM. La secuencia de la cadena pesada mutante 3A5 A121C (446 aa) comprende la SEQ ID NO: 39.

**DVQLQESGPGPLVNPSSQSLSLTCTVTGYSITNDYAWNWIROFPGNKLEWNGYINYSGYTTY  
 NPSLKSRI SITRDTSKNQFFLHLNSVTTEDTATYICARWDGGLTYWGQGLTVTVSACSTK  
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  
 LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHHTCPPCPAPELIGGPSVF  
 LFPFKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKN  
 QVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGN  
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK**

**SEQ ID NO:39**

Los anticuerpos anti-MUC16 tio-3A5 modificados por ingeniería genética con cisteína comprenden las siguientes secuencias de la cadena pesada de la región variable con un aminoácido cisteína libre (SEQ ID NOS: 40-44).

Mutante	Secuencia	SEQ ID NO:
F45C	NWIRQC PGNK	SEQ ID NO:40
A90C	LNSCTTEDTAT	SEQ ID NO:41
A121C	GQGTLTVSACSTKGPSVFPL	SEQ ID NO:42
A175C	HTFPCVLQSSGLYS	SEQ ID NO:43
V176C	HTFPAQLQSSGLYS	SEQ ID NO:44

Los anticuerpos anti-MUC16 tio-3A5 modificados por ingeniería genética con cisteína comprenden las siguientes secuencias de la cadena ligera de la región variable con un aminoácido cisteína libre (SEQ ID NOS: 45-49).

Mutante	Secuencia	SEQ ID NO:
L15C	FLSVSCGGRVT	SEQ ID NO:45
A43C	QKPGNCPRLLI	SEQ ID NO:46
V110C	EIKRTCAAPSV	SEQ ID NO:47
A144C	FYPRECKVQWK	SEQ ID NO:48
S168C	VTEQDCKDSTY	SEQ ID NO:49

**REACTIVIDAD DEL TIOL DE LOS TIOMAB**

La reactividad de los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína IgG de longitud completa se midió por biotilación y unión a estreptavidina. Se estableció un ensayo de transferencia Western se creó para detectar el

TioMab que se conjuga específicamente con biotina-maleimida. En este ensayo, los anticuerpos se analizaron en SDS-PAGE y la presencia de biotina se probó específicamente por incubación con estreptavidina-HRP. Como se ve en la figura 18, la interacción estreptavidina-HRP o bien se observa en la cadena pesada o cadena ligera dependiendo de en la cual se está usando la variante cis manipulada y no se ve interacción con el tipo silvestre, lo que indica que las variantes TioMab específicamente se conjugaron con la biotina en el residuo Cis modificado por ingeniería genética. La figura 18 muestra el análisis en gel de desnaturalización de las variantes Tio-IgG biotiniladas, reducidas tras la captura en anti-IgG-HRP inmovilizada (parte superior del gel) y estreptavidina-HRP (gel inferior). Carril 1: 3A5 H-A121C. Carril 2: 3A5 L-V110C. Carril 3: 2H9 H-A121C. Carril 4: ZH9 L-V110C. Carril 5: anti-2H9 EphB2R parental, de tipo silvestre. Cada mutante (carriles 1-4) fue capturado por los anticuerpos anti-IgG con detección de HRP (arriba) lo que indica que la selectividad y afinidad fueron retenidas. La captura por estreptavidina inmovilizada con detección de HRP (parte inferior) confirmó la localización de la biotina en las cadenas pesadas y ligeras. La ubicación de la mutación de cisteína en los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína en los carriles 1 y 3 es la cadena pesada. La ubicación de la mutación de cisteína en los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína en los carriles 2 y 4 es la cadena ligera. El sitio de la mutación de la cisteína se somete a conjugación con el reactivo de biotina-maleimida.

El análisis de los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína TioMab de la Figura 18 y una variante 2H9 V15C por LC/MS dio indicación cuantitativa de la reactividad del tiol (Tabla 5).

Tabla 5. Cuantificación por LC/MS de la biotinilación de los TioMab – reactividad del tiol

Variante TioMab	Número de biotina por TioMab
2H9 wt	0.0
2H9 L-V15C	0.6
2H9 L-V110C	0.5
2H9 H-A121C	2.0
3A5 L-V110C	1.0
3A5 H-A121C	2.0

La introducción de la cisteína se llevó a cabo en el dominio constante, es decir región Fc, de los anticuerpos IgG. Varios sitios de aminoácidos se convirtieron en sitios de cisteína y los mutantes expresados, los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína, fueron evaluados en cuanto a la reactividad del tiol. Las variantes de Fc TioMab 2H9 biotiniladas se evaluaron en cuanto a la reactividad del tiol por cuantificación con HRP por captura en estreptavidina inmovilizada en un ensayo ELISA (Figura 19). Se estableció un ensayo ELISA para cribar rápidamente los residuos de Cis con grupos tiol reactivos. Como se representa en el diagrama esquemático de la figura 19, la interacción estreptavidina-biotina se controla probando con anti-IgG-HRP seguido de la medición de la absorbancia a 450 nm. Estos resultados confirmaron las variantes 2H9-TioFc V282C, A287C, A339C. S375C y S400C tenían reactividad del tiol de moderada a alta reactividad. El grado de conjugación de biotina de las variantes de Fc TioMab 2H9 se cuantificó por análisis de LS/MS como se informa en la Tabla 6. El análisis LS/MS confirmó que las variantes A282C, S375C y S400C tenían 100% de conjugación con biotina y V284C y A339C tenían 50% de conjugación, lo que indica la presencia de un grupo tiol de la cisteína reactivo. Las otras variantes TioFc, y la parental, de tipo silvestre 2H9, o bien tenían muy poca o ninguna biotinilación.

Tabla 6 Cuantificación por LC/MS de la biotinilación de los Fc TioMab 2H9

Variante de Fc TioMab 2H9	% de biotinilación
V273C	0
V279C	31
V282C	100
V284C	50
A287C	0
S324C	71
S337C	0
A339C	54
S375C	100
S400C	100
(2H9 tipo silvestre)	0

REACTIVIDAD DEL TIOL DE LAS VARIANTES DE LA CADENA LIGERA DE FAB TIO-4D5

El cribado de varias variantes Fab de la cadena ligera modificados por ingeniería genética con cisteína del anticuerpo antiErbB2 4D5 dio un número de variantes con un valor de reactividad tiol de 0,6 y mayor (Tabla 7), tal como se mide por el ensayo de PHESELECTOR de la Figura 8. Los valores de reactividad tiol de la Tabla 7 se normalizan a la variante TioFab de la cadena pesada 4D5 (HC-A121C) que se fija en 100%, suponiendo biotinilación completa de la variante HC-A121C, y representada como valores por ciento.

Tabla 7 Reactividad del tiol en valores porcentuales de las variantes de la cadena ligera de TioFab 4D5

Variante de TioFab 4D5	Valor de reactividad del tiol (%)
V15C	100
V110C	95
S114C	78
S121C	75
S127C	75
A153C	82
N158C	77
V205C	78
(HC-A121C)	100
(tipo silvestre 4D5)	25

CONJUGADOS ANTICUERPO-FÁRMACO

5 Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína de la invención se pueden conjugar con cualquier agente terapéutico, es decir, resto de fármaco, el cual se puede unir covalentemente al anticuerpo a través de un grupo tiol de cisteína reactivo.

10 Un ejemplo de realización de un compuesto conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) comprende un anticuerpo (Ab) modificado por ingeniería genética con cisteína y un resto de fármaco (D) en el que el anticuerpo tiene uno o más aminoácidos de cisteína libres que tienen un valor de reactividad del tiol en el intervalo de 0,6 a 1,0 y el anticuerpo está unido a través del uno o más aminoácidos libres por un resto enlazador (L) a D; teniendo la composición la Fórmula L

15 
$$\text{Ab-(L-D)}_p \quad \text{I}$$

donde p es 1, 2, 3, o 4. El número de restos de fármaco que pueden estar conjugados a través de un resto enlazador reactivo con tiol a una molécula de anticuerpo está limitado por el número de residuos de cisteína que se introducen por los métodos descritos en la presente memoria. Ejemplos de ADC de Fórmula I, por tanto, comprenden anticuerpos que tienen 1, 2, 3, o 4 aminoácidos modificados por ingeniería genética con cisteína.

25 Otro ejemplo de realización de un compuesto conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) comprende un anticuerpo (Ab) modificado por ingeniería genética con cisteína, un péptido de unión a albúmina (ABP) y un resto de fármaco (D) en el que el anticuerpo está unido al resto de fármaco por un resto enlazador (L) y el anticuerpo está unido al péptido de unión a albúmina mediante un enlace amida o un segundo resto enlazador; teniendo la composición la Fórmula Ia:

$$\text{ABP-Ab-(L-D)}_p \quad \text{Ia}$$

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

30 Los compuestos de ADC de la invención incluyen aquellos que tienen utilidad para la actividad contra el cáncer. En particular, los compuestos incluyen un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína conjugado, es decir, unido covalentemente por un enlazador, a un resto de fármaco, es decir, la toxina. Cuando el fármaco no está conjugado con un anticuerpo, el fármaco tiene un efecto citotóxico o citostático. La actividad biológica del resto de fármaco se modula así por la conjugación a un anticuerpo. Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención proporcionan selectivamente una dosis eficaz de un agente citotóxico al tejido tumoral mediante el cual se puede lograr una mayor selectividad, es decir, una dosis más baja eficaz.

40 En una realización, la biodisponibilidad del ADC de la invención, o un metabolito intracelular del ADC, se mejora en un mamífero en comparación con un compuesto de fármaco que comprende el resto de fármaco del ADC. También, la biodisponibilidad del ADC, o un metabolito intracelular del ADC se mejora en un mamífero en comparación con el análogo de la ADC que no tiene el resto de fármaco.

RESTOS DE FÁRMACO

45 El resto de fármaco (D) de los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) incluye cualquier compuesto, resto o grupo que tiene un efecto citotóxico o citostático. Restos de fármaco incluyen: (i) agentes quimioterapéuticos, que pueden funcionar como inhibidores de la microtubulina, inhibidores de la mitosis, inhibidores de la topoisomerasa, o intercaladores de ADN; (ii) las toxinas de proteínas, que pueden funcionar enzimáticamente; y (iii) radioisótopos.

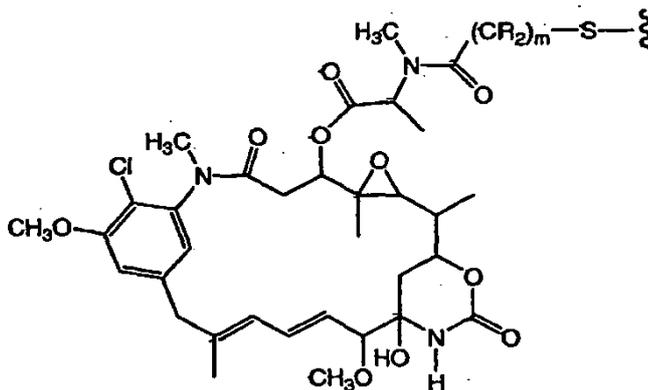
50 Ejemplos de restos de fármaco incluyen, pero no se limitan a, un maitansinoide, una auristatina, un dolastatina, un tricoteceno, CC1065, una caliqueamicina y otros antibióticos de enedina, un taxano, una antraciclina, y estereoisómeros, isómeros, análogos o derivados de los mismos.

Compuestos maitansina adecuados para el uso como restos de fármaco maitansinoide son bien conocidos en la técnica, y se pueden aislar de fuentes naturales de acuerdo con métodos conocidos, producidos mediante técnicas de ingeniería genética (véase Yu et al (2002) PROC. NAT. ACAD. SCL (USA) 99:7968-7973) o maitansinol y análogos de maitansinol preparados sintéticamente de acuerdo con métodos conocidos.

Ejemplos de restos de fármaco maitansinoides incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado, tal como: C-19-descloro (documento US 4256746) (preparado por reducción con hidruro de litio y aluminio de ansamitocina P2); C-20-hidroxi (o C-20-desmetilo) +/-C-19-descloro (patentes US-4361650 y US-4307016) (preparado por desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* o de cloración usando LAH) y C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (patente US-4.294.757) (preparado por acilación usando cloruros de acilo) y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones.

Ejemplos de restos de fármacos maitansinoides también incluyen aquellos que tienen modificaciones tales como: C-9-SH (documento US 4424219) (preparado por la reacción de maitansinol con H<sub>2</sub>S o P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>); C-14-alcoximetilo(desmetoxi/CH<sub>2</sub>OR) (documento US 4331598); C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH<sub>2</sub>OH o CH<sub>2</sub>OAc) (documento US 4450254) (preparado a partir de Nocardia); C-15-hidroxi/aciloxi (documento US 4.364.866) (preparado por la conversión de maitansinol por *Streptomyces*); C-15-metoxi (patentes US-4.313.946 y US-4.315.929) (aislado de *Trewia nudiflora*); C-18-N-desmetilo (patentes US-4.362.663 y US-4.322.348) (preparado por la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*) y 4,5-desoxi (documento US 4371533) (preparado por la reducción con tricloruro de titanio/LAH de maitansinol). Por ejemplo, para la formación de un enlace éster, son adecuadas la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo.

El resto de fármaco (D) de los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de Fórmula I incluye maitansinoides que tienen la estructura:

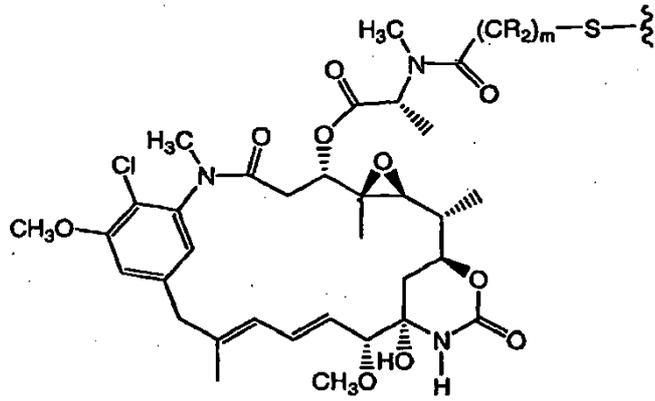


donde la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre de D a un enlazador (L) de un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC). R puede ser independientemente H o un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> seleccionado de metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, 1-butilo, 2-metil-1-propilo, 2-butilo, 2-metil-2-propilo, 1-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-2 pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2-metil-3-pentilo, 2,3-dimetil-2-butilo y 3,3-dimetil-2-butilo. La cadena de alquileo que une el grupo amida al átomo de azufre puede ser metanilo, etanilo o propilo, es decir, m es 1, 2, o 3.

Los compuestos maitansina inhiben la proliferación celular mediante la inhibición de la formación de 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 altamente citotóxicos pero su uso clínico en la terapia del cáncer ha sido en gran medida limitada por sus graves efectos secundarios sistémicos atribuidos principalmente a su escasa selectividad para los tumores. Los ensayos clínicos con maitansina se habían suspendido debido a los efectos adversos graves en el sistema nervioso central y el sistema gastrointestinal (Issel et al (1978) Can. El tratamiento Rev. 5: 199-207).

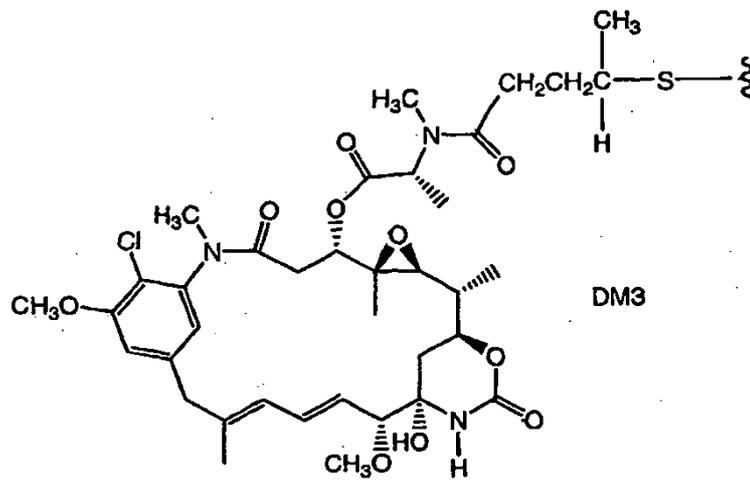
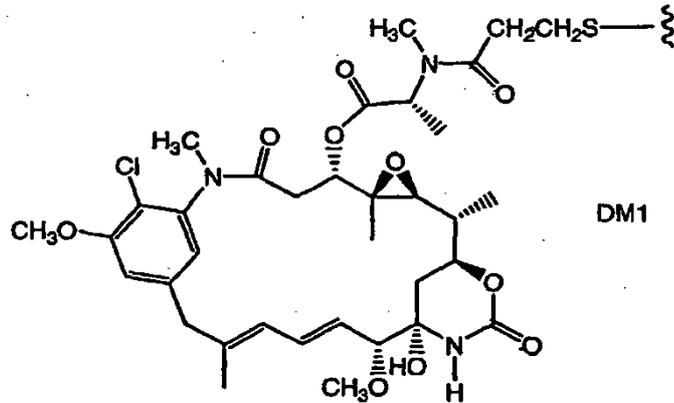
Los restos de fármacos maitansinoides son restos de fármaco atractivos en conjugados de anticuerpo fármaco debido a que son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química o derivatización de productos de fermentación, (ii) favorecen la derivatización con grupos funcionales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

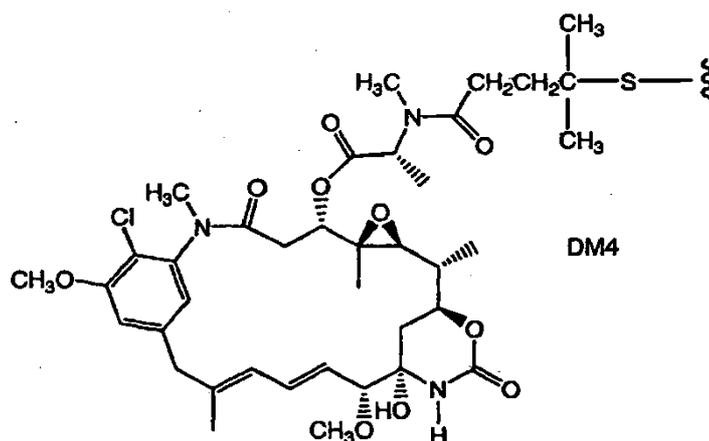
Como sucede con otros restos de fármaco, todos los estereoisómeros del resto de fármaco maitansinoide se contemplan para los compuestos de la invención, es decir, cualquier combinación de las configuraciones R y S en los carbonos quirales de D. En una realización, el resto de fármaco maitansinoide (D) tendrá la siguiente estereoquímica:



Ejemplos de realizaciones de restos de fármaco maitansinoide incluyen: DM1, DM1,  $(CR_2)_m = CH_2CH_2$ ; DM3,  $(CR_2)_m = CH_2CH_2CH(CH_3)$  y DM4.  $(CR_2)_m = CH_2CH_2C(CH_3)_2$ , que tienen las estructuras:

5





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

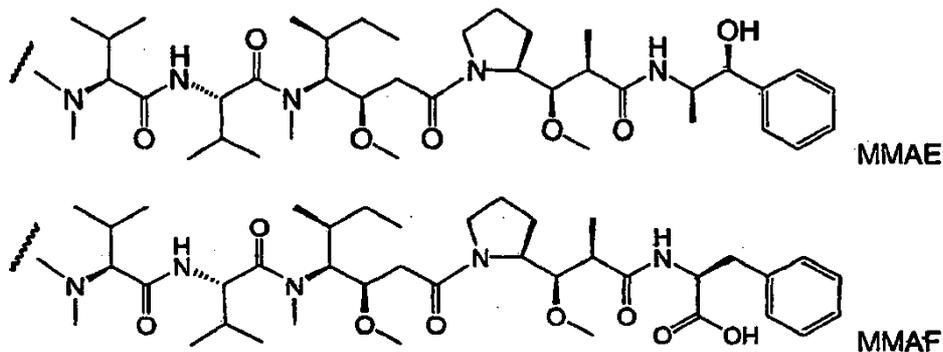
- 5 Los conjugados resto de fármaco (D) de los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de Fórmula I también incluyen dolastatinas y sus análogos peptídicos, las auristatinas (patentes US-5.635.483; US-5.780.588). Se ha demostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45 (12):3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (documento US 5.663.149) y antifúngica (Pettit y col. (1998) Antimicrob. Agents and Chemother. 42:2961-2965). Varias formas de un resto de fármaco dolastatina o auristatina se pueden unir covalentemente a un anticuerpo a través del extremo N (amino) o el extremo C (carboxilo) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172; Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; Francisco et al (2003) Blood 102(4):1458-1465).
- 10 Los restos de fármaco incluyen dolastatinas, auristatinas (documentos US 5635483; US 5780588; US 5767237; US 6124431) y análogos y derivados de las mismas. Se ha demostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45 (12):3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (documento US 5.663.149) y antifúngica (Pettit y col. (1998) Antimicrob. Agents and Chemother. 42:2961-2965). El resto de fármaco de dolastatina o auristatina puede estar unido al anticuerpo a través del extremo N (amino) o al extremo C (carboxilo) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172).
- 15 20 25

Ejemplos de realizaciones de auristatina incluyen los restos de fármaco monometilauristatina unida al N terminal DE y DF, divulgadas en: el documento WO 2005/081711; Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research Volumen 45, Número de resumen 623, presentado el 28 de marzo de 2004, la divulgación de cada uno de los cuales se incorporan expresamente por referencia en su totalidad.

30

El resto de fármaco (D) de los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de Fórmula I incluyen los restos de fármaco monometilauristatina MMAE y MMAF unidos a través del N-terminal con el anticuerpo, y que tiene las estructuras:

35



- 40 Normalmente, los restos de fármaco basados en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptido. Tales enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, según

el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K Lübke, "The Peptides", volumen 1, pág. 76-136, 1965, Academic Press) que es muy conocido en el campo de la química de los péptidos.

El resto de fármaco incluye caliqueamicina y análogos y derivados de la misma. La familia de antibióticos de la caliqueamicina puede producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones inferiores a picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina véanse los documentos US 5712374; US 5714586; US 5739116; US 5767285; US 5770701, US 5770710; US 5773001; US 5877296. Los análogos estructurales de la caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a,  $\gamma_1^1$ ,  $\alpha_2^1$ ,  $\alpha_3^1$ , N-acetil- $\gamma_1^1$ , PSAG y  $\theta^1$  (Hinman et al Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al Cancer Research 58:2925-2928 (1998)).

Las toxinas proteína incluyen: cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina (Vitetta et al (1987) Science, 238:1098), cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos (documento WO 93/21232).

Radioisótopos terapéuticos incluyen:  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Pb}$  e isótopos radiactivos de Lu.

El radioisótopo u otros marcadores se pueden incorporar en el conjugado según las formas conocidas (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57; "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" Chatal, CRC Press 1989). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación del radionúclido con el anticuerpo (documento WO94/11026).

## ENLAZADORES

Un "enlazador" (L) es un resto bifuncional o multifuncional que puede ser utilizado para enlazar uno o más restos de fármacos (D) y una unidad de anticuerpo (Ab) para formar conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de Fórmula I. Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) se pueden preparar convenientemente usando un enlazador que tiene funcionalidad reactiva para la unión al fármaco y al anticuerpo. Un tiol de cisteína de un anticuerpo (Ab) modificado por ingeniería genética con cisteína pueden formar un enlace con un grupo funcional de un reactivo enlazador, un resto de fármaco o intermedio fármaco-enlazador.

En un aspecto, un enlazador tiene un sitio reactivo que tiene un grupo electrófilo que es reactivo frente a una cisteína nucleófila presente en un anticuerpo. El tiol de la cisteína del anticuerpo es reactivo con un grupo electrófilo en un enlazador y forma un enlace covalente con un enlazador. Grupos electrófilos útiles incluyen, pero no se limitan a, grupos maleimida y haloacetamida.

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

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



en la que:

- A- es una unidad de estirador covalentemente unida a un tiol de la cisteína del anticuerpo (Ab);

a es 0 o 1;

cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido;

w es independientemente un número entero que oscila de 0 a 12;

-Y- es una unidad espaciadora covalentemente unida al resto de fármaco; e

y es 0, 1 o 2.

## UNIDAD DE ESTIRADOR

La unidad de estirador (-A-), cuando está presente, puede unir una unidad de anticuerpo a una unidad de aminoácido (-W-). A este respecto, un anticuerpo (Ab) tiene un grupo tiol de la cisteína libre que puede formar un enlace con un grupo funcional electrófilo de una unidad de estirador. Unidades de estirador representativas de esta realización se representan dentro de los corchetes cuadrados de Fórmulas IIIa y IIIb en las que Ab-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se definen anteriormente y  $R^{17}$  es un radical divalente seleccionado de  $(\text{CH}_2)_r$ , carbociclilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ ,  $\text{O}-(\text{CH}_2)_n$  arileno,  $(\text{CH}_2)_r$ -arileno, -arileno- $(\text{CH}_2)_r$ -,  $(\text{CH}_2)_r$ -(carbociclilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ ), (carbociclilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ )-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-, heterociclilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ ,  $(\text{CH}_2)_r$ -(heterociclilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ ), -(heterociclilo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ )-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-,  $(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b$ -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-,  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -,  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -

CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C-(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-, and -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-; donde R<sup>b</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo o bencilo; y r es independientemente un número entero que oscila de 1-10.

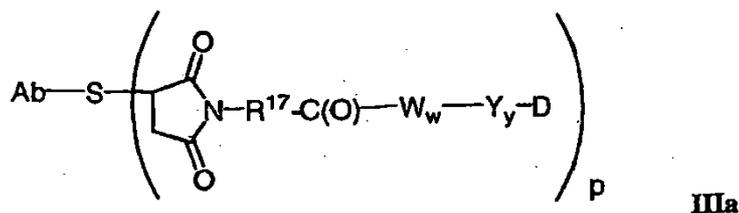
5 Arileno incluye radicales de hidrocarburo aromático divalente de 6-20 átomos de carbono derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno del sistema de anillo aromático parental. Grupos arileno típicos incluyen, pero no se limitan a, radicales derivados de benceno, benceno sustituido, naftaleno,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

10 Grupos heterocíclico incluyen un sistema de anillo en el que uno o más átomos del anillo es un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre. El radical heterociclo comprende 1 a 20 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene 3 a 7 miembros de anillo (2 a 6 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S) o un biciclo que tiene 7 a 10 miembros de anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S), por ejemplo: un sistema de biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6]. Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, Nueva York, 1968), particularmente los Capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 hasta el presente), en particular los volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82: 5566.

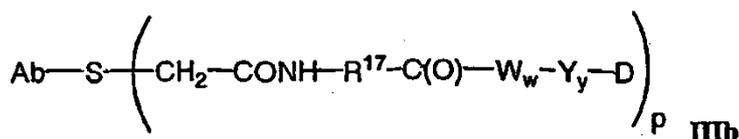
20 Ejemplos de heterociclos incluyen a modo de ejemplo y no limitación piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo oxidado con azufre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo,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

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

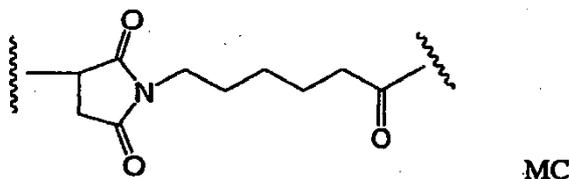
40 Debe entenderse de todos los ejemplos de realizaciones de ADC de Fórmula I tales como III-VI, que incluso cuando no se denote expresamente, de 1 a 4 restos de fármaco están unidos a un anticuerpo (p = 1-4), dependiendo del número de residuos de cisteína modificados por ingeniería genética.



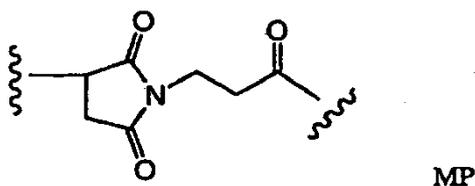
45



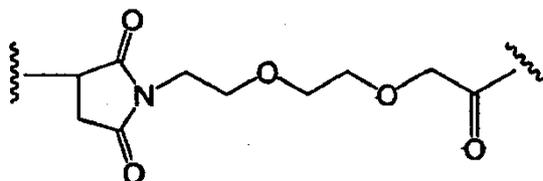
Un ejemplo de unidad de estirador es el de Fórmula IIIa y se deriva de maleimido-caproil (MC) en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-:



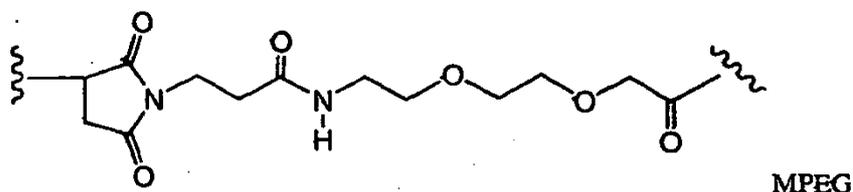
5 Un ejemplo de unidad de estirador es el de Fórmula IIIa y se deriva de maleimido-propanoil (MP) en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-:



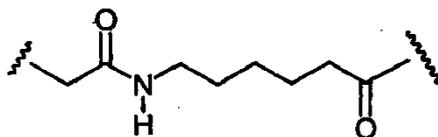
10 Otro ejemplo de unidad de estirador es el de Fórmula IIIa en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>- y r es 2:



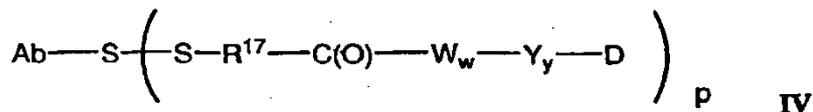
15 Otro ejemplo de unidad de estirador es el de Fórmula IIIa en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>- donde R<sup>b</sup> es H y cada r es 2:



20 Otro ejemplo de unidad de estirador es el de Fórmula IIIa en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-:

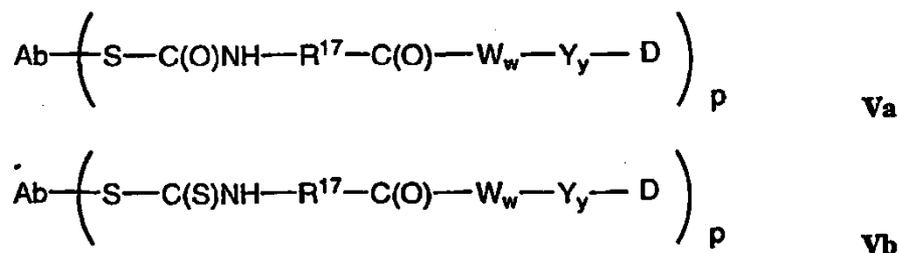


25 En otra realización, la unidad de estirador está ligada a la unidad de anti-anticuerpo por un enlace disulfuro entre un átomo de azufre de la unidad de anticuerpo y un átomo de azufre de la unidad de estirador. Una unidad de estirador representativa de esta realización se representa por la Fórmula IV en la que R<sup>17</sup>, Ab-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se definen anteriormente.



30 En otra realización más, el grupo reactivo del estirador contiene un grupo funcional reactivo con tiol que puede formar un enlace con un tiol de la cisteína libre de un anticuerpo. Ejemplos de grupos funcionales de reacción con tiol incluyen, pero no se limitan a, maleimida, α-haloacetilo, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres 4-nitrofenílicos, ésteres pentafluorofenílicos, ésteres tetrafluorofenílicos, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Unidades de estirador representativas de esta realización se representan por las Fórmulas Va y Vb, en las que -R<sup>17</sup>-, Ab-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se definen anteriormente

35

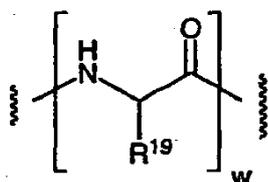


5 En otra realización, el enlazador puede ser un enlazador de tipo dendrítico para la unión covalente de más de un resto de fármaco mediante un resto de enlazador multifuncional de ramificación con un anticuerpo (Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12: 2213-2215; Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768; King (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990). Los enlazadores dendríticos pueden aumentar la  
 10 relación molar entre el fármaco y el anticuerpo, es decir, la carga, que está relacionada con la potencia del ADC. Por tanto, si un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína lleva sólo un grupo tiol de la cisteína reactivo, una multitud de restos de fármaco pueden unirse mediante un enlazador dendrítico.

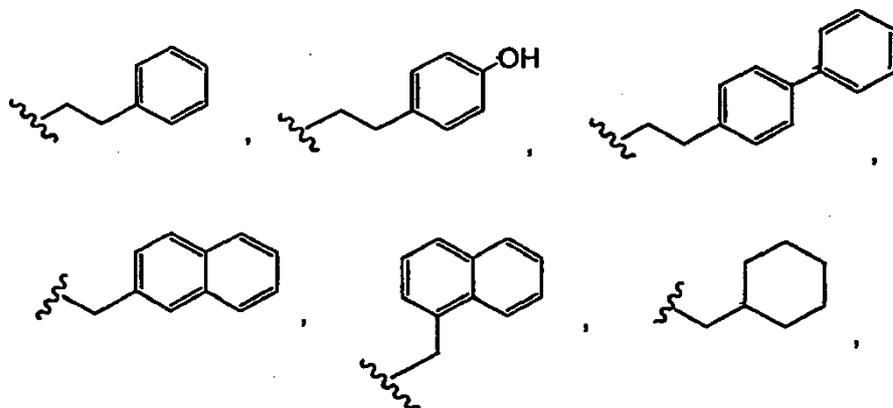
UNIDAD DE AMINOÁCIDO

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

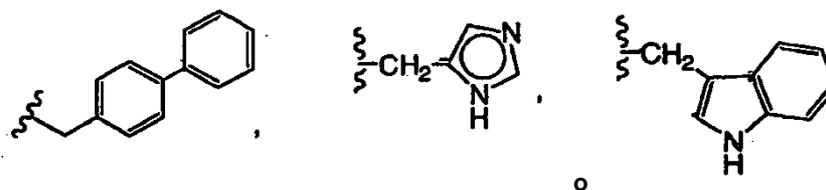
20 -Ww- es una unidad de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido. Los residuos de aminoácidos que comprenden la unidad de aminoácido incluyen aquellos que se producen naturalmente, además de aminoácidos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



25 en la que R<sup>19</sup> es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH<sub>2</sub>OH, -CH(OH)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>COOH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo,



35



5 La unidad de aminoácido puede escindirse enzimáticamente por una o más enzimas, que incluyen una proteasa asociada a tumor, para liberar el resto de fármaco (-D), que en una realización se protona in vivo tras la liberación para proporcionar un fármaco (D).

10 Pueden diseñarse unidades  $-W_w$  útiles y optimizarse en su selectividad para la escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor. En una realización, una unidad  $-W_w$  es aquella cuya escisión se cataliza por la cathepsina B, C y D, o una proteasa de plasmina.

Ejemplos de unidades de aminoácido  $-W_w$  incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Ejemplos de dipéptidos incluyen: valina-citulina (vc o val-cit), alaninafenilalanina (af o ala-phe). Ejemplos de tripéptidos incluyen: glicina-valina-citulina (gly-val-cit) y glicinaglicina-glicina (gly-gly-gly).

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

#### UNIDAD ESPACIADORA

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

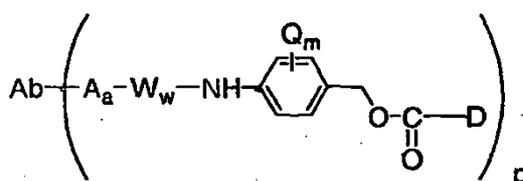
35 En otra realización,  $-Y_y$  es una unidad de p-aminobencilcarbamoilo (PAB) (véase Esquemas 2 y 3) cuya porción de fenileno está sustituida con  $Q_m$  en la que Q es -alquilo  $C_1-C_8$ , -O-(alquilo  $C_1-C_8$ ), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que oscila de 0-4.

40 Ejemplos de realizaciones de una unidad espaciadora no auto-inmolativa ( $-Y_y$ ) son: - Gly-Gly-; -Gly-; -Ala-Phe-; -Val-Cit-.

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

45 Como alternativa, un ADC que contiene una unidad espaciadora auto-inmolativa puede liberar -D. En una realización,

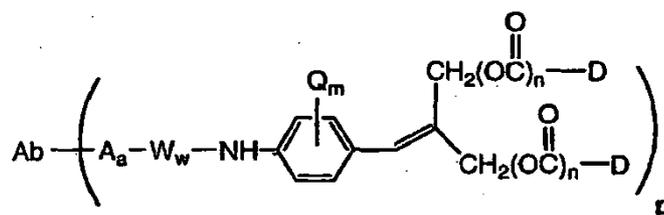
50  $-Y_y$  es un grupo PAB que está ligado a  $-W_w$  por el átomo de nitrógeno amino del grupo PAB, y conectado directamente con -D por un grupo carbonato, carbamato o éter, en el que el ADC tiene la estructura a modo de ejemplo



en la que Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que oscila de 0-4; y p oscila de 1 a 4.

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

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

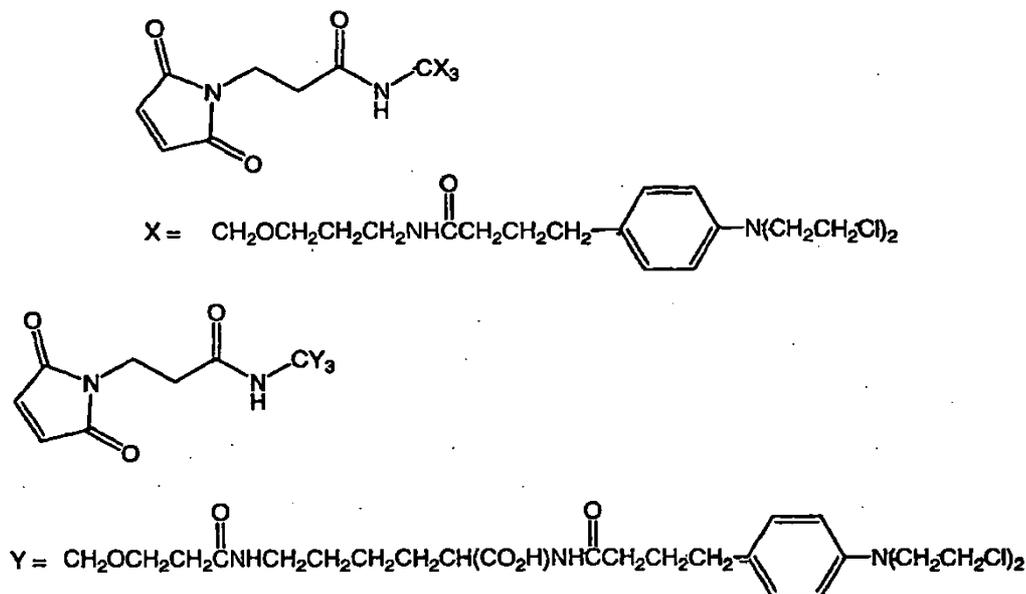


20 que comprende una unidad de dendrímero 2-(4-aminobenciliden)propan-1,3-diol (WO 2004/043493; de Groot et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494), en la que Q es alquilo -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-alquilo-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -halógeno, -nitro o ciano; m es un número entero que oscila de 0-4; n es 0 o 1 y p oscila de 1 a 4.

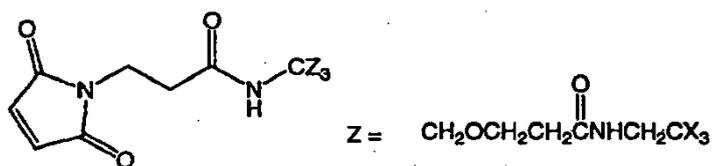
#### ENLAZADORES DENDRÍTICOS

25 En otra realización, el enlazador L puede ser un enlazador de tipo dendrítico para la unión covalente de más de un resto de fármaco mediante un resto de enlazador multifuncional de ramificación con un anticuerpo (Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistr y Letters 12: 2213-2215; Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistr y 11:1761-1768). Los enlazadores dendríticos pueden aumentar la relación molar entre fármaco y anticuerpo, es decir, la carga, que está relacionada con la potencia del ADC. Por tanto, si un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína lleva sólo un grupo tiol de la cisteína reactivo, una multitud de restos de fármaco pueden unirse mediante un enlazador dendrítico.

35 Los siguientes ejemplos de realizaciones de reactivos de enlazador dendrítico permiten conjugar hasta nueve reactivos de resto de fármaco nucleófilos por reacción con los grupos funcionales de la mostaza de nitrógeno cloroetil:

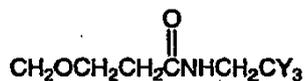


40



o

5



10

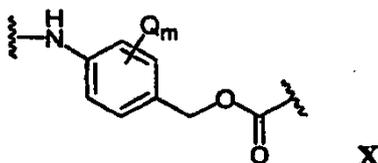
En otra realización de una unidad espaciadora, se pueden emplear como enlazadores en los compuestos de la invención enlazadores dendríticos ramificados con unidades de dendrímero 2,6-bis(hidroximetil)-p-cresol y 2,4,6-tris(hidroximetil)-fenol auto-inmolativos (WO 2004/01993; Szalai et al (2003) J. Amer. Chem. Soc. 125:15688-15689; Shamis et al (2004) J. Amer. Chem. Soc. 126:1726-1731; Amir et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499).

En otra realización, los restos D son los mismos.

15

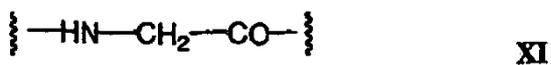
En otra realización más, los restos D son diferentes.

En un aspecto, las unidades espaciadoras (-Y<sub>y</sub>-) se representan por las Fórmulas (X)-(XII):

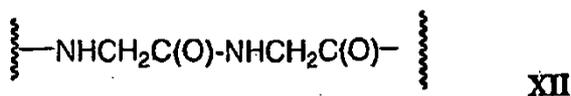


20

en la que Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano y m es un número entero que oscila de 0-4;

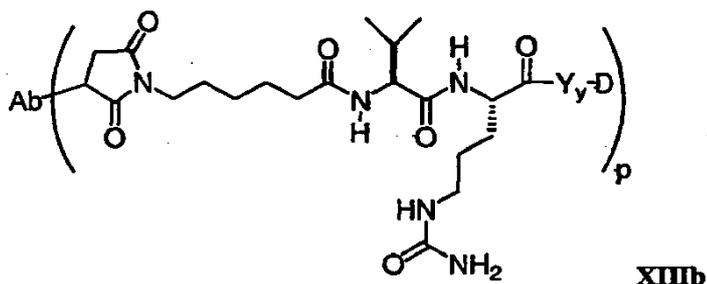
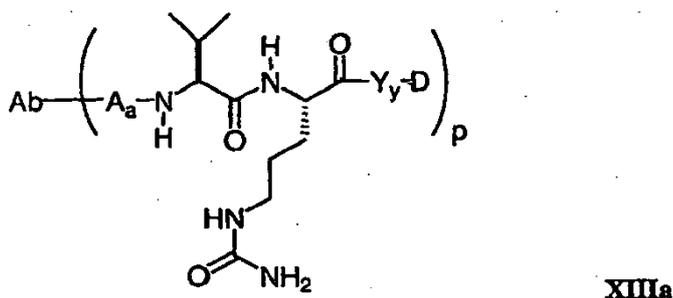


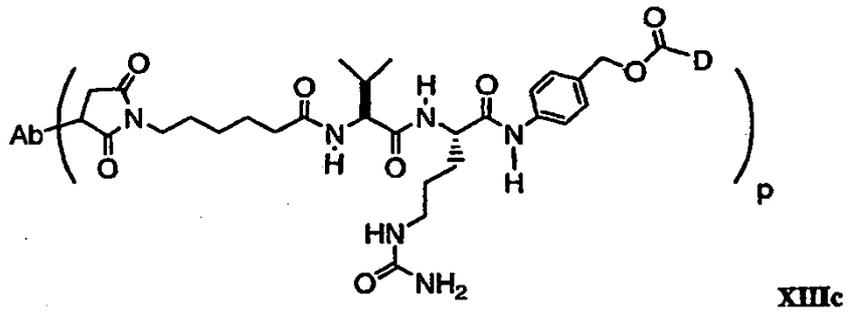
25



Realizaciones de los compuestos de conjugado anticuerpo-fármaco de Fórmula I incluyen XIIIa (val-cit), XIIIb (MC-val-cit), XIIIc (MC-val-cit-PAB):

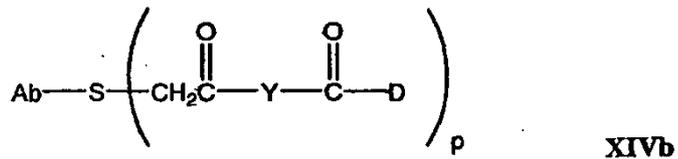
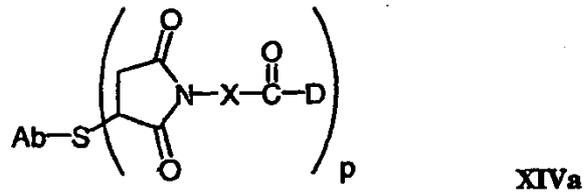
30



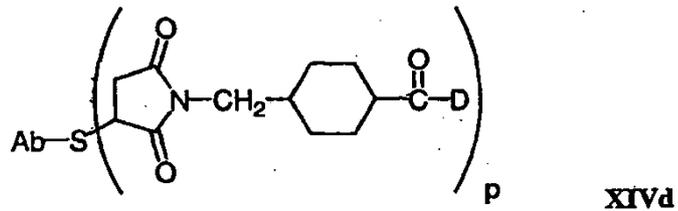
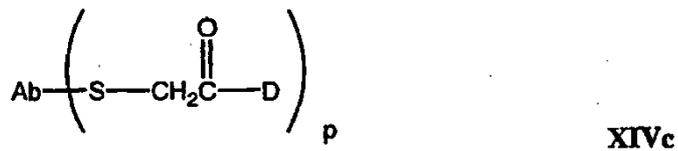


Ejemplos de otras realizaciones de compuestos de conjugado anticuerpo-fármaco de la Fórmula la incluyen XIVa-e:

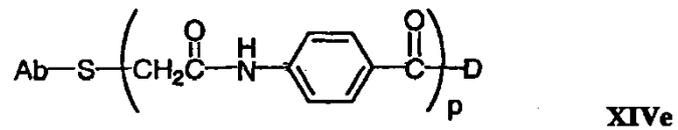
5



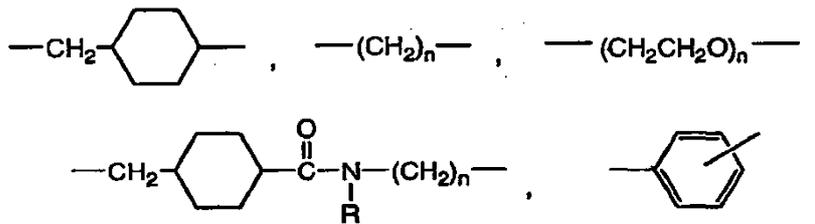
10



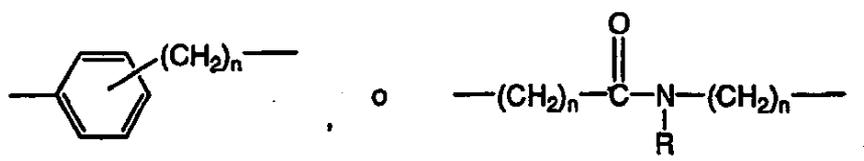
15



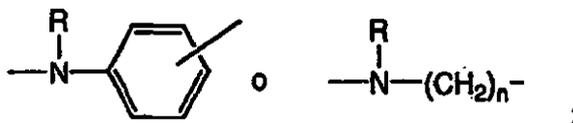
donde X es:



20



Y es:



5

y R es independientemente H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y n es 1 a 12.

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

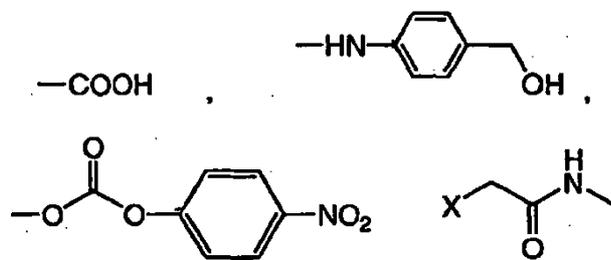
15

Normalmente, los enlazadores de tipo péptido pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptido. Tales enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, según el método de síntesis en fase líquida (E. Schröder y K. Lübke (1965) "The Peptides", volumen 1, pág. 76-136, Academic Press) que es muy conocido en el campo de la química de los péptidos.

20

Los productos intermedios de enlazador pueden ensamblarse con cualquier combinación o secuencia de reacciones que incluyen unidades de espaciador, estirador y de aminoácido. Las unidades de espaciador, estirador y de aminoácido pueden emplear grupos funcionales reactivos que son de naturaleza electrófila, nucleófila o de radicales libres. Grupos funcionales reactivos incluyen, pero no se limitan a

25



30

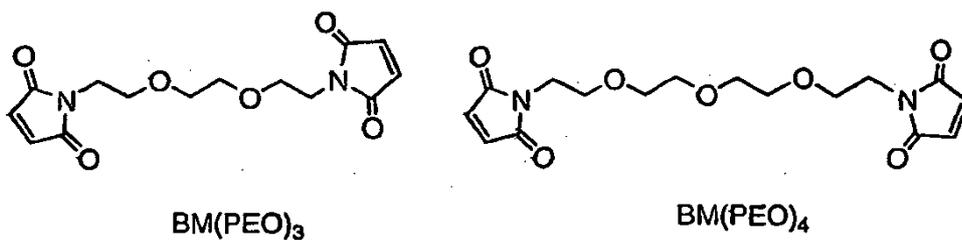
donde X es un grupo saliente, por ej., O-mesilo, O-tosilo, -Cl, -Br, -I o maleimida.

35 En otra realización, el enlazador puede estar sustituido con grupos que modulan la solubilidad o reactividad. Por ejemplo, un sustituyente cargado tal como sulfonato (-SO<sub>3</sub>) o amonio puede aumentar la solubilidad en agua del reactivo y facilitar la reacción de acoplamiento del reactivo de enlazador con el anticuerpo o el resto de fármaco, o facilitar la reacción de acoplamiento de Ab-L (producto intermedio de anticuerpo-enlazador) con D, o D-L (producto intermedio de fármaco-enlazador) con Ab, dependiendo de la ruta de síntesis empleada para preparar el ADC.

40

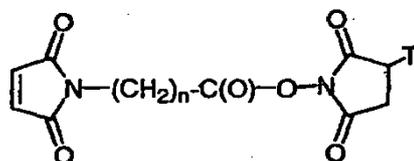
Los compuestos de la invención contemplan expresamente, pero no se limitan a, ADC preparado con reactivos enlazadores: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona) benzoato) y que incluye reactivos bis-maleimida: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, BM(PEO)<sub>3</sub> y BM(PEO)<sub>4</sub>, que están disponibles comercialmente de Pierce Biotechnology, Inc., Departamento de Servicio al Cliente, Apartado postal Box 117, Rockford, IL. 61105 U.S.A., U.S.A. 1-800-874-3723, Internacional + 815-968-0747. Ver páginas 467-498, 2003-2004 Manual de Aplicaciones y Catálogo. Los reactivos bis-maleimida permiten la unión del grupo tiol de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína a un resto de fármaco que contiene tiol, marcador o enlazador intermedio, de forma secuencial o concurrente. Otros grupos funcionales además de maleimida, que son reactivos con un grupo tiol de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína, resto de fármaco, marcador o enlazador intermedio incluyen yodoacetamida, bromoacetamida, vinil piridina, disulfuro, disulfuro de piridilo, isocianato e isotiocianato.

50

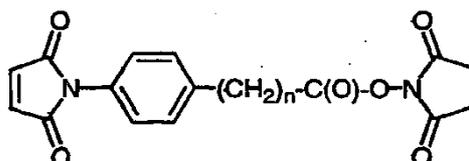


Reactivos enlazadores útiles también se pueden obtener a través de otras fuentes comerciales, tales como Molecular Biosciences Inc.(Boulder, CO), o sintetizarse de acuerdo con procedimientos descritos en Toki et al (2002) J. Org. Chem. 67: 1866-1872; Walker, M. A. (1995) J. Org. Chem. 60: 5352-5355;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

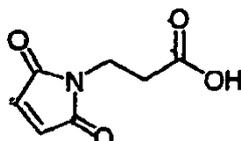
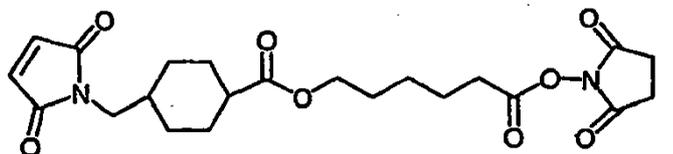
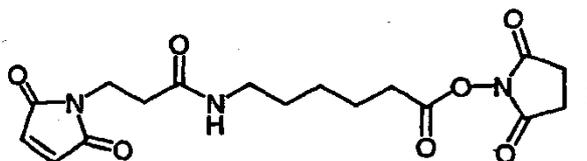
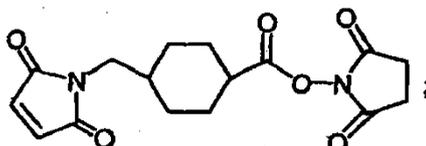
Se pueden introducir los estiradores de Fórmula (IIIa) en un enlazador por reacción de los siguientes reactivos enlazadores con el N terminal de una unidad de aminoácidos:



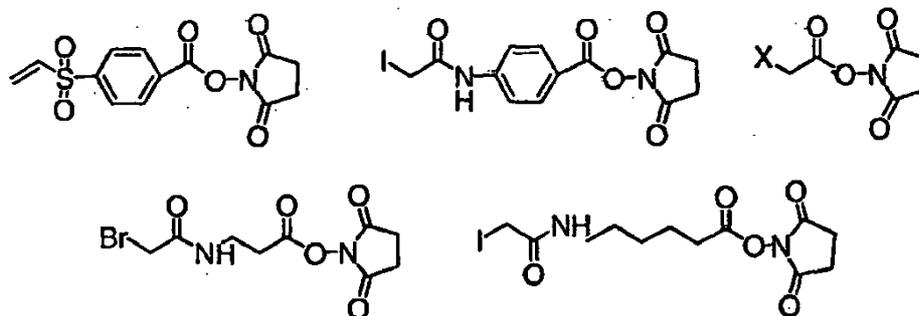
donde n es un número entero que oscila de 1 a 10 y T es -H o -SO<sub>3</sub>Na;



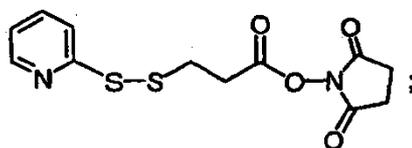
donde n es un número entero que oscila de 0 a 3;



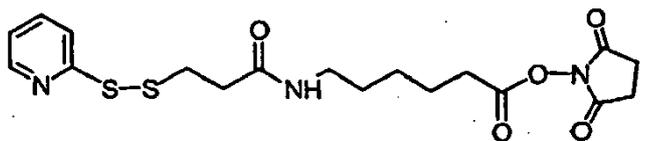
Se pueden introducir unidades de estirador en un enlazador por reacción de los siguientes reactivos bifuncionales con el N terminal de una unidad de aminoácido:



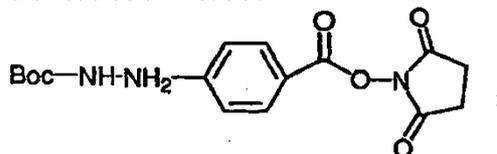
donde X es Br o I. Unidades estirador de fórmula también se pueden introducir en un enlazador por reacción de los siguientes reactivos bifuncionales con el N terminal de una unidad de aminoácidos:



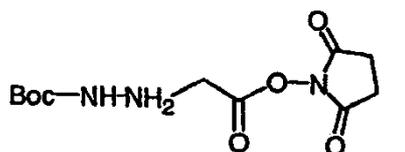
y



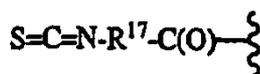
Se pueden introducir unidades de estirador de Fórmula (Va) en un enlazador por reacción de los siguientes intermedios con el N-terminal de una unidad de aminoácido:



y

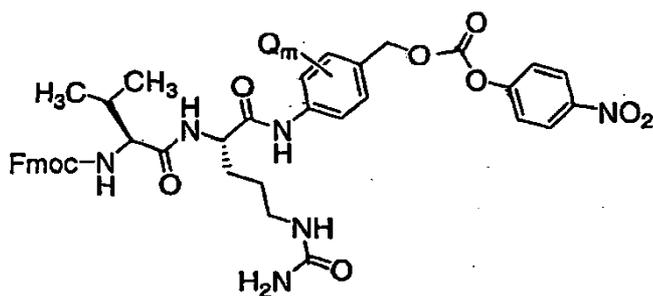


Los estiradores de isotiocianato de la fórmula mostrada a continuación pueden prepararse a partir de cloruros de ácido isotiocianatocarboxílico como se describe en Angew. Chem., (1975)87(14), 517.



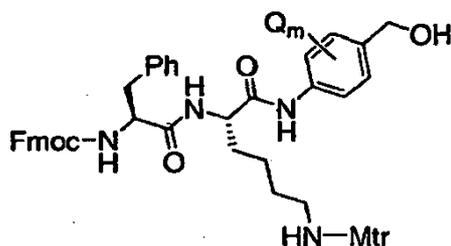
30 en la que -R<sup>17</sup>- es como se describe en la presente memoria.

Un ejemplo de enlazador dipeptídico valina-citrulina (val-cit o vc) que tiene un estirador maleimida y un espaciador para-aminobencilcarbamoilo (PAB) auto-inmolativo tiene la estructura:



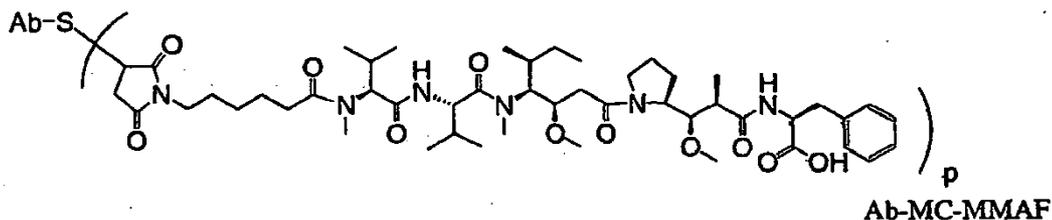
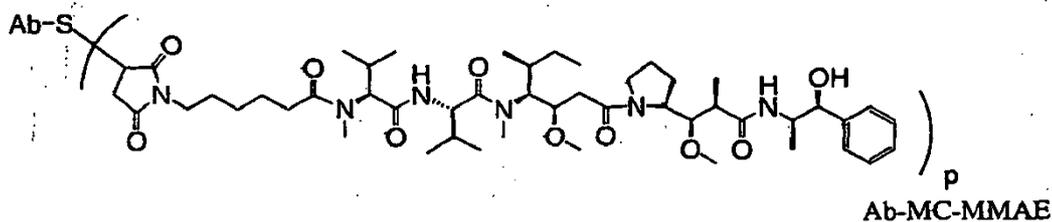
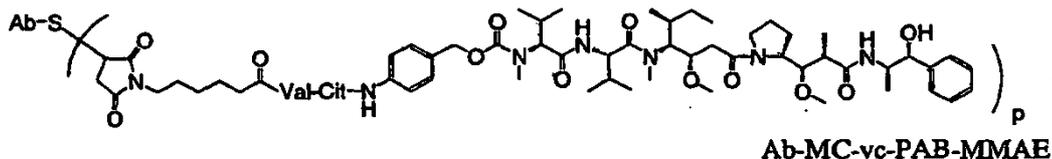
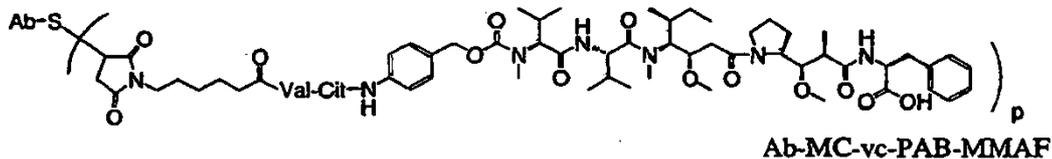
donde Q es alquilo -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, nitro o ciano y m es un número entero de 0-4.

- 5 Un ejemplo de un reactivo enlazador dipeptídico phe-lys(Mtr) que tiene una unidad estiradora y una unidad espaciador auto-inmolativa de p-aminobencilo se puede preparar de acuerdo con Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38: 5257-60, y tiene la estructura:



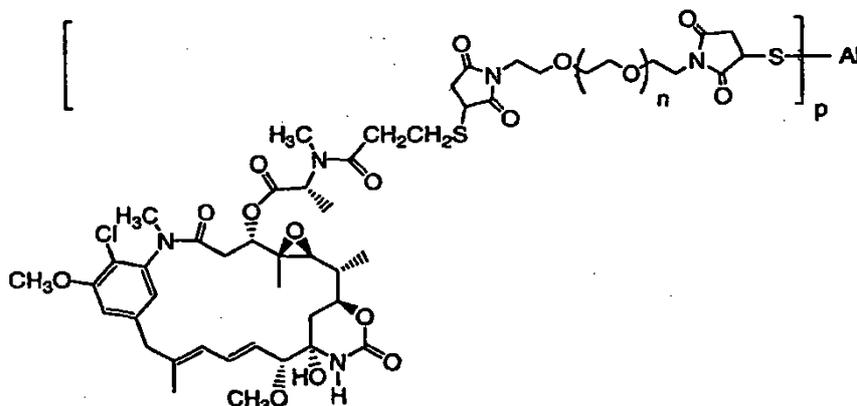
- 10 donde Mtr es mono-4-metoxitritilo, Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, nitro o ciano; y m es un número entero de 0-4.

15 Ejemplos de compuestos conjugados anticuerpo-fármaco de la invención incluyen:



- 20 donde Val es valina; Cit es citrulina; p es 1, 2, 3, o 4; y Ab es un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína. Otros ejemplos de conjugados anticuerpo-fármaco en los que el resto de fármaco maitansinoide DM1 está

unido a través de un enlazador BMPEO a un grupo tiol de trastuzumab tienen la estructura:



5 donde Ab es un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína; n es 0, 1, o 2; y p es 1,2,3 o 4.

#### PREPARACIÓN DE CONJUGADOS ANTICUERPO-FÁRMACO

10 El ADC de Fórmula I puede prepararse por varias rutas empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos para aquellos expertos en la materia, que incluyen: (1) reacción de un grupo cisteína de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con un reactivo de enlazador, para formar el producto intermedio de anticuerpo-enlazador Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de la reacción con un resto de fármaco D activado; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo de enlazador, para formar el producto intermedio de fármaco-enlazador D-L, mediante un enlace covalente, seguido de la reacción con un grupo cisteína de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína. Los procedimientos de conjugación (1) y (2) pueden emplearse con varios anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína, restos de fármaco y enlazadores para preparar los conjugados de anticuerpo-fármaco de Fórmula I.

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

30 La maitansina puede, por ejemplo, convertirse en May-SSCH<sub>3</sub>, que se puede reducir en el tiol libre, May-SH, y reaccionar con un anticuerpo modificado (Chari et al (1992) Cancer Research 52:127-131) para generar un inmunoconjugado maitansinoide-anticuerpo con un enlace disulfuro. Se han descrito conjugados anticuerpo-maitansinoide con enlaces disulfuro (documentos WO 04/016801; US 6884874; US 2004/039176 A1; WO 03/068144; US 2004/001838 A1; patentes US-6441163, US-5208020, US-5416064; WO 01/024763). El enlazador de disulfuro SPP se construye con el reactivo enlazador N-succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato.

35 En ciertas condiciones, los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos de enlazador mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (reactivo de Cleland, ditiotreitolo) o TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil) fosfina; Getz et al. (1999) Anal. Biochem. Vol 273: 73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA). Los anticuerpos monoclonales modificados por ingeniería genética con cisteína de longitud completa (TioMab) expresados en células CHO se reducen con aproximadamente un exceso de 50 veces de TCEP durante 3 h a 37 °C para reducir enlaces disulfuro que pueden formarse entre los residuos de cisteína recientemente introducidos y la cisteína presente en los medios de cultivo. El TioMab reducido se diluye y se carga sobre una columna HiTrap S en acetato sódico 10 mM, pH 5, y se eluye con PBS que contiene cloruro sódico 0,3 M. Los enlaces disulfuro se restablecieron entre residuos de cisteína presentes en el Mab parental con sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) acuoso diluido (200 nM) a temperatura ambiente, durante la noche. Pueden usarse otros oxidantes, es decir, agentes de oxidación, y condiciones de oxidación, que se conocen en la técnica. También es eficaz la oxidación con aire ambiente. Esta etapa de reoxidación parcial suave forma eficientemente disulfuros dentro de las cadenas con alta fidelidad. Un exceso de aproximadamente 10 veces de producto intermedio de fármaco-enlazador, por ejemplo, BM(PEO)<sub>4</sub>-DM1, se añadió, se mezcló y se dejó reposar durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente para efectuar la conjugación y formar el conjugado de anticuerpo (Tiomab)-fármaco. La mezcla de conjugación se filtró en gel y se cargó y se eluyó mediante una columna HiTrap S para eliminar el producto intermedio de fármaco-enlazador en exceso y otras impurezas.

La Figura 15 muestra el proceso general para preparar un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína expresado a partir de cultivo celular para la conjugación. Los aductos de cisteína, supuestamente junto con diversos enlaces disulfuro entre cadenas, se escinden reductoramente para dar una forma reducida del anticuerpo. Los enlaces disulfuro entre cadenas entre residuos de cisteína emparejados se vuelven a formar bajo condiciones de oxidación parcial, tal como exposición a oxígeno ambiental. Los residuos de cisteína recientemente introducidos, modificados por ingeniería genética y desemparejados siguen estando disponibles para la reacción con reactivos de enlazador o productos intermedios de fármaco-enlazador para formar los conjugados del anticuerpo de la invención. Los TioMab expresados en líneas celulares de mamífero producen aducto de Cis externamente conjugado con una Cis manipulada mediante la formación de enlaces -S-S-. De ahí que los TioMab purificados se traten con los procedimientos de reducción y reoxidación como se describen en el Ejemplo 11 para producir TioMab reactivos. Estos TioMab se usan para conjugarse con fármacos citotóxicos que contienen maleimida, fluoróforos y otras marcas.

Se prepararon varios conjugados de anticuerpo TioFab y TioMab-anticuerpo (Ejemplos 4-8) El mutante de cisteína hu4D5Fabv8 (V110C) se conjugó con el resto de fármaco maitansinoide DM1 con un reactivo enlazador bis-maleimido BMPEO para formar hu4D5Fabv8 (V110C) -BMPEO-DM1 (Ejemplo 8).

#### ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR IN VITRO

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

La potencia *in vitro* de los conjugados anticuerpo-fármaco se midió mediante un ensayo de proliferación celular (Figuras 10 y 11, Ejemplo 9). El ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® es un método de ensayo homogéneo disponible comercialmente (Promega Corp., Madison, WI), basado en la expresión recombinante de la luciferasa de *Coleoptera* (patentes US-5583024; US-5674713 y US-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 llevó a cabo en formato de 96 pocillos, por lo que es susceptible de cribado de alto rendimiento automatizado (HTS) (Cree et al Drogas (1995) AntiCancer 6: 398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica la adición de un único reactivo (CellTiter-Glo® Reactivo) directamente a las células cultivadas en medio suplementado con suero. No se requiere el lavado de células ni la eliminación de etapas de pipeteado medias y múltiples. El sistema detecta tan sólo 15 células/pocillo en un formato de 384 pocillos en 10 minutos después de la adición del reactivo y la mezcla. Las células pueden ser tratadas continuamente con ADC, o pueden ser tratadas y separadas con ADC. Generalmente, las células tratadas brevemente, es decir, 3 horas, mostraron los mismos efectos de potencia que las células tratadas de forma continua.

El formato "medida añadir-mezclar" homogéneo provoca la lisis celular y la generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. La cantidad de ATP es directamente proporcional al número de células presentes en el cultivo. El ensayo CellTiter-Glo® genera una señal luminiscente "tipo resplandor" producida por la reacción de la luciferasa, que tiene una semivida generalmente mayor de cinco horas, dependiendo del tipo de células y medio utilizados. Las células viables se reflejan en unidades relativas de luminiscencia (RLU). El sustrato, luciferina de escarabajo, se descarboxila oxidativamente por la luciferasa de luciérnaga recombinante con la conversión concomitante de ATP en AMP y la generación de fotones. La vida media prolongada elimina la necesidad de utilizar inyectores de reactivos y proporciona flexibilidad para el procesamiento de modo continuo o por lotes de placas múltiples. Este ensayo de proliferación celular se puede utilizar con varios formatos multipocillo, por ejemplo, formato de 96 o 384 pocillo. Los datos pueden ser registrados por luminómetro o un dispositivo de obtención de imágenes por cámara CCD. La salida de la luminiscencia se presenta como unidades relativas de luz (RLU), medidas en el tiempo. Como alternativa, los fotones de luminiscencia pueden ser contadas en un contador de centelleo en presencia de un agente de centelleo. Las unidades de luz se pueden representar entonces como CPS - recuentos por segundo.



Los efectos antiproliferativos de los conjugados anticuerpo-fármaco se midieron por la proliferación celular, el ensayo de destrucción celular *in vitro* anterior contra la línea celular de tumor de mama SK-BR-3 (Figuras 10 y 11). Los valores de CI<sub>50</sub> del ADC se establecieron contra las células SK-BR-3, que son conocidas por sobreexpresar la proteína del receptor HER2.

La Figura 10 muestra que trastuzumab-SMCC-DM1 ( $CI_{50} = 0,008-0,015 \mu\text{g/ml}$ ) era más potente que el conjugado de mutante de cisteína de la cadena pesada hu4D5Fabv8 - (A121C) -BMPEO-DM1 ( $\mu = 0,04\mu\text{g/ml}$ ). Ambos conjugados fueron significativamente más potentes en la destrucción de células que trastuzumab desnudo ( $CI_{50} = 0,1 \mu\text{g/ml}$ ). La carga de fármacos para el trastuzumab-SMCC-DM1 fue de 2,8 DM1/Ab y para hu4D5Fabv8 (A121C)-BMPEO-DM1 fue de 0,6 DM1/Ab.

La Figura 11 muestra que trastuzumab-SMCC-DM1 ( $CI_{50} = 0,008$  a  $0,015 \mu\text{g/ml}$ ) fue más potente que el mutante de cisteína de la cadena ligera hu4D5Fabv8 (V110C)-BMPEO-DM1 ( $CI_{50} = 0,07 \mu\text{g/ml}$ ). Ambos conjugados eran más potentes en la destrucción de células que el trastuzumab desnudo ( $CI_{50} = 0,1 \mu\text{g/ml}$ ). La carga de fármacos para el trastuzumab-SMCC-DM1 fue de 2,8 DM1/Ab y para hu4D5Fabv8 (V110C)-BMPEO-DM1 fue de 0,9 DM1/Ab.

Los conjugados de IgG TioMab de longitud completa se ensayaron para determinar *in vitro* la eficacia la proliferación celular y en comparación con los anticuerpos parentales. La Figura 20 muestra los resultados de un ensayo de células SK-BR-3 tratadas con: anticuerpo trastuzumab parental (HERCEPTIN®, Genentech, Inc.); trastuzumab-SMCC-DM1 con una carga de fármaco de aproximadamente 3,4 DM1/Ab y tio-trastuzumab (A121C)-BMPEO-DM1 con una carga de fármaco de aproximadamente 1,6 DM1/Ab. El conjugado trastuzumab-SMCC-DM1 está ligado al anticuerpo a través del enlazador éster NHS con amino reactivo SMCC, mientras que los conjugados tio-trastuzumab (A121C)-BMPEO-DM1 se unen mediante el enlazador maleimida BMPEO con tiol reactivo. Ambos conjugados eran potentes contra las células SK-BR-3 y mostraron una actividad comparable, mientras que trastuzumab no ejerció ningún efecto citotóxico. La Figura 21A muestra los resultados de un ensayo de células HT 1080EphB2 tratadas con: anti-EphB2R 2H9 parental y conjugado tio BMPEO-DM1 2H9 (A121C). La Figura 21B muestra los resultados de un ensayo de células BT 474 tratadas con: anti-EphB2R 2H9 parental y conjugado tio BMPEO-DM1 2H9 (A121C). El conjugado TioMab 2H9 contra las células HT 1080EphB2 y BT 474, era más potente que el conjugado de anticuerpo parental 2H9. El conjugado Tio-2H9-BMPEO-DM1 mostró actividad de destrucción celular funcional en la línea celular específica EphB2 (HT1080EphH2) en comparación con una línea celular no EphB2, BT474 en la que sólo se observa actividad marginal.

Los conjugados de anticuerpo-fármaco se compararon en el caso en el que el anticuerpo es un anticuerpo parental y en el caso en el que el anticuerpo es un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína. La Figura 22 muestra los resultados de un ensayo de células PC3/neo tratadas con: anti-MUC16-SMCC-DM1 3A5 y tio 3A5 (A121C) BMPEO-DM1. La Figura 23 muestra los resultados de un ensayo de células PC3/MUC16 tratadas con: 3A5 anti MUC16-SMCC-DM1 y tio 3A5 (A121C) BMPEO-DM1. La Figura 24 muestra los resultados de un ensayo de células OVCAR-3 tratados con: 3A5 anti MUC16-SMCC-DM1 y tio 3A5 (A121C) BMPEO-DM1. Tio-3A5-BMPEO-DM1 no mostró ninguna actividad significativa de destrucción celular en la línea celular PC3/neo de control, aunque mostró una actividad comparable a 3A5-SMCC-DM1 en la línea celular PC3/MUC16. El conjugado Tio-3A5-DM1 también mostró actividad en el OVCAR-3 que expresa antígeno MUC16 endógeno.

#### EFICACIA IN VIVO

La eficacia *in vivo* de dos conjugados péptido de unión a albúmina-DM1 DM1 (maitansinoide)-anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención se midió con un modelo en ratón de explante transgénico de alta expresión de HER2 (Figura 12, Ejemplo 10). Se propagó un aloinjerto del ratón transgénico Fo5 mmtv que no responde a, o responde mal a, la terapia con HERCEPTIN®. Los sujetos fueron tratados una vez con ABP-rhuFab4D5-cis (cadena ligera)-DM1; ABP-rhuFab4D5 (cadena pesada)-DM1 y el control de tampón de PBS placebo (vehículo) y se controlaron durante más de 3 semanas para medir el tiempo de duplicación del tumor, el log de muerte celular y la reducción del tumor.

Muestra	Dosis	Ti	PR	CR	TDV (días)
Vehículo (tampón PBS)		7/7	0/7	0/7	3
ABP-rhuFab4D5-V110C (cadena ligera)-DM1 (0,9 DM1/Ab)	25 mg por kg (1012 $\mu\text{g/m}^2$ de DM1)	7/7	7/7	0/7	14
ABP-rhuFab4D5-A121C(cadena pesada)-DM1 (0,6 DM1/Ab)	37,5 mg por kg (1012 $\mu\text{g/m}^2$ de DM1)	7/7	4/7	0/7	16

El término Ti es el número de animales en el grupo de estudio con tumor en  $T = 0$  + total de animales en el grupo.

El término PR es el número de animales que alcanzan la remisión parcial del tumor + animales con tumor en el momento  $T = 0$  en el grupo. El término CR es el número de animales que alcanzan la remisión completa del tumor + animales con tumor a  $T = 0$  en el grupo. El término TDV es el tiempo de duplicación del tumor, es decir, el tiempo en días para que el volumen del tumor del control se duplique.

Los siete ratones tratados con 25 mg por kg (1,012  $\mu\text{g/m}^2$  de DM1) de ABP-rhuFab4D5-cis (cadena ligera)-DM1 eran todos positivos para el tumor y un animal mostró remisión parcial después de 20 días. Los siete ratones tratados con 37,5 mg por kg (1,012  $\mu\text{g/m}^2$  de DM1) de ABP-rhuFab4D5-cis (cadena pesada)-DM1 eran todas positivos para el tumor y cuatro animales mostraron remisión parcial después de 20 días.

La variante de anticuerpo IgG TioMab de longitud completa con la mutación de cisteína A121C y conjugada con el enlazador BMPEO y el resto de fármaco DM1 fue probado frente al conjugado trastuzumab-SMCC-DM1 parental en ratones portadores del tumor MMTV-HER2 Fo5. El tamaño del tumor en el día 0 de la inyección fue de aproximadamente 100-200 mm de tamaño. La figura 25 muestra el cambio de volumen medio del tumor de más de 21 días en ratones desnudos atímicos con aloinjertos de tumor mamario MMTV-HER2 Fo5, después de una sola dosis en el Día 0 con: Vehículo (tampón); trastuzumab-SMCC-DM1 10 mg/kg; tio trastuzumab (A121C)-SMCC-DM1 21 mg/kg y tio trastuzumab (A121C) -SMCC-DM1 10 mg/kg.

Muestra	Dosis	Ti	PR	CR
Vehículo (tampón PBS)		10/10	0/10	0/10
trastuzumab-SMCC-DM1 3,4 DM1/Ab	10 mg Ab por kg de ratón (490 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de DM1)	10/10	7/10	0/10
tio-trastuzumab (A121C)-BMPEO-DM1 1,6 DM1/Ab	21 mg Ab por kg de ratón (496 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de DM1)	8/10	6/10	4/10
tio-trastuzumab (A121C)-BMPEO-DM1 1,6 DM1/Ab	10 mg Ab por kg de ratón (236 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de DM1)	10/10	0/10	0/10

Puede verse en la figura 25 que cada conjugado ejerce un efecto significativo de retraso del crecimiento del tumor en relación con placebo (vehículo). Cada uno de los diez ratones en los cuatro grupos anteriores recibió una sola inyección en el día 1. El conjugado trastuzumab-SMCC-DM1 parental se cargó con más del doble (3,4 DM1/Ab) el número de restos de fármaco que el conjugado modificado por ingeniería genética con cisteína tio-trastuzumab (A121C)-BMPEO-DM1 (1,6 DM1/Ab). La cantidad eficaz de DM1 era por lo tanto aproximadamente igual entre trastuzumab-SMCC-DM1 parental y tio-trastuzumab (A121C)-BMPEO-DM1 (21 mg Ab) de dosis más alta. Estas dos muestras mostraron la mayor potencia. Catorce días después de la inyección, la mayoría de los animales que recibieron estos conjugados estaban en remisión parcial o completa. La menor eficacia de la muestra de tio-trastuzumab (A121C)-BMPEO-DM1 de dosis inferior confirmó una respuesta relacionada con la dosis de DM1. Tio-Trastuzumab-DM1 se dosificó en una cantidad de anticuerpo equivalente (10 mg/kg) o de fármaco DM1 (21 mg/kg) a la del conjugado trastuzumab-SMCC-DM1 de control. Como se ve en la Figura 25, Tio-BMPEO-DM1 (21 mg/kg) mostró ligeramente mejor respuesta que el del grupo de trastuzumab-SMCC-DM1, ya que algunos de los animales mostraron una respuesta completa con TioMab-DM1 mientras que sólo había respuesta parcial con trastuzumab-SMCC-DM1.

#### ADMINISTRACIÓN DE CONJUGADOS ANTICUERPO-FÁRMACO

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

#### FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Las formulaciones farmacéuticas de los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) terapéuticos de la invención se preparan normalmente para administración parenteral, es decir, bolo, inyección intravenosa, intratumoral, con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable y en unidad de administración de forma inyectable. Un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que tiene el grado de pureza deseado se mezcla opcionalmente con diluyentes, vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980), en forma de soluciones acuosas o liofilizadas u otras formulaciones acuosas.

Los diluyentes, vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio) ; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONIC™ o polietilenglicol (PEG). Por ejemplo, formulaciones anti-ErbB2 liofilizadas se describen en el documento WO 97/04801.

Los principios activos también pueden estar atrapados en una microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsula de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en

macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

5 Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el ADC, cuyas matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsula. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente US-3773919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de gamma-etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

15 Las formulaciones que van a usarse para la administración in vivo son generalmente estériles, las cuales se realizan fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

20 Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para las vías de administración anteriores. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Las técnicas y formulaciones en general se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA). Tales métodos incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo al vehículo que constituye uno o más componentes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo uniforme e íntimamente en asociación el principio activo a vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto.

25 Las suspensiones acuosas de la invención contienen los materiales activos en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, croscarmelosa, povidona, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma de acacia y agentes dispersantes o humectantes tales como un fosfátido de origen natural (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitán). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes tales como p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

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

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

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

60 Aunque la administración oral de proteínas terapéuticas está desfavorecida debido a la hidrólisis o la desnaturalización en el intestino, las formulaciones de ADC adecuadas para la administración oral se pueden preparar como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del ADC.

65 Las formulaciones se pueden envasar en envases de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea se preparan a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo

descrito previamente. Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis diaria o unidad de subdosis diaria, como se ha indicado anteriormente, o una fracción apropiada de la misma, del principio activo.

- 5 La invención proporciona además composiciones veterinarias que comprenden al menos un principio activo como se ha definido anteriormente junto con un vehículo veterinario para el mismo. Los vehículos veterinarios son materiales útiles para el propósito de administrar la composición y pueden ser materiales sólidos, líquidos o gaseosos que son de otro modo inertes o aceptables en la técnica veterinaria y son compatibles con el principio activo. Estas composiciones veterinarias se pueden administrar por vía parenteral, por vía oral o por cualquier otra vía deseada.

10

#### TRATAMIENTOS CONJUGADO ANTICUERPO-FÁRMACO

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

15

20

Los compuestos de ADC que se identifican en los modelos animales y ensayos basados en células pueden probarse adicionalmente en primates superiores que tienen un tumor y ensayos clínicos humanos. Los ensayos clínicos humanos pueden diseñarse para probar la eficacia del anticuerpo monoclonal anti-HER2 HERCEPTIN® en pacientes con cánceres de mama metastásico que sobreexpresan HER2 que han recibido terapia anticancerosa anterior extensa como se describe por Baselga et al. (1996) J. Clin. Oncol. 14:737-744. El ensayo clínico puede diseñarse para evaluar la eficacia de un AND en las combinaciones con regímenes terapéuticos conocidos, tal como radioterapia y/o quimioterapia que implican agentes quimioterapéuticos y/o citotóxicos.

25

En general, la enfermedad o trastorno a tratar es una enfermedad proliferativa, tal como el cáncer. Ejemplos de cáncer a tratar incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de las vías urinarias, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, además de cabeza y cuello.

30

35

El cáncer puede comprender células que expresan HER-2, de forma que el ADC de la presente invención puede unirse a las células cancerosas. Para determinar la expresión de ErbB2 en el cáncer están disponibles diversos ensayos de diagnóstico/pronóstico. En una realización, la sobreexpresión de ErbB2 puede analizarse por IHC, por ejemplo, usando el HERCEPTEST (Dako). Los cortes de tejido incluidos en parafina de una biopsia de tumor pueden someterse al ensayo de IHC y examinarse los criterios de la intensidad de tinción de la proteína ErbB2 como sigue: Puntuación 0, no se observa tinción o la tinción de la membrana se observa en menos del 10 % de las células tumorales; Puntuación 1+, se detecta una tinción de membrana débil/apenas perceptible en más del 10 % de las células tumorales, las células sólo se tiñen en parte de su membrana; Puntuación 2+, se observa una tinción débil a moderada completa de la membrana en más del 10 % de las células tumorales; Puntuación 3+, se observa una tinción moderada a fuerte de la membrana completa en más del 10 % de las células tumorales. Esos tumores con puntuaciones 0 o 1+ para la evaluación de la sobreexpresión de ErbB2 pueden caracterizarse como que no sobreexpresan ErbB2, mientras que aquellos tumores con puntuaciones de 2+ o 3+ pueden caracterizarse como que sobreexpresan ErbB2.

40

45

50

Como alternativa, o adicionalmente, pueden llevarse a cabo ensayos FISH tales como INFORM™ (Ventana Co, Ariz.) o PATHVISION™ (Vysis, Ill.) en el tejido tumoral incluido en parafina y fijado en formalina para determinar el grado (dado el caso) de sobreexpresión de ErbB2 en el tumor.

55

Las enfermedades autoinmunitarias para las que pueden ser utilizados los compuestos de ADC en el tratamiento incluyen trastornos reumatológicos (tales como, por ejemplo, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerodermia, lupus tal como LES y nefritis lúpica, polimiositis/ dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpos anti-fosfolípido, y artritis psoriásica), artrosis, trastornos gastrointestinales y hepáticos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), gastritis autoinmunitaria y anemia perniciosa, hepatitis autoinmunitaria, 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 poliarteriitis), trastornos neurológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple, opsoclonus mioclonos, miastenia grave, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y polineuropatías autoinmunitarias), trastornos renales

60

65

(como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture y la enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, psoriasis, urticaria, habones, pénfigo vulgaris, penfigoide bulloso y lupus eritematoso cutáneo), alteraciones hematológicas (tales como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura postransfusional y anemia hemolítica autoinmunitaria), aterosclerosis, uveítis, enfermedades de la audición autoinmunitarias (tales como, por ejemplo, enfermedad del oído interno y pérdida de audición), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órganos, y trastornos endocrinos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias relacionadas con la diabetes tales como la diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), enfermedad de Addison, y enfermedad tiroidea autoinmunitaria (por ejemplo, enfermedad de Graves y tiroiditis)). De estas enfermedades, las más preferidas incluyen, por ejemplo, la 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 enfermedad, la dosificación apropiada de un ADC dependerá del tipo de enfermedad que vaya a tratarse, como se define anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si la molécula se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico. La molécula se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0, 1-20 mg/kg) de molécula es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, tanto si es, por ejemplo, por una o por más administraciones separadas como por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Un ejemplo de dosificación de ADC que va a administrarse a un paciente está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso del paciente.

Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento es sostenido hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo de pauta de dosificación comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg de un anticuerpo anti-ErbB2. Pueden ser útiles otras pautas posológicas. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

#### TERAPIA DE COMBINACIÓN

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

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

Pueden combinarse otras pautas terapéuticas con la administración de un agente anticancerígeno identificado según la presente invención. La terapia de combinación puede administrarse como una pauta simultánea o secuencial. Si se administra secuencialmente, la combinación puede administrarse en dos o más administraciones. La administración combinada incluye coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica y administración consecutiva en cualquier orden, en el que preferentemente hay un periodo de tiempo mientras que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

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

El ADC se puede combinar con un compuesto anti-hormonal; por ejemplo, un compuesto anti-estrógeno como el tamoxifeno; una anti-progesterona, tal como onapristona (documento EP 616812) o un anti-andrógeno, tal como flutamida, en dosis conocidas para tales moléculas. Cuando el cáncer a tratar es un cáncer independiente de hormonas, el paciente puede haber sido previamente sometido a terapia anti-hormonal y, después de que el cáncer se convierte en hormono independiente, el ADC (y opcionalmente otros agentes como se describe en la presente memoria) se pueden administrar al paciente. Puede ser beneficioso coadministrar también un cardioprotector (para prevenir o reducir la disfunción miocárdica asociada a la terapia) o una o más citocinas al paciente. Además de los

regímenes terapéuticos anteriores, el paciente puede someterse a extirpación quirúrgica de las células cancerosas y/o radioterapia.

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

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

#### METABOLITOS DE LOS CONJUGADOS ANTICUERPO-FÁRMACO

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

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

#### MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE IMÁGENES DE ANTICUERPOS MARCADOS

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

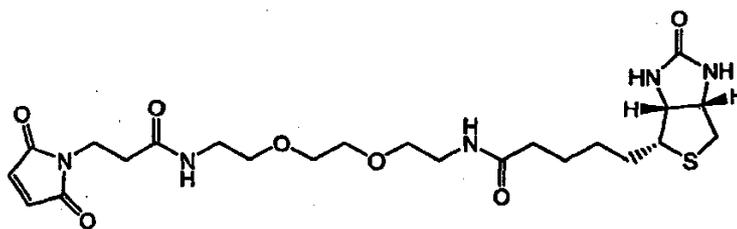
#### ARTÍCULOS MANUFACTURADOS

50 En otra realización se proporciona un artículo manufacturado o "kit", que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo manufacturado comprende un envase y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al recipiente. Envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, envase blíster, etc. Los envases pueden formarse a partir de varios materiales tales como vidrio o plástico. El envase 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 envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un ADC. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección, tal como cáncer. Como alternativa o adicionalmente, el artículo manufacturado puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Adicionalmente puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 – Preparación de TioFab fago biotinilado

5 Se hizo reaccionar TioFab-fago ( $5 \times 10^{12}$  partículas de fago) con 150 veces en exceso de biotina-PEO-maleimida ((+)-biotinil-3-maleimidopropionamidil-3,6-dioxaoctainediamina, Oda et al (2001) Nature Biotechnology 19: 379-382, Pierce Biotechnology, Inc.) durante 3 horas a temperatura ambiente. El exceso de biotina-PEO-maleimida fue retirado del fago conjugado con biotina mediante precipitaciones de PEG repetidas (3-4 veces). Se pueden usar  
 10 otros reactivos de biotinilación comercialmente disponibles con grupos electrófilos que son reactivos con los grupos tiol de la cisteína, incluyendo biotina-BMCC, PEO-yodoacetil biotina, yodoacetil-LC-biotina y biotina-HPDP (Pierce Biotechnology, Inc.), y *N*<sup>ε</sup>-(3-maleimidopropionil)biotina (MPB, Molecular Probes, Eugene, OR). Otras fuentes comerciales para la biotinilación, reactivos enlazadores bifuncionales y multifuncionales incluyen Molecular Probes, Eugene, OR y Sigma, St. Louis, MO.



Biotina-PEO-maleimida

15

### Ejemplo 2 - Ensayo PHESELECTOR

20 La albúmina de suero bovino (BSA), el dominio extracelular de ErbB2 (HER2) y estreptavidina (100  $\mu$ l de 2  $\mu$ g/ml) se recubrieron por separado en placas de 96 pocillos Maxisorp. Después de bloquear con Tween-20 0,5 % (en PBS), se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente hu4D5Fabv8-TioFab-Fago ( $2 \times 10^{10}$  partículas de fago) biotinilado y no biotinilado seguido de incubación con anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (proteína de la cubierta del fago anti-M13, anticuerpo anti-proteína pVIII). La Figura 8 ilustra el Ensayo PHESELECTOR mediante una representación esquemática que representa la unión de Fab o TioFab a HER2  
 25 (arriba) y TioFab biotinilado a estreptavidina (abajo).

Se llevó a cabo la reacción con HRP estándar y la absorbancia se midió a 450 nm. La reactividad del tiol se midió mediante el cálculo de la relación entre la  $DO_{450}$  para estreptavidina/ $DO_{450}$  para HER2. Un valor de la reactividad del tiol de 1 indica biotinilación completa del tiol de la cisteína. En el caso de las mediciones de unión a proteínas Fab, se utilizó hu4D5Fabv8 (2-20 ng) seguido por incubación con anticuerpos anti-Fab policlonales de cabra marcados con HRP.  
 30

### Ejemplo 3a - Expresión y purificación de TioFabs

35 Los TioFabs se expresaron después de la inducción de 34B8, una cepa de *E. coli* no supresora (Baca et al (1997) Journal of Biological Chemistry 272 (16):10678-84). El sedimento celular cosechado se resuspendió en PBS (solución salina tamponada con fosfato), la lisis total de células se llevó a cabo mediante el paso a través de un microfluidizador y los TioFabs se purificaron por cromatografía de afinidad con proteína G SEPHAROSE™ (Amersham).  
 40

Los TioFabs L-V15C, L-V110C, H-A88C, y H-A121C se expresaron y se purificaron por cromatografía en columna de Proteína G-SEPHAROSE™. El Fab oligomérico estaba presente en las fracciones 26 a 30 y la mayoría de la forma monomérica estaba en las fracciones 31-34. Las fracciones que consisten en la forma monomérica se agruparon y se analizaron por SDS-PAGE junto con hu4D5Fabv8 and de tipo silvestres y se analizaron en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras (con DTT o BME) y no reductoras (sin TDT o BME). Las fracciones de filtración en gel de A121C-TioFab se analizaron en SDS-PAGE no reductora.  
 45

Los TioFabs se conjugaron con biotina-PEO-maleimida como se ha descrito anteriormente y los TioFab biotinilados se purificaron adicionalmente por cromatografía de filtración en gel Superdex-200™ (Amersham), que eliminó la biotina-PEO-maleimida libre y la fracción oligomérica de TioFabs. Se incubaron por separado hu4D5Fabv8 de tipo silvestre y hu4D5Fabv8 A121C-TioFab (en cantidad de 0,5 mg) y se incubaron por separado con un exceso de 100 veces molar de biotina-PEO-maleimida durante 3 horas a temperatura ambiente y se cargaron en una columna de filtración en gel Superdex-200 para separar la biotina libre así como los Fab oligoméricos de la forma monomérica.  
 50

55

Ejemplo 3b - Análisis de TioFabs

Los fragmentos de la digestión enzimática de TioFab hu4D5Fabv8 (A121C) biotinilado y hu4D5Fabv8 de tipo silvestre se analizaron mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas de ionización por electronebulización (LS-ESI-MS). La diferencia entre el la masa primaria 482.945 de hu4D5Fabv8 biotinilado (A121C) y la masa primaria 47.737,0 de hu4D5Fabv8 de tipo silvestre era 557,5 unidades de masa. Este fragmento indica la presencia de un único resto de biotina-PEO-maleimida (C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>). La Tabla 4 muestra la asignación de los valores de fragmentación que confirma la secuencia.

10 Tabla 4. Análisis LC-ESI-Espectrometría de masas de TioFab hu4D5Fabv8 A121C biotinilado después de la digestión con tripsina

Aminoácido	Fragmento b	Fragmento y
A (alanina)	72	
M (metionina)	203	2505
D (ácido aspártico)	318	2374
Y (tirosina)	481	2259
W (triptófano)	667	2096
G (glicina)	724	1910
Q (glutamina)	852	1853
G (glicina)	909	1725
T (treonina)	1010	1668
L (leucina)	1123	1567
V (valina)	1222	1454
T (treonina)	1323	1355
V (valina)	1422	1254
S (serina)	1509	1155
S (serina)	1596	1068
C (cisteína) + biotina	2242	981
S (serina)	2329	335
T (treonina)	2430	248
K (lisina)		175

15 Antes y después de filtración en gel Superdex-200, se llevaron a cabo análisis de gel SDS-PAGE, con y sin reducción por TDT o BME, de ABP- hu4D5Fabv8-A121C, ABP-hu4D5Fabv8-V110C biotinilado, ABP-hu4D5Fabv8-(V110C-A88C) doble cis biotinilado y ABP-hu4D5Fabv8-(V110C-A121C) doble cis biotinilado.

20 El análisis de espectroscopía de masas (MS/MS) de hu4D5Fabv8-(V110C)-BMPEO-DM1 (después de la purificación por filtración en gel Superdex-200): Fab+1 516 075, Fab 50515.5. Estos datos muestran 91,2 % de conjugación. Análisis de MS/MS de hu4D5Fabv8-(V110C)-BMPEO-DM1 (reducido): LC 23447,2, 24537,3 LC+1, HC (Fab) 27072,5. Estos datos muestran que todos los DM1 está en la cadena ligera del Fab.

Ejemplo 4 - Preparación de ABP-hu4D5Fabv8-(V110C)-MC-MMAE mediante la conjugación de ABP-hu4D5Fabv8-(V110C) y MC-MMAE

25 El reactivo enlazador del fármaco, maleimidocaproil-monometil auristatina E (MMAE), es decir MC-MMAE, disuelto en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua a una concentración conocida y se añade a TioFab ABP-hu4D5Fabv8-(V110C) refrigerado en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para detener la reacción e inactivar cualquier grupo tiol del anticuerpo sin reaccionar. La mezcla de reacción se concentra por ultrafiltración centrífuga y ABP-hu4D5Fabv8-(V110C)-MC-MMAE se purifica y 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.

Ejemplo 5 - Preparación de ABP-hu4D5Fabv8-(V110C)-MC-MMAF por conjugación de ABP-hu4D5Fabv8-(V110C) y MC-MMAF

35 ABP-hu4D5Fabv8-(V110C)-MC-MMAF se prepara por conjugación de Tio Fab ABP-hu4D5Fabv8-(V110C) y MC-MMAF siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

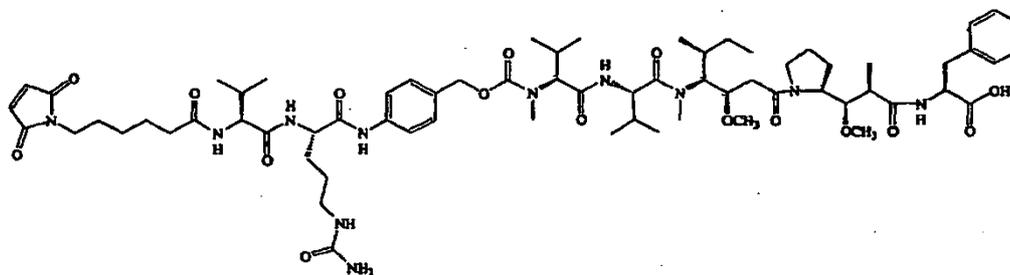
Ejemplo 6 - Preparación de ABP-A121C-TioFab-MC-val-cit-PAB-MMAE mediante la conjugación de ABP-A121C-TioFab y MC-val-cit-PAB-MMAE

40 ABP-hu4D5Fabv8-(A121C)-MC-val-cit-PAB-MMAE se prepara mediante la conjugación de ABP-hu4D5Fabv8-(A121C) y MC-val-cit-PAB-MMAE siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

45

Ejemplo 7 - Preparación de ABP-A121C-TioFab-MC-val-cit-PAB-MMAF por conjugación de ABP-A121C-TioFab y MC-val-cit-PAB-MMAF

5 ABP-hu4D5Fabv8-(A121C)-MC-val-cit-PAB-MMAF se prepara mediante la conjugación de ABP-hu4D5Fabv8-(A121C) y MC-val-cit-PAB-MMAF siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

**MC-val-cit-PAB-MMAF**Ejemplo 8 - Preparación de TioFab hu4D5Fabv8-(V110C)-BMPEO-DM1

10 La cisteína libre del TioFab hu4D5Fabv8-(V110C) se modificó mediante el reactivo bis-maleimido BM(PEO)4 (Pierce Chemical), dejando un grupo maleimido sin reaccionar en la superficie del anticuerpo. Esto se logró mediante la disolución de BM(PEO)4 en una mezcla de etanol 50 %/agua a una concentración de 10 mM y añadiendo un exceso molar de diez veces de BM(PEO)4 a una solución que contiene hu4D5Fabv8-(V110C) TioFab en solución salina tamponada con fosfato a una concentración de aproximadamente 1,6 mg/ml (10 micromolar) y permitiendo que reaccione durante 1 hora. El exceso de BM(PEO)4 se eliminó por filtración en gel (columna HiTrap, Pharmacia) en citrato 30 mM, pH 6 con tampón de NaCl 150 mM. Se añadió un exceso molar de aproximadamente 10 veces de DM1 disuelto en dimetilacetamida (DMA) al intermedio hu4D5Fabv8-(V110C) TioFab-BMPEO. También se puede emplear dimetilformamida (DMF) se puede emplear también para disolver el reactivo resto de fármaco. La mezcla de reacción se dejó reaccionar durante la noche antes de la filtración en gel o diálisis en PBS para eliminar el fármaco no reaccionado. La filtración en gel en columnas S200 en PBS se utilizó para eliminar los agregados de alto peso molecular y proporcionar hu4D5Fabv8-(V110C) TioFab-BMPEO-DM1 purificado.

25 Siguiendo el mismo protocolo, se preparó hu4D5Fabv8 (A121C) TioFab-BMPEO-DM1.

Ejemplo 9 - Ensayo de proliferación celular in vitro

30 La eficacia de los ADC se midió mediante un ensayo de proliferación celular que emplea el protocolo siguiente (Ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter Glo, Promega Corp. Boletín Técnico TB288; Mendoza et al (2002) Cancer Res. 62: 5485-5488):

1. Una alícuota de 100 µl de cultivo celular que contiene aproximadamente 10<sup>4</sup> células (SKBR-3, BT474, MCF7 o MDA-MB-468) en medio se depositó en cada pocillo de una placa de paredes opacas de 96 pocillos.
2. Se prepararon pocillos de control que contienen el medio y sin células.
3. Se añadió ADC a los pocillos experimentales y se incubó durante 3-5 días.
4. Las placas se equilibraron a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.
5. Se añadió un volumen de reactivo CellTiter-Glo igual al volumen del medio de cultivo celular presente en cada pocillo.
6. El contenido se mezcló durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular.
7. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia.
8. La luminiscencia se registró y se registró en los gráficos como RLU = unidades relativas de luminiscencia.

45 Determinadas células se siembran a razón de 1.000-2.000/pocillo (líneas PC3) o 2.000-3.000/pocillo (OVCAR-3) en una placa de 96 pocillos, 50 µl/ pocillo. Después de uno (PC3) o dos (OVCAR-3) días, se añaden ADC en volúmenes de 50 µl hasta una concentración final de 9.000, 3.000, 1.000, 333, 111, 37, 12,4, 4,1 o 1,4 ng/ml, donde los pocillos de control "sin ADC" sólo recibieron medio. Las condiciones son por duplicado o triplicado. Después de 3 (PC3) o 4-5 (OVCAR-3) días, se añaden 100 µl/pocillo de Cell TiterGlo II (ensayo basado en luciferasa; proliferación medida por los niveles de ATP) y los recuentos celulares se determinan usando un luminómetro. Los datos se representan como la media de la luminiscencia para cada conjunto de replicados, con barras del error de la desviación estándar. El protocolo es una modificación del Ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter Glo (Promega):

1. Sembrar 1.000 células/pocillo de PC3/MUC16, PC3/neo (en 50 µl/pocillo) de medios. Las células OVCAR3 deben colocarse en placas a razón de 2.000 células/pocillo (en 50 µl) de sus medios de comunicación (recetas a continuación). Permitir que las células se unan durante la noche.
2. El ADC se diluyó en serie 1:3 en los medios comenzando con una concentración de trabajo de 18 µg/ml (esto

da como resultado una concentración final de 9 µg/ml). Se añaden 50 µl de ADC diluido a los 50 µl de células y los medios ya existentes en el pocillo.

3. Incubar 72-96 horas (el patrón es de 72 horas, pero observar la concentración de 0 µg/ml para detener el ensayo cuando las células muestran una confluencia del 85 al 95 %).

4. Añadir 100 µl/pocillo de reactivo Promega Cell Titer Glo, agitar 3 min. y leer en los medios del luminómetro: PC3/neo y PC3/MUC16 cultivadas en 50/50/FBS 10 %/glutamina/250 µg/ml de G-3-4180VCAR cultivada en RFMI/FBS 20 %/glutamina.

#### Ejemplo 10 - Inhibición del crecimiento tumoral, eficacia in vivo en explantes de ratones transgénicos con niveles altos de expresión de HER2

Los animales adecuados para experimentos transgénicos se pueden obtener de fuentes comerciales estándar tales como Taconic (Germantown, N.Y.). Muchas razas son adecuadas, pero se prefieren los ratones hembra FVB debido a su mayor susceptibilidad a la formación de tumores. Se usaron machos FVB para el apareamiento y se utilizaron sementales CD.1 vasectomizados para estimular la pseudogestación. Los ratones vasectomizados se pueden obtener de cualquier proveedor comercial. Los fundadores fueron cruzados con ratones FVB o con ratones heterocigotos 129/BL6 x FVB p53. Los ratones con la heterocigosidad en alelo p53 se utilizaron para aumentar potencialmente la formación de tumores. Sin embargo, esto ha demostrado ser innecesario. Por lo tanto, algunos tumores F1 son de raza mixta. Los tumores fundadores son FVB solamente. Se obtuvieron seis fundadores con algunos tumores en desarrollo sin tener camadas.

Los animales que tienen tumores (aloinjerto propagado de ratones transgénicos Fo5 mmtv) fueron tratados con una dosis única o múltiple por inyección IV de ADC. El volumen del tumor se evaluó en diversos puntos temporales después de la inyección.

Los tumores surgen fácilmente en ratones transgénicos que expresan una forma mutacionalmente activada de neu, el homólogo en rata de HER2, pero HER2 que se sobreexpresa en los cánceres de mama humanos no está mutada y la formación de tumores es mucho menos robusta en los ratones transgénicos que en la HER2 no mutado sobreexpresada (Webster et al (1994) Semin. Cancer Biol 5: 69-76).

Para aumentar la formación de tumores con HER2 no mutada, los ratones transgénicos se produjeron usando un plásmido de ADNc de HER2 en el que se eliminó un ATG en dirección 3' con el fin de evitar la iniciación de la traducción en dichos codones ATG en dirección 3', lo que de otro modo reduciría la frecuencia de iniciación de la traducción del auténtico codón de iniciación en dirección 5' de HER2 (por ejemplo, véase Child et al (1999) J. Biol. Chem. 274:24335-24341). Además, se añadió un intrón quimérico al extremo 5', que también debería aumentar el nivel de expresión como se ha descrito anteriormente (Neuberger y Williams (1988) Nucleic Acids Res. 16: 6713; Buchman y Berg (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 4395; Brinster et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 836). El intrón quimérico se derivó de un vector Promega, vector de expresión de mamífero Pci-neo (pb 890-1022). El extremo 3' del ADNc está flanqueado por los exones 4 y 5 de la hormona del crecimiento humana y secuencias de poliadenilación. Además, se utilizaron ratones FVB porque esta raza es más susceptible al desarrollo de tumores. Se utilizó el promotor de MMTV-LTR para asegurar la expresión de HER2 específica de tejido en la glándula mamaria. Los animales fueron alimentados con la dieta AIN 76A con el fin de aumentar la susceptibilidad a la formación de tumores (Rao et al (1997) Breast Cancer Res. and Treatment 45:149-158).

#### Ejemplo 11 - Reducción/oxidación de TioMabs para la conjugación

Los anticuerpos monoclonales modificados por ingeniería genética con cisteína de longitud completa (TioMab) expresados en células CHO se redujeron con aproximadamente un exceso de 50 veces de TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil) fosfina; Getz et al (1999) Anal. Biochem Vol 273: 73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) durante 3 horas a 37 °C. El TioMab reducido (Figura 15) se diluyó 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. El TioMab eluido reducido se trató con sulfato de cobre acuoso (CuSO<sub>4</sub>) 200 nM a temperatura ambiente, durante la noche. La oxidación del aire ambiental también fue eficaz.

#### Ejemplo 12 - Conjugación de TioMabs

Los TioMabs reoxidados del Ejemplo 11, incluyendo tio-trastuzumab (A121C), tio-2H9 (A121C) y tio-3A5 (A121C), se combinaron con un exceso de 10 veces de intermedio de fármaco-enlazador, BM(PEO)<sub>4</sub>-DM1, se mezcló y se dejó reposar durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente para efectuar la conjugación y formar los conjugados anticuerpo TioMab-fármaco, incluyendo tio-trastuzumab (A121C)-BMPEO-DM1, tio-2H9 (A121C)-BMPEO-DM1 y tio-3A5 (A121C)-BMPEO-DM1. La mezcla de conjugación se filtró en gel o se cargó y se eluyó a través de una columna HiTrap S para eliminar el exceso de intermedio de fármaco-enlazador y otras impurezas.

La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas divulgadas en los ejemplos que se pretenden como ilustraciones de unos pocos aspectos de la invención y cualquier realización que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance de esta invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína, que comprende uno o más aminoácidos cisteína libres que tienen un valor de reactividad del tiol en el intervalo de 0,6 a 1,0 y una secuencia en la cadena pesada seleccionada de las SEQ ID NOS: 10, 11, 13, 14, 31, 34, 37, 38 y 42:

NSLRCEDTAV	(SEQ ID NO:10)
LVTVCSASTKGPS	(SEQ ID NO:11)
LVTVSSCSTKGPS	(SEQ ID NO:13)
LVTVSSACTKGPS	(SEQ ID NO:14)
HEDPEVKFNWYVDGCEVHNAKTKPR	(SEQ ID NO:31)
YKCKVCNKALP	(SEQ ID NO:34)
KGFYPCDIAVE	(SEQ ID NO:37)
PPVLDCDGSFF	(SEQ ID NO:38)
GQGTLVTVSACSTKGPSVFPL	(SEQ ID NO:42)

donde la cisteína en las SEQ ID NOS: 10, 11, 13, 14, 31, 34, 37, 38 y 42 es el aminoácido cisteína libre o una secuencia en la cadena ligera seleccionada de las SEQ ID NOS: 17, 19, 20, 21, 22, 24, 25 y 27:

SLSASCGDRV	(SEQ ID NO:17)
EIKRTCAAPSV	(SEQ ID NO:19)
TCAAPCVFIFPP	(SEQ ID NO:20)
FIFPPCDEQLK	(SEQ ID NO:21)
DEQLKCGTASV	(SEQ ID NO:22)
WKVDNCLQSGN	(SEQ ID NO:24)
ALQSGCSQESV	(SEQ ID NO:25)
GLSSPCTKSFN	(SEQ ID NO:27)

donde la cisteína en las SEQ ID NOS: 17, 19, 20, 21, 22, 24, 25 y 27 es el aminoácido cisteína libre; en donde el proceso comprende sustituir uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo parental con el residuo de aminoácido cisteína libre, donde el anticuerpo parental se une selectivamente a un antígeno y el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína se une selectivamente al mismo antígeno que el anticuerpo parental; y en donde el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína es un anticuerpo humano, quimérico o humanizado.

2. El proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína de la reivindicación 1 preparado mediante un proceso que comprende:

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

3. El proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína de la reivindicación 2, que comprende además:

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

4. El proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína de la reivindicación 3, en el que el reactivo de afinidad que reacciona con tiol comprende un resto biotina y un resto maleimida.

5. El proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína de la reivindicación 3, en el que el medio de captura comprende estreptavidina.

6. El proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo parental es una proteína de fusión que comprende el péptido de unión a albúmina (ABP) seleccionado de CDKTHHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF (SEQ ID NO: 1), QRLMEDICLPRWGCLWEDDF (SEQ ID NO: 2), QRLIEDICLPRWGCLWEDDF (SEQ ID NO: 3), RLIEDICLPRWGCLWEDD (SEQ ID NO: 4) y DICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 5).

7. El proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo parental se selecciona de un anticuerpo monoclonal, un

anticuerpo biespecífico y un fragmento de anticuerpo.

5 8. El proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína de la reivindicación 7, en el que el anticuerpo parental se selecciona de huMab4D5-8 (trastuzumab), un anticuerpo anti-EphB2R y un anticuerpo anti-MUC16.

9. El proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

10 SEQ ID NO:6:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY  
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRCEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS  
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
 QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK, o

15 SEQ ID NO:7:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY  
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS  
 CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
 QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK, o

20 SEQ ID NO:8:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQOKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS  
 RFGSRSRGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTCAAPSVFIFPP  
 SDEQLKSGTASVCLLNFPYFPAKQVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLT  
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC, o

25 SEQ ID NO:28:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMHWVRQAPGKGLEWVGFNPSTGYTDY  
 NQKFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRPRKIPRANVFWGQGLTVTVSS  
 CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
 QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK,

y SEQ ID NO:39:

DVQLQESGPGLVNPSQSLTCTVTGYSITNDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYINYSGYTTY  
 NPSLKRISITRDTSKNQFFLHLNSVTTEDTATYYCARWDGGLTYWGQGLTVTVSACSTK  
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  
 LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF  
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK.

30 10. El proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el anticuerpo parental es un anticuerpo intacto seleccionado de IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

35

11. El proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína de la reivindicación 10, en el que la IgG se selecciona de las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

12. El proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o 10-11, en el que el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína o el anticuerpo parental se unen a uno o más receptores (1)-(36):

- (1) BMPR1B (receptor de la proteína morfogenética ósea tipo IB);
- (2) E16 (LAT1, SLC7A5);
- (3) STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata);
- (4) 0772P (CA125, MUC16);
- (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina);
- (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIB, SLC34A2, familia de vehículos de soluto 34 (fosfato sódico), miembro 2, vehículo de fosfato dependiente de sodio tipo II 3b);
- (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y similar a tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B);
- (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, ADNc de RIKEN 2700050C12, ADNc de RIKEN gen 2700050C12);
- (9) ETBR (receptor de endotelina tipo B);
- (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315);
- (11) STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen asociado al cáncer de próstata 1, proteína asociada al cáncer de próstata 1, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata 2, proteína de la próstata de seis dominios transmembrana);
- (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico de potencial de 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);
- (15) CD79b (CD79B, CD79β, Igb (inmunoglobulina beta asociada), 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;
- (20) IL20Rα;
- (21) Brevican;
- (22) EphB2R;
- (23) ASLG659;
- (24) PSCA;
- (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, inmunoglobulina alfa asociada, una proteína específica de linfocitos B que interacciona covalentemente con la Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie con moléculas de IgM, transduce una señal implicada en la diferenciación de linfocitos B);
- (29) CXCR5 (receptor del linfoma de Burkitt 1, un receptor acoplado a la proteína G que se activa por la quimiocina CXCL13, interviene en la migración de linfocitos y en la defensa humoral, desempeña un papel en la infección por VIH-2 y quizás en el desarrollo del SIDA, linfoma, mieloma y leucemia);
- (30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula MHC de clase II (antígeno Ia) que une los péptidos y los presenta a los linfocitos T CD4+);
- (31) P2X5 (canal iónico activado por ligando del receptor purinérgico P2X 5, canal iónico activado por ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión sináptica y la neurogénesis, cuya deficiencia puede contribuir a la fisiopatología de la inestabilidad idiopática del detrusor);
- (32) CD72 (antígeno de diferenciación de linfocitos B CD72, Lyb-2);
- (33) LY64 (antígeno linfocitario 64 (RP105), proteína de membrana tipo I de la familia de proteínas con repeticiones ricas en leucina (LRR), regula la activación de linfocitos B y la apoptosis, la pérdida de función está asociada a una mayor actividad en pacientes con lupus eritematoso sistémico);
- (34) FcRH1 (proteína de tipo receptor Fc 1, un supuesto receptor del dominio Fc de inmunoglobulina que contiene los dominios similares a Ig tipo C2 e ITAM, puede tener un papel en la diferenciación de linfocitos B);
- (35) IRTA2 (receptor 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas asociado con la translocación, un supuesto inmunorreceptor con posibles papeles en el desarrollo de los linfocitos B y la linfomagénesis; en algunas neoplasias de linfocitos B se produce alteración de la desregulación del gen mediante translocación); y
- (36) TENB2 (supuesto proteoglicano transmembrana, relacionado con familia EGF/heredulina de los factores de crecimiento y folistatina).

13. El proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo está unido covalentemente a un marcador de captura, un marcador de detección o un soporte sólido.

5 14. El proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína de la reivindicación 13, en el que el anticuerpo está unido covalentemente a un marcador de detección que es un colorante fluorescente seleccionado de un tipo de fluoresceína, un tipo de rodamina, dansilo, Lissamina, una cianina, una ficoeritrina, rojo Texas y un análogo de los mismos.

10 15. El proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína de la reivindicación 13, en el que el anticuerpo está unido covalentemente a un marcador de detección radionúclido seleccionado de <sup>3</sup>H, <sup>11</sup>C, <sup>14</sup>C, <sup>18</sup>F, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>64</sup>Cu, <sup>68</sup>Ga, <sup>86</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>123</sup>I, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>133</sup>Xe, <sup>177</sup>Lu, <sup>211</sup>At y <sup>213</sup>Bi.

15 16. El proceso para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína de la reivindicación 13, en el que el anticuerpo está unido covalentemente a un marcador de detección mediante un ligando quelante seleccionado de DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA.

20 17. Un compuesto conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo (Ab) modificado por ingeniería genética con cisteína, que comprende un aminoácido cisteína libre que tiene un valor de reactividad del tiol en el intervalo de 0,6 a 1,0 y un resto de fármaco (D) seleccionado de un maitansinoide, una auristatina, una dolastatina y una caliqueamicina, en donde el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína está unido a través de uno o más aminoácidos de cisteína libres mediante un resto enlazador (L) a D; teniendo el compuesto la Fórmula I:



25 donde p es 1, 2, 3 o 4; y en donde el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína se prepara mediante un proceso que comprende sustituir uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo parental con el uno o más aminoácidos cisteína libres, donde el anticuerpo parental se une selectivamente a un antígeno y el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína se une selectivamente al mismo antígeno que el anticuerpo parental, en donde el compuesto conjugado anticuerpo-fármaco comprende:

30 una o más secuencias en la cadena pesada seleccionadas de las SEQ ID NOS: 10, 11, 13, 14, 31, 34, 37, 38 y 42:

NSLRCEDTAV	(SEQ ID NO: 10)
LVTVCASASTKGPS	(SEQ ID NO: 11)
LVTVSSCSTKGPS	(SEQ ID NO: 13)
LVTVSSACTKGPS	(SEQ ID NO: 14)
HEDPEVKFNWYVDGCEVHNAKTKPR	(SEQ ID NO: 31)
YKCKVCNKALP	(SEQ ID NO: 34)
KGFYPCDIAVE	(SEQ ID NO: 37)
PPVLDCDGSFF	(SEQ ID NO: 38)
GQGLTLVT/SACSTKGPSVFPL	(SEQ ID NO: 42)

35 donde la cisteína en las SEQ ID NOS: 10, 11, 13, 14, 31, 34, 37, 38 y 42 es el aminoácido cisteína libre; o una o más secuencias en la cadena ligera seleccionadas de las SEQ ID NOS: 17, 19, 20, 21, 22, 24, 25 y 27:

SLSASCGDRVT	(SEQ ID NO:17)
EIKRTCAAPSV	(SEQ ID NO:19)
TCAAPCVFIFPP	(SEQ ID NO:20)
FIFPPCDEQLK	(SEQ ID NO:21)
DEQLKCGTASV	(SEQ ID NO:22)
WKVDNCLQSGN	(SEQ ID NO:24)
ALQSGCSQESV	(SEQ ID NO:25)
GLSSPCTKSFN	(SEQ ID NO:27)

40 donde la cisteína en las SEQ ID NOS: 17, 19, 20, 21, 22, 24, 25 y 27 es el aminoácido cisteína libre, y en donde el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína es un anticuerpo humano, quimérico o humanizado.

18. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 17, en el que el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína se prepara mediante un proceso que comprende:

45 (a) sustituir uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo parental con cisteína y  
(b) determinar la reactividad del tiol del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína haciendo reaccionar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con un reactivo que reacciona con tiol;

en donde el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína es más reactivo que el anticuerpo parental

con el reactivo que reacciona con tiol.

- 5 19. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 17, que comprende además una secuencia de un péptido de unión a albúmina (ABP) seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.
20. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 17, en el que el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína se une a un receptor de ErbB seleccionado de EGFR, HER2, HER3 y HER4.
- 10 21. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 17, en el que el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína o el anticuerpo parental se une a uno o más de los receptores (1)-(36):
- (1) BMPR1B (receptor de la proteína morfogenética ósea tipo 1B);
- (2) E16 (LAT1, SLC7A5);
- 15 (3) STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata);
- (4) 0772P (CA125, MUC16);
- (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina);
- (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, familia de vehiculos de soluto 34 (fosfato sódico), miembro 2, vehículo de fosfato dependiente de sodio tipo II 3b);
- 20 (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y similar a tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B);
- (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, ADNc de RIKEN 2700050C12, ADNc de RIKEN gen 2700050C12);
- 25 (9) ETBR (receptor de endotelina tipo B);
- (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315);
- (11) STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen asociado al cáncer de próstata 1, proteína asociada al cáncer de próstata 1, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata 2, proteína de la próstata de seis dominios transmembrana);
- 30 (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico de potencial de 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);
- (15) CD79b (CD79B, CD79β, Igβ (inmunoglobulina beta asociada), B29);
- 35 (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a de anclaje de fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C);
- (17) HER2;
- (18) NCA;
- (19) MDP;
- 40 (20) IL20Rα;
- (21) Brevican;
- (22) EphB2R;
- (23) ASLG659;
- (24) PSCA;
- 45 (25) GEDA;
- (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, receptor BLYS 3);
- (27) CD22 (isoforma CD22-B del receptor de linfocitos B);
- (28) CD79a (CD79A, CD79α, inmunoglobulina alfa asociada, una proteína específica de linfocitos B que interacciona covalentemente con la Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie con moléculas de IgM, transduce una señal implicada en la diferenciación de linfocitos B);
- 50 (29) CXCR5 (receptor del linfoma de Burkitt 1, un receptor acoplado a la proteína G que se activa por la quimiocina CXCL13, interviene en la migración de linfocitos y en la defensa humoral, desempeña un papel en la infección por VIH-2 y quizás en el desarrollo del SIDA, linfoma, mieloma y leucemia);
- (30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula MHC de clase II (antígeno Ia) que une los péptidos y los presenta a los linfocitos T CD4+);
- 55 (31) P2X5 (canal iónico activado por ligando del receptor purinérgico P2X 5, canal iónico activado por ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión sináptica y la neurogénesis, cuya deficiencia puede contribuir a la fisiopatología de la inestabilidad idiopática del detrusor);
- (32) CD72 (antígeno de diferenciación de linfocitos B CD72, Lyb-2);
- 60 (33) LY64 (antígeno linfocitario 64 (RP105), proteína de membrana tipo I de la familia de proteínas con repeticiones ricas en leucina (LRR), regula la activación de linfocitos B y la apoptosis, la pérdida de función está asociada a una mayor actividad en pacientes con lupus eritematoso sistémico);
- (34) FcRH1 (proteína de tipo receptor Fc 1, un supuesto receptor del dominio Fc de inmunoglobulina que contiene los dominios ITAM y similares a Ig tipo C2, puede tener un papel en la diferenciación de linfocitos B);
- 65 (35) IRTA2 (receptor 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas asociado a la translocación, un supuesto inmunorreceptor con posibles papeles en el desarrollo de los linfocitos B y la linfomagénesis; en algunas

neoplasias de linfocitos B se produce alteración de la regulación del gen mediante translocación) y (36) TENB2 (supuesto proteoglicano transmembrana, relacionado con familia EGF/heredulina de los factores de crecimiento y folistatina).

5 22. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 17, en el que p es 1 o 2.

23. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 17, en el que L tiene la fórmula:



10 donde:

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

15 a es 0 o 1;

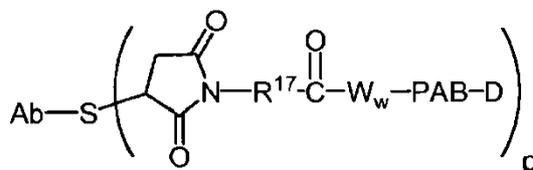
cada W es independientemente una unidad de aminoácido;

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

Y es una unidad espaciadora covalentemente unida al resto de fármaco e

20 y es 0, 1 o 2.

24. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 23 que tiene la fórmula:



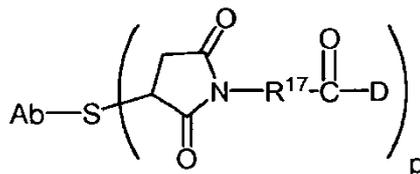
25 donde PAB es para-aminobencilcarbamoilo y R<sup>17</sup> es un radical divalente seleccionado de (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, carbociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, arileno, (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-arileno, -arileno-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-(carbociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), (carbociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-(heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), -(heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>- y -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>; donde R<sup>b</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo o bencilo; y r es independientemente un número entero que oscila de 1 a 10.

25. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 24, en el que W<sub>w</sub> es valina-citrulina.

26. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 24, en el que R<sup>17</sup> es (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> o (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>.

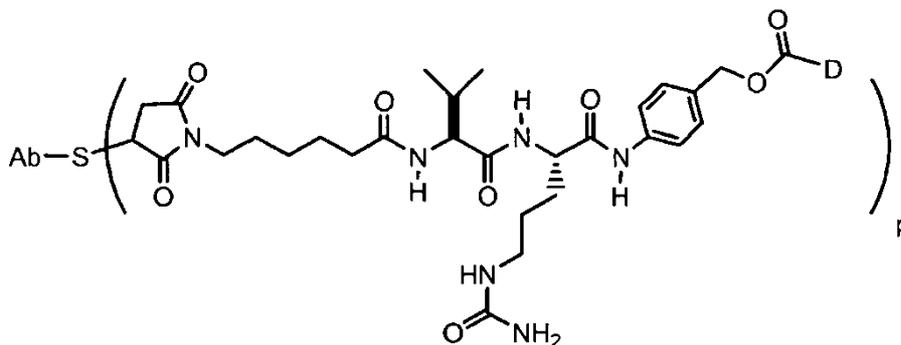
35

27. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 24 que tiene la fórmula:



40 28. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 27, en el que R<sup>17</sup> es (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> o (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>.

29. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 24 que tiene la fórmula:

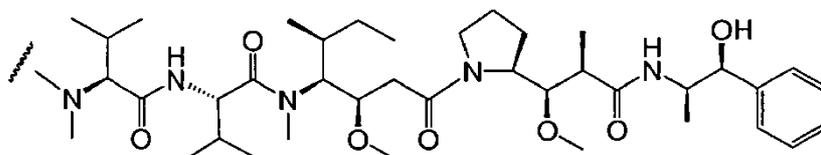


5 30. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 17, en el que L está formado por el reactivo enlazador SMCC o BMPEO.

10 31. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 17, en el que el resto de fármaco D se selecciona de un inhibidor de la microtubulina, un inhibidor de la mitosis, un inhibidor de la topoisomerasa y un intercalador de ADN.

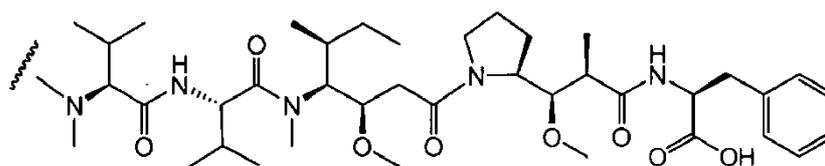
32. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 17, en el que el resto de fármaco D se selecciona de un maitansinoide, una auristatina, una dolastatina y una caliqueamicina.

15 33. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 17, en el que D es MMAE, que tiene la estructura:



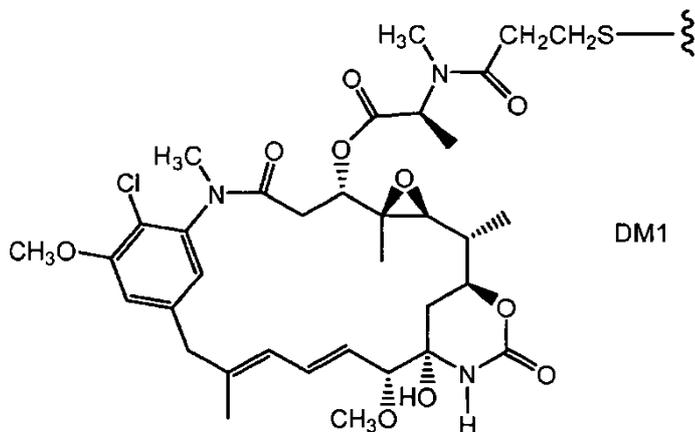
20 donde la línea ondulada indica el sitio de unión al enlazador L.

34. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 17, en el que D es MMAF, que tiene la estructura:

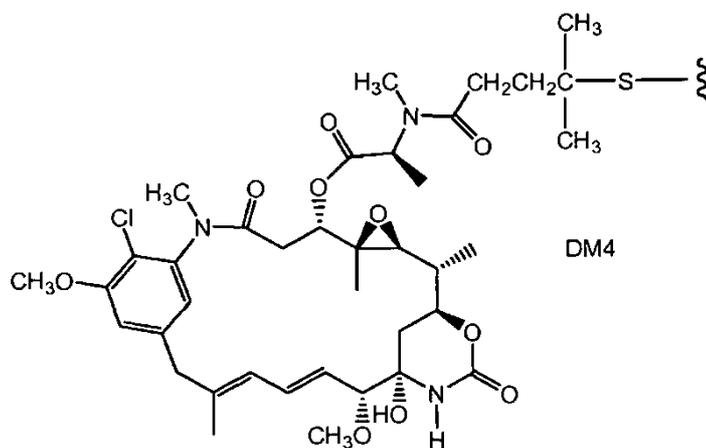


25 donde la línea ondulada indica el sitio de unión al enlazador L.

35. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 17, en el que D es DM1, que tiene la estructura:



5 o DM4, que tiene la estructura:



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

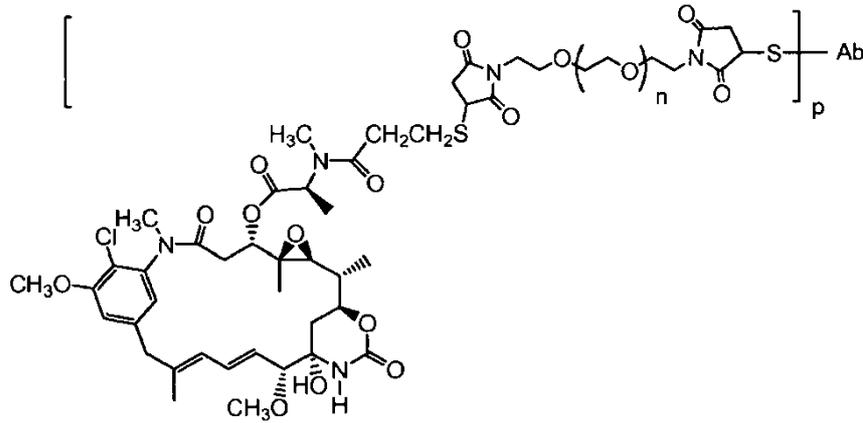
36. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 17, en el que el anticuerpo parental se selecciona de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico y un fragmento de anticuerpo.

37. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 17, en el que el anticuerpo parental se selecciona de huMAb4D5-8 (trastuzumab), un anticuerpo anti-ErbB2, un anticuerpo anti-EphB2R, un anticuerpo anti-CD22 y un anticuerpo anti-MUC16.

38. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 17, en el que el anticuerpo parental es un anticuerpo intacto seleccionado de IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

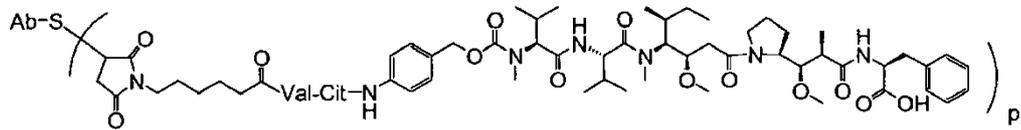
39. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 38, en el que la IgG se selecciona de las subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

40. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 17 que tiene la estructura:

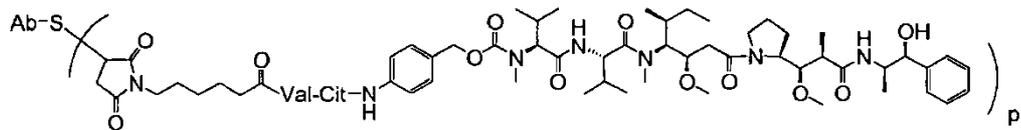


en la que n es 0, 1 o 2 y Ab es un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína.

5 41. El compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 17, seleccionado de las estructuras:

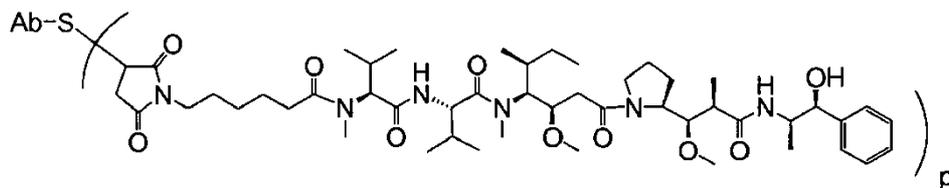


Ab-MC-vc-PAB-MMAF



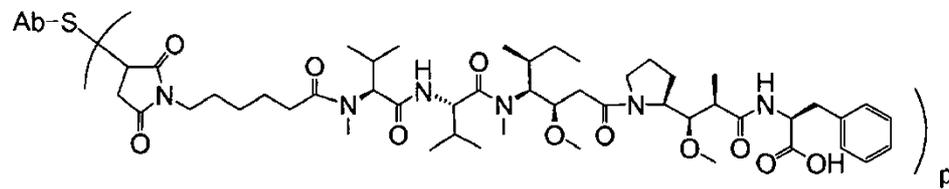
Ab-MC-vc-PAB-MMAE

10



Ab-MC-MMAE

y



Ab-MC-MMAF

15 en las que Val es valina y Cit es citrulina.

42. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 41 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

20

43. La composición farmacéutica de la reivindicación 42 que comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico adicional.

44. Uso del compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 41, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 5 45. Un compuesto conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 41, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método para el tratamiento del cáncer.
46. Un método de cribado de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína para la reactividad del tiol, que comprende:
- 10 (a) introducir uno o más aminoácidos de cisteína en un anticuerpo parental con el fin de generar un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína;
- (b) hacer reaccionar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con un reactivo de afinidad que reacciona con tiol para generar un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína marcado por afinidad, en donde el reactivo de afinidad que reacciona con tiol comprende un resto de biotina y
- 15 (c) medir la unión del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína marcado por afinidad a un medio de captura, en donde el medio de captura comprende estreptavidina, comprendiendo el método además determinar la reactividad del tiol del anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína con el reactivo que reacciona con tiol.
- 20 47. El método de cribado de acuerdo con la reivindicación 46, en el que la etapa (a) del proceso comprende:
- (i) la mutagénesis dirigida al sitio de un gen que codifica el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína en un plásmido bicatenario (ds) y
- 25 (ii) expresar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína.
48. El método de cribado de acuerdo con la reivindicación 47, que comprende además aislar y purificar el anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína expresado.
49. El método de cribado de acuerdo con la reivindicación 46, en el que el reactivo que reacciona con tiol comprende un resto maleimida.
- 30 50. El método de cribado de acuerdo con la reivindicación 46, en el que el anticuerpo parental es una proteína de fusión que comprende un péptido de unión a albúmina (ABP).
- 35 51. El método de cribado de acuerdo con la reivindicación 50, en el que el ABP comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.
- 40 52. El método de cribado de acuerdo con la reivindicación 46, en el que el anticuerpo parental es un fragmento de anticuerpo Fab.

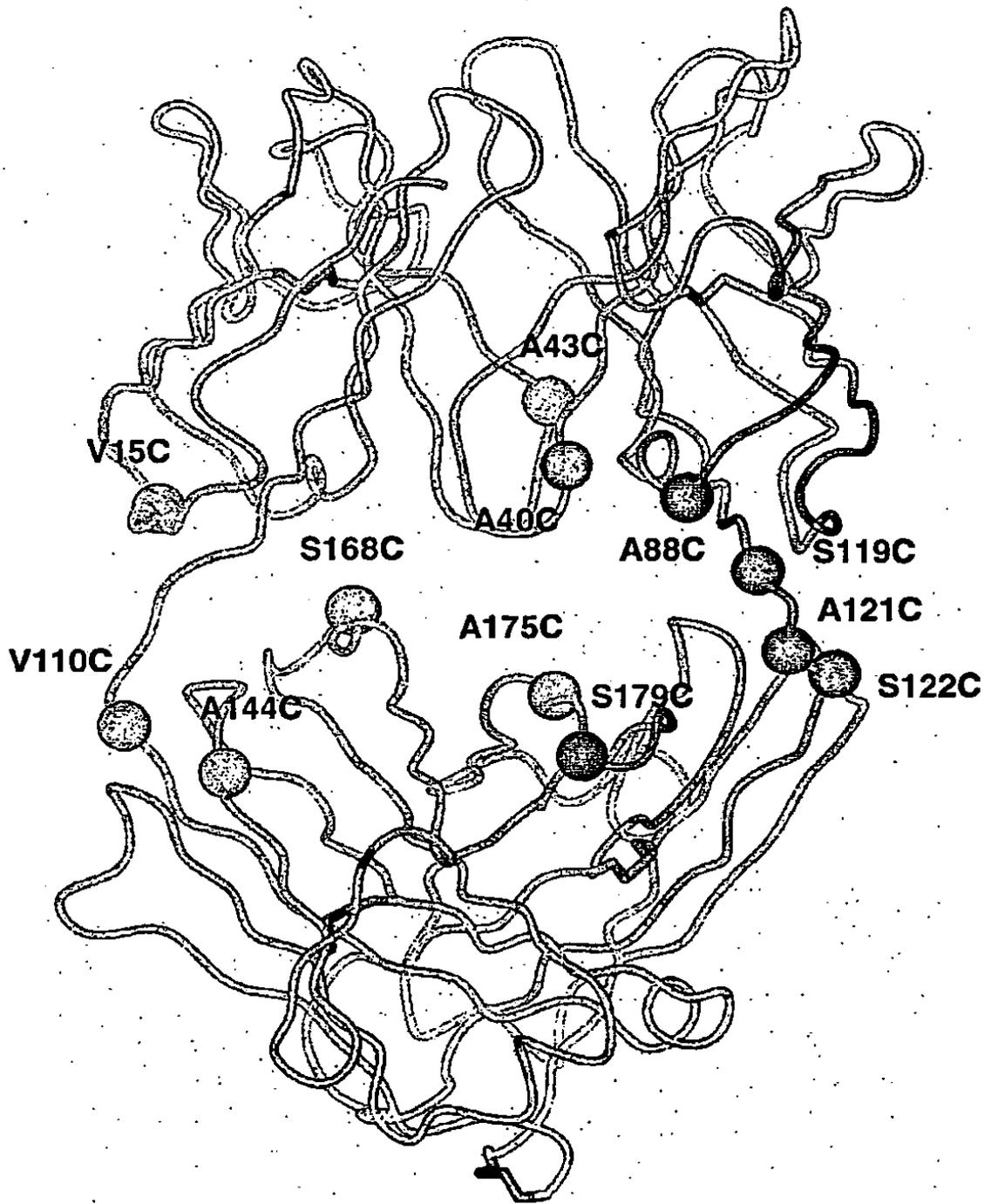


Figura 1A

Numeración secuencial

```

                10          20          30
4d5v7fabH  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW
*****
4d5v7fabH  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW
                10          20          30
    
```

Numeración de Kabat

```

                40          50          60          70          80
4d5v7fabH  VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL
*****
4d5v7fabH  VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL
                40          50 a          60          70          80 abc

                90          100         110         120         130
4d5v7fabH  RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
*****
4d5v7fabH  RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
                90          100abc         110         120

                140         150         160         170         180
4d5v7fabH  STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
*****
4d5v7fabH  STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
                130         140         150         160         170

                190         200         210         220
4d5v7fabH  SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
*****
4d5v7fabH  SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
                180         190         200         210
    
```

Figura 1B

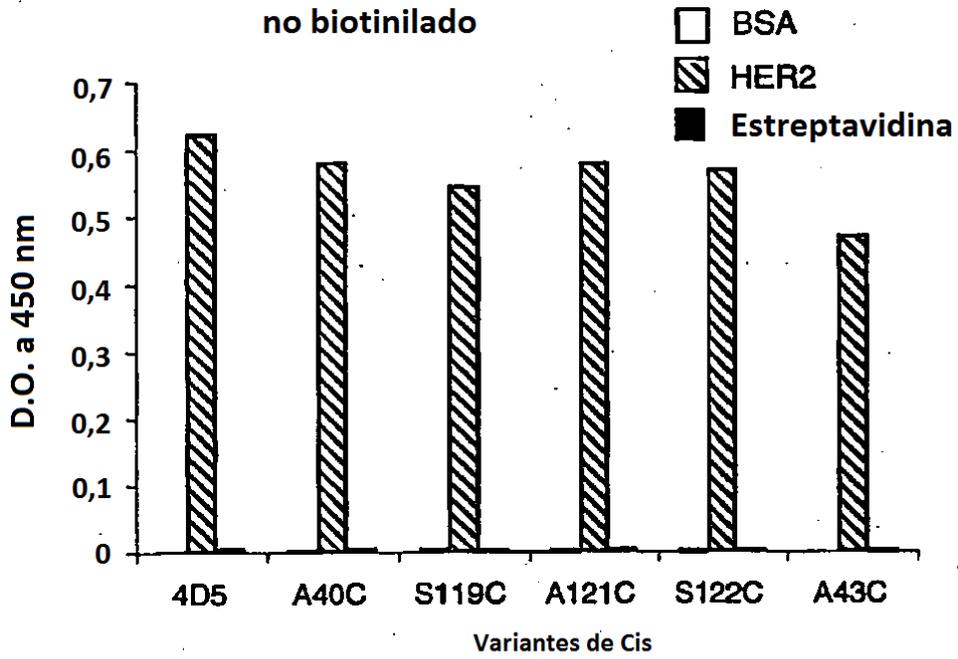


Figura 2A

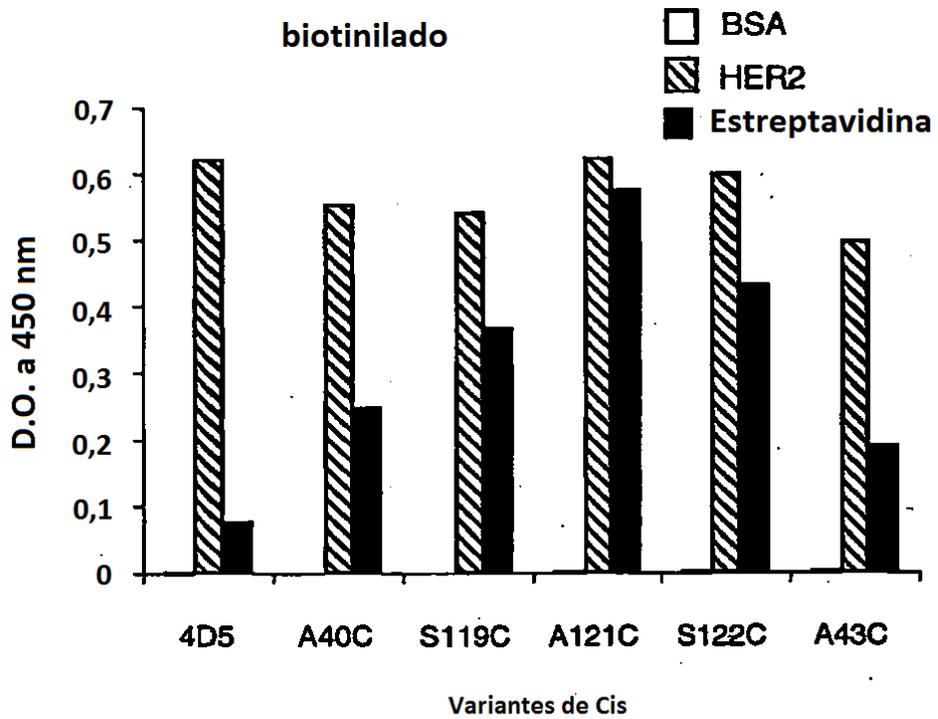


Figura 2B

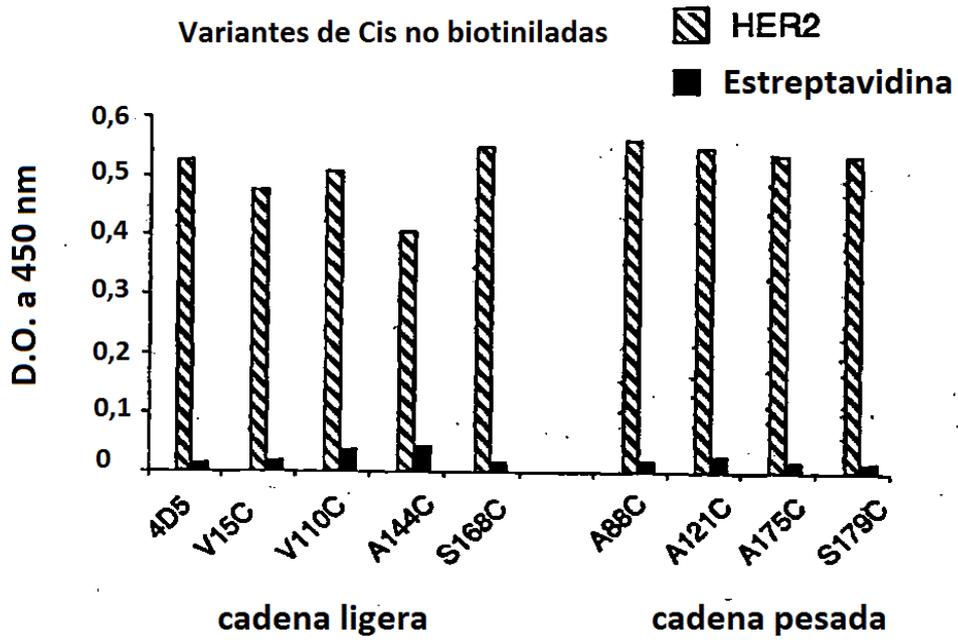


Figura 3A

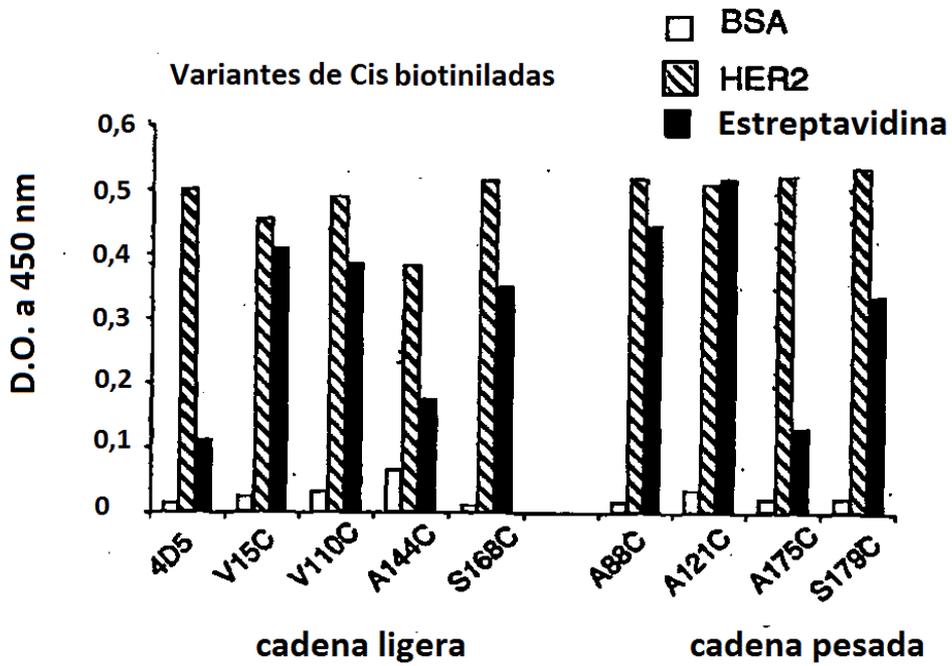
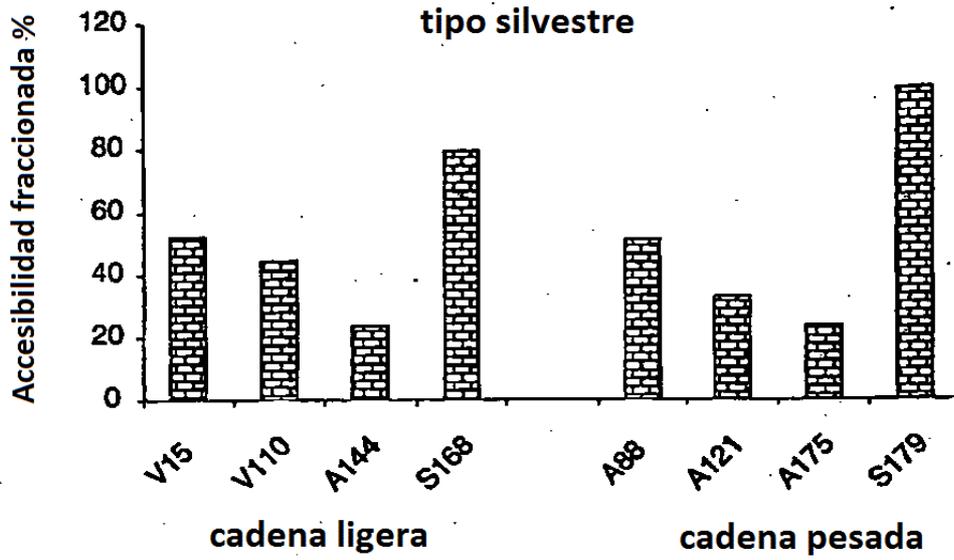
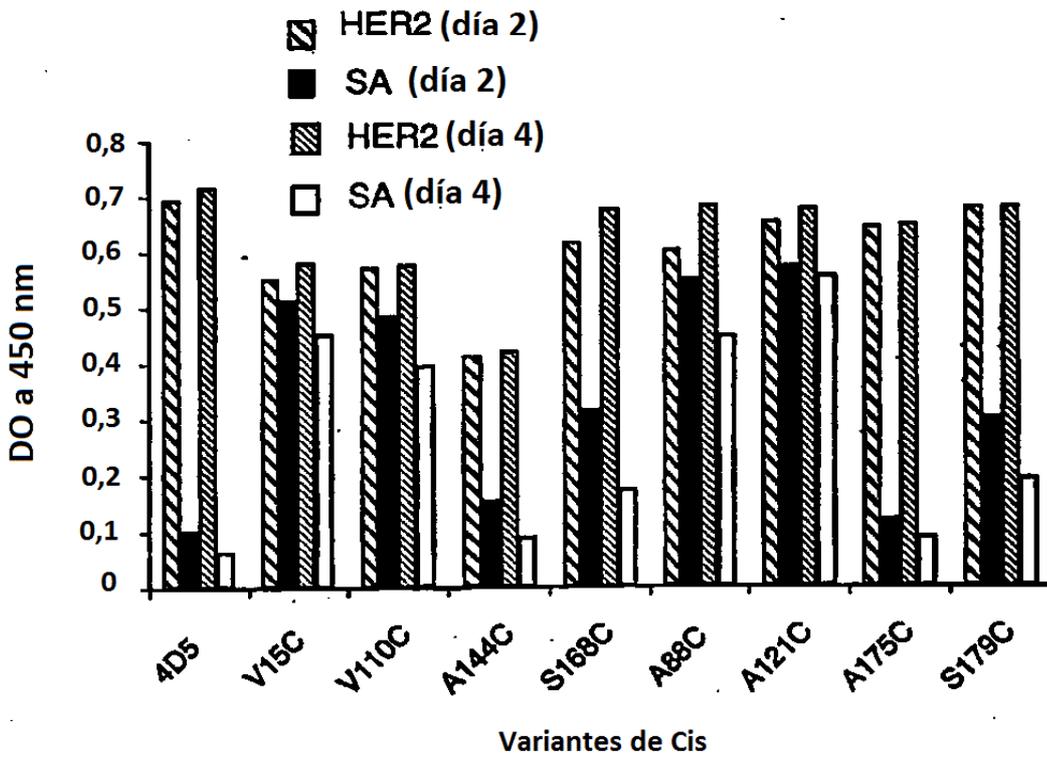


Figura 3B



**Figura 4A**



**Figura 4B**

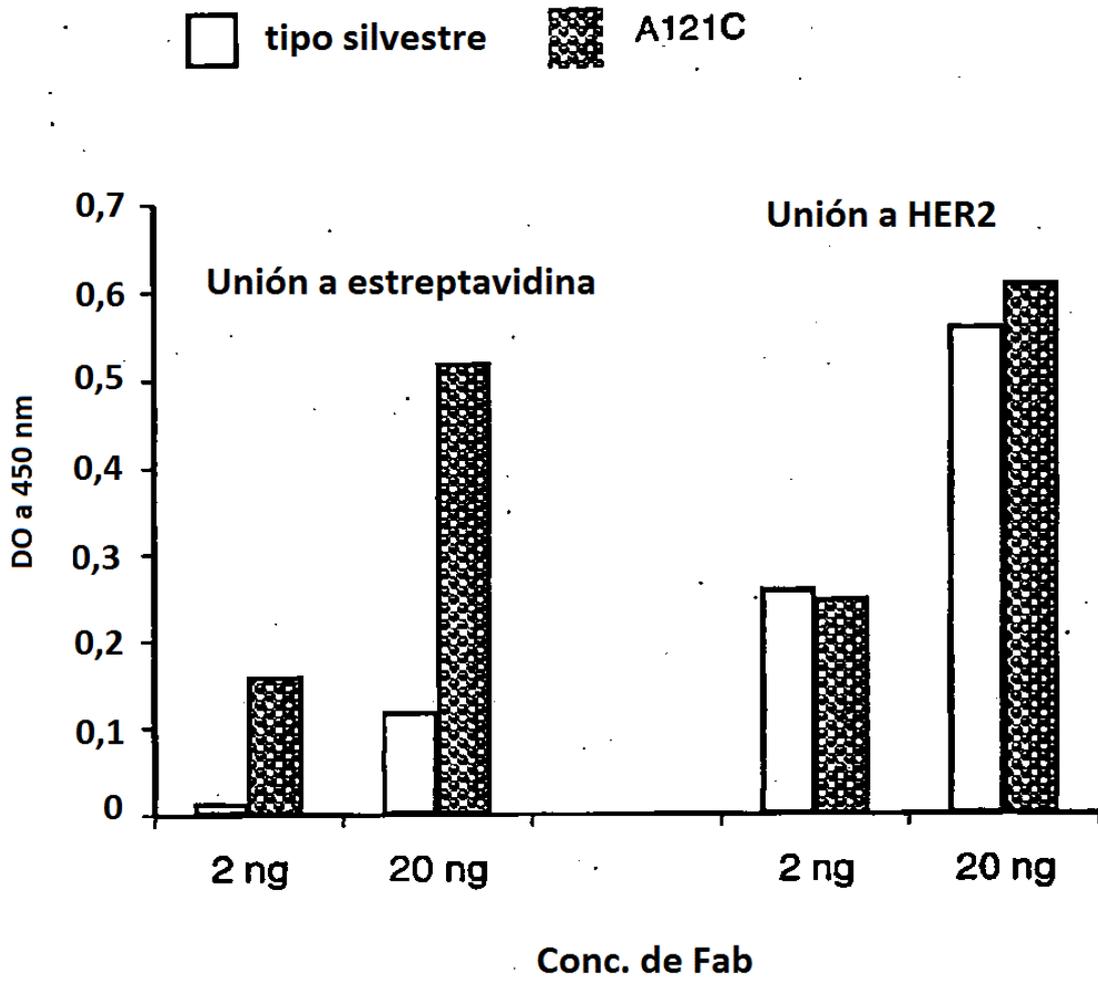


Figura 5

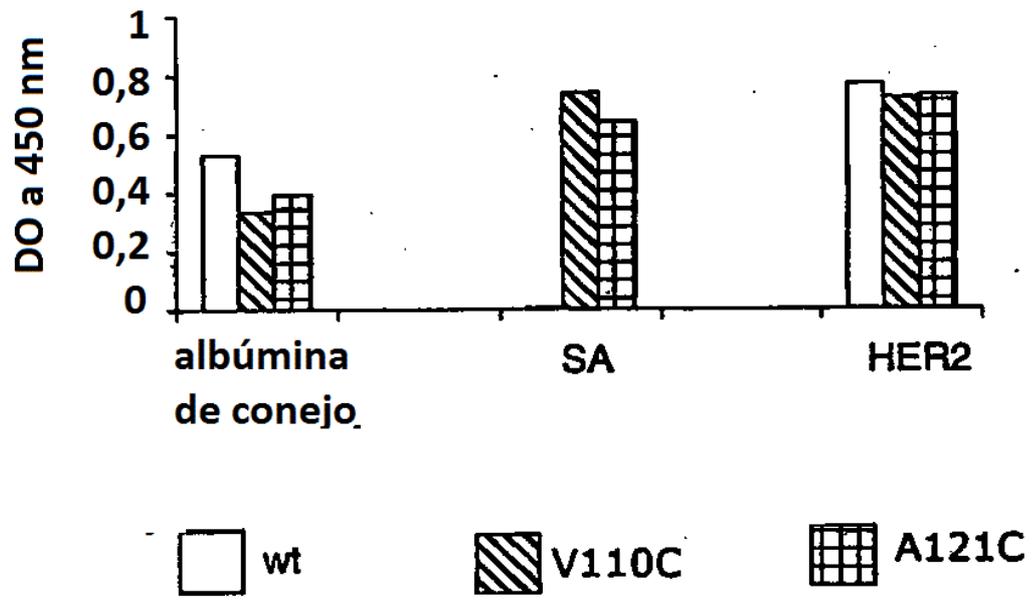


Figura 6

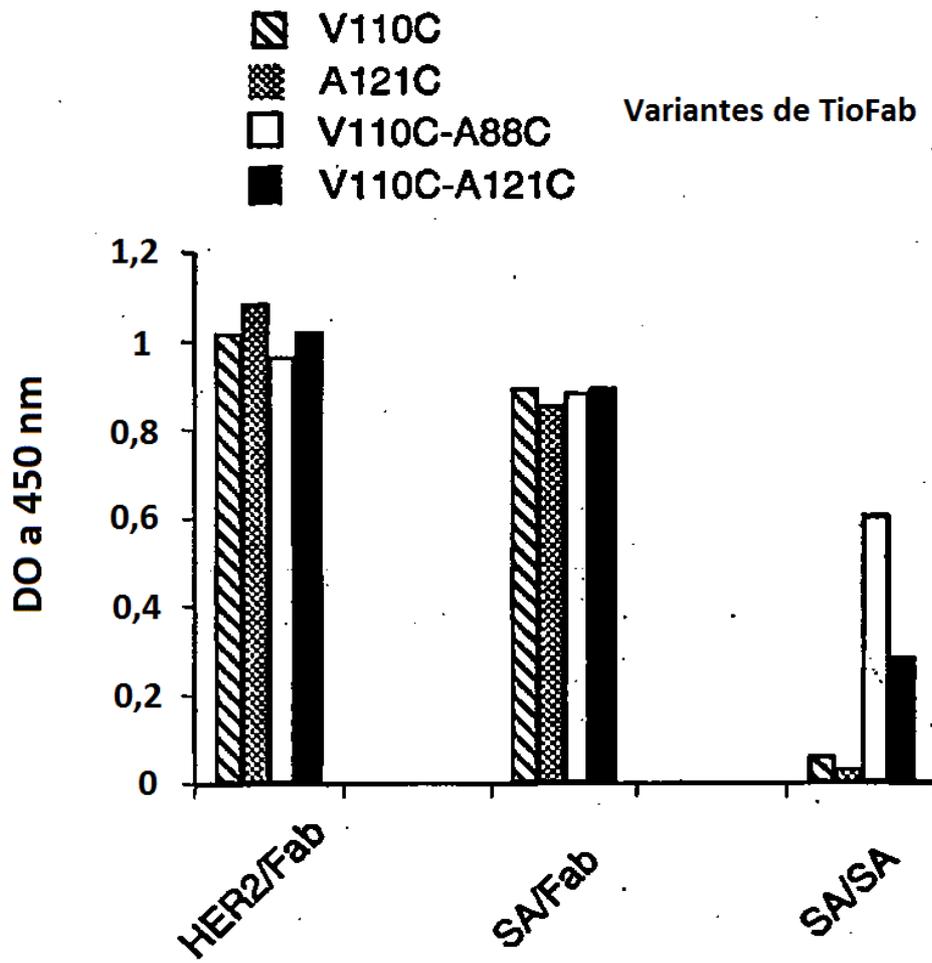


Figura 7

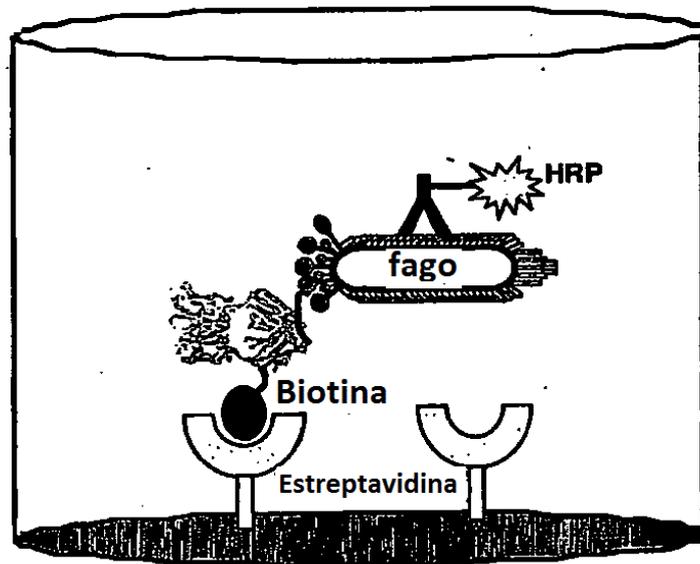
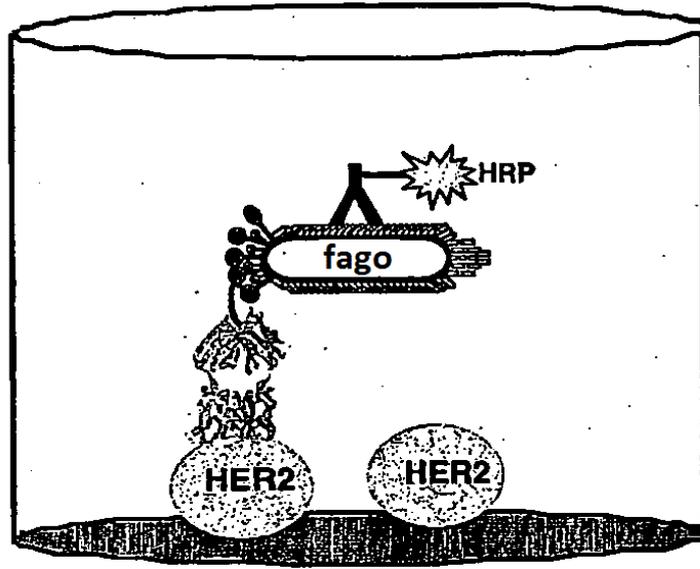


Figura 8

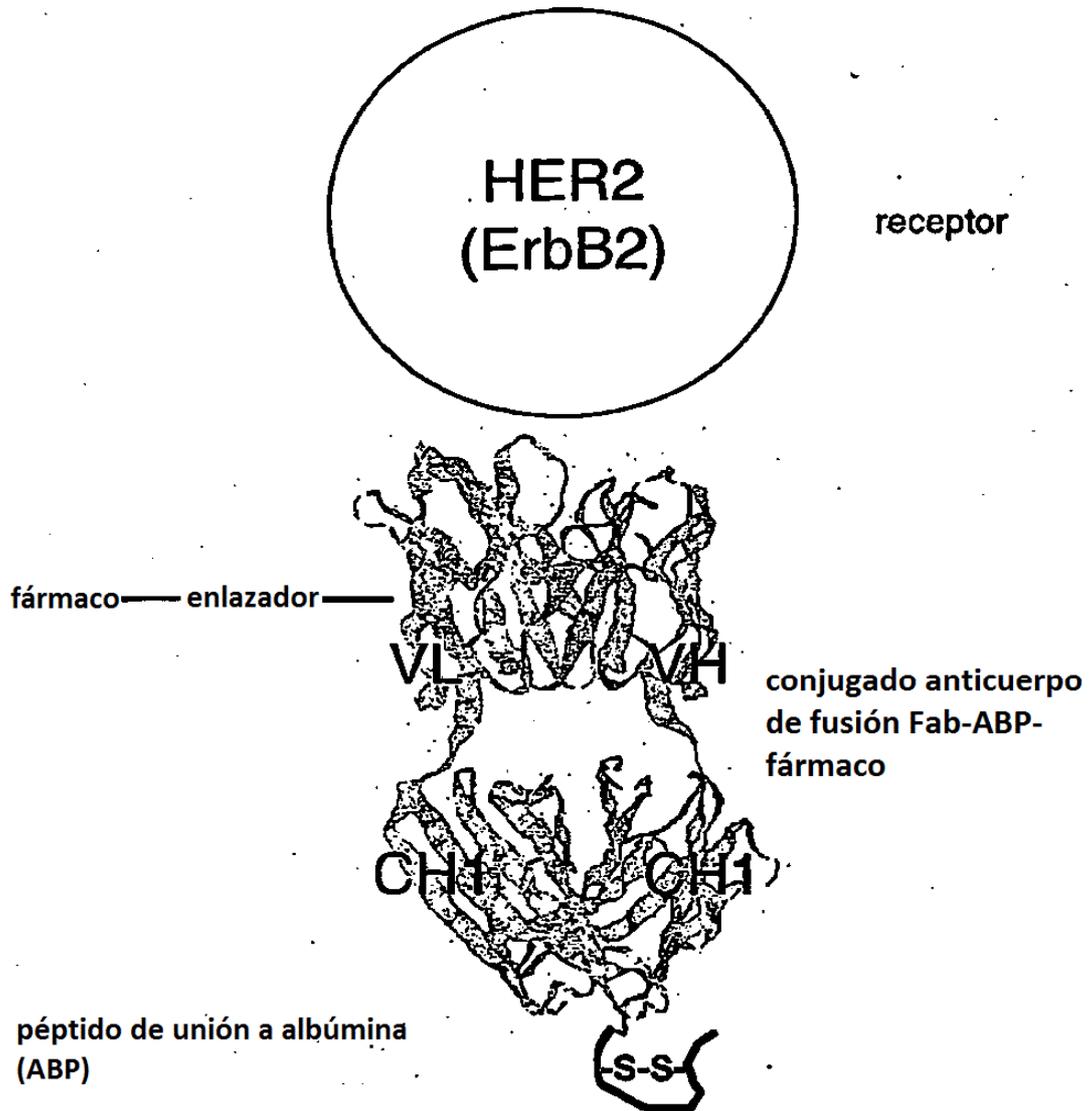


Figura 9

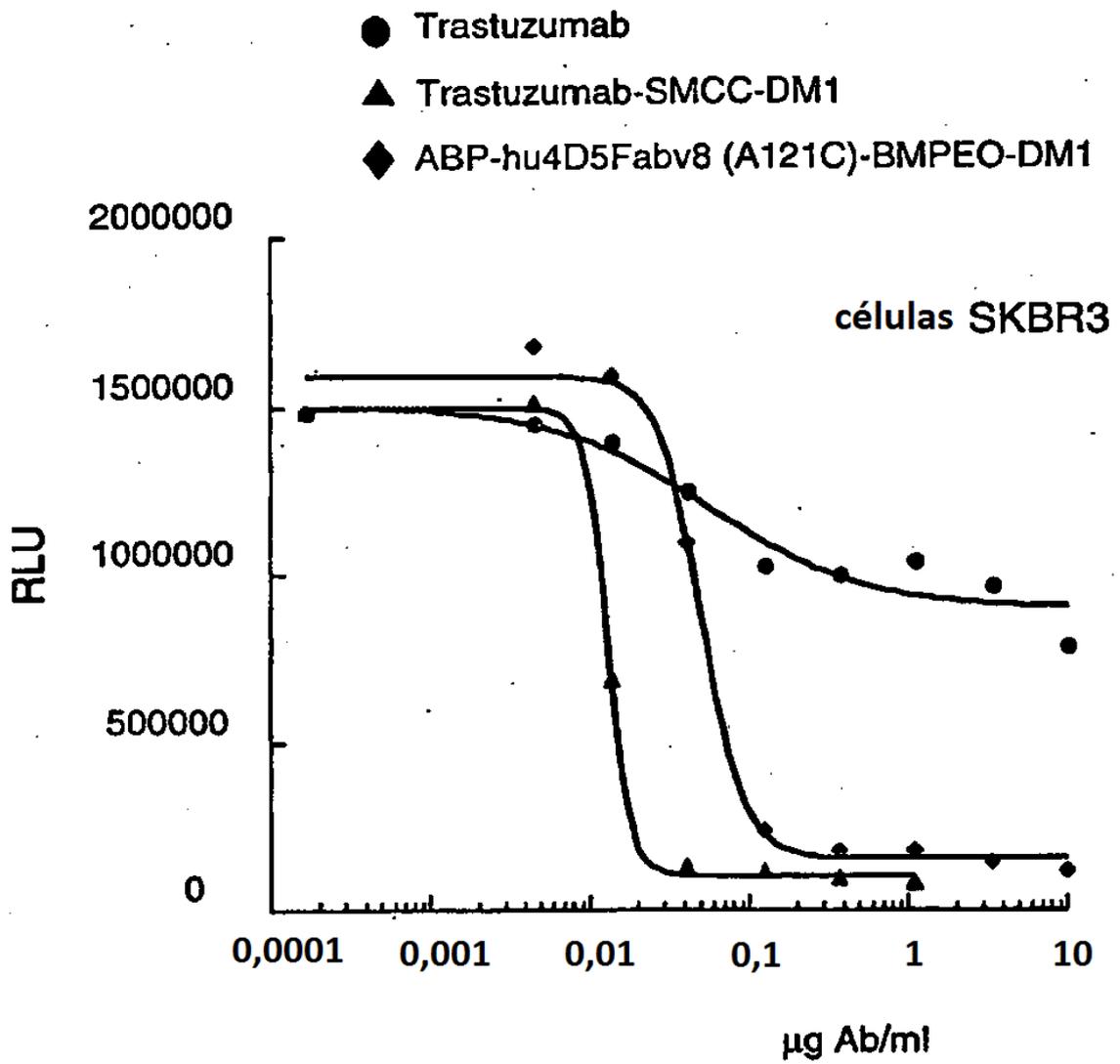


Figura 10

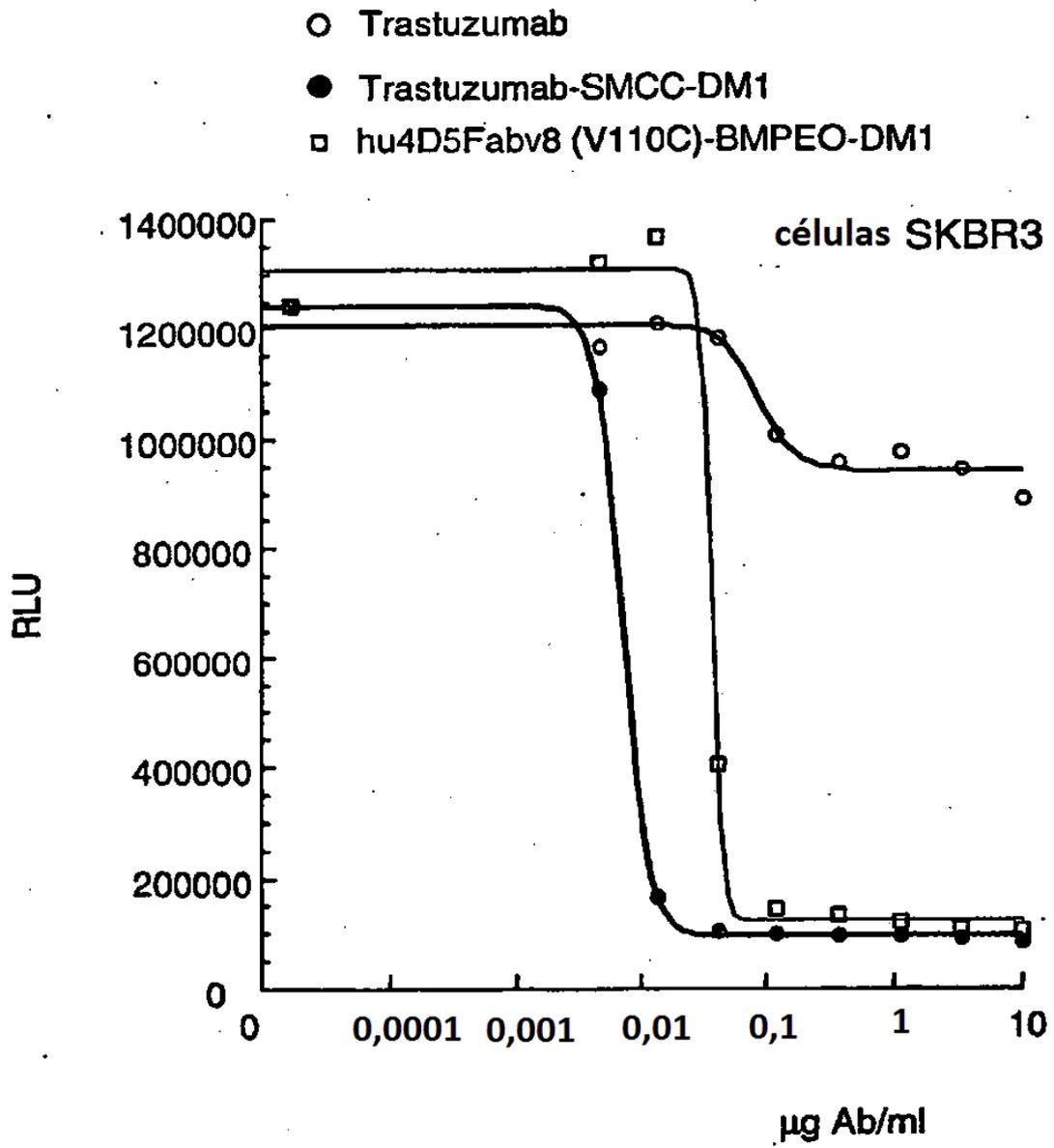


Figura 11

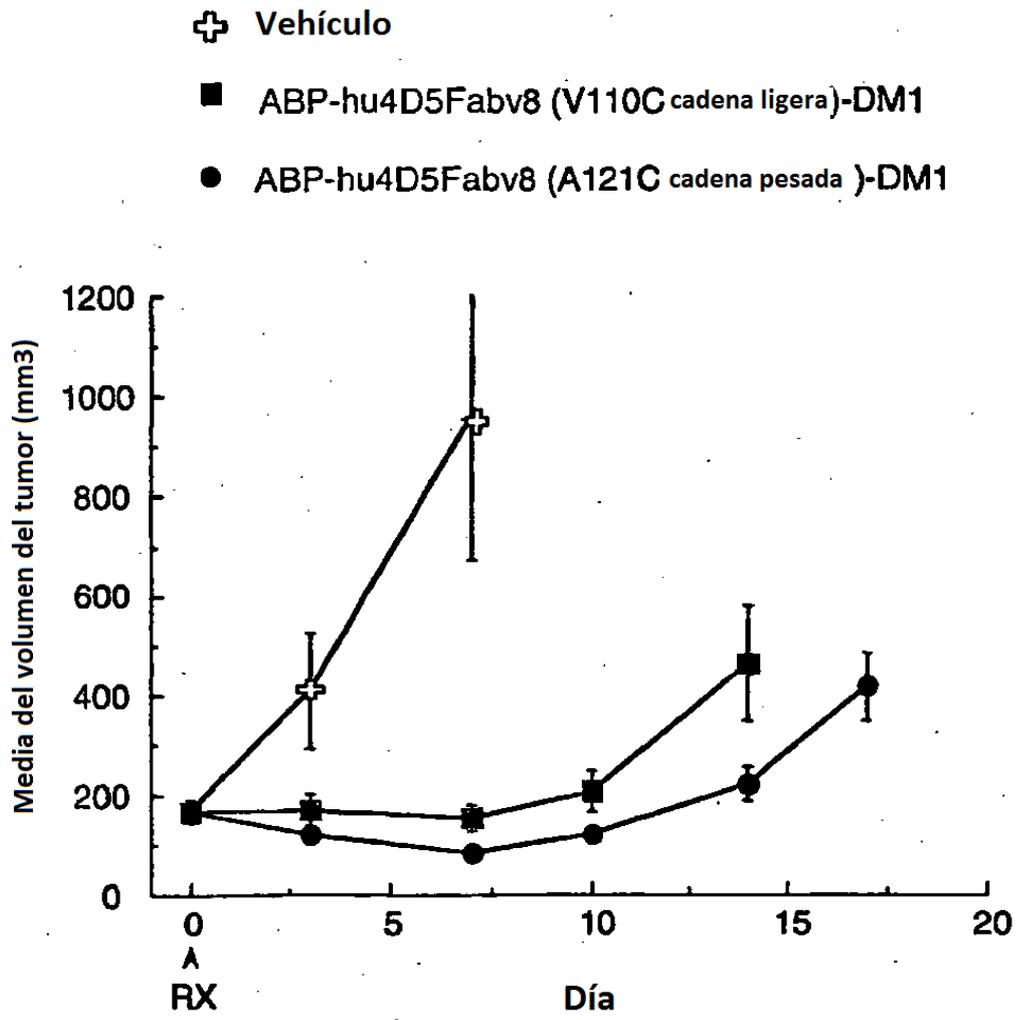


Figura 12

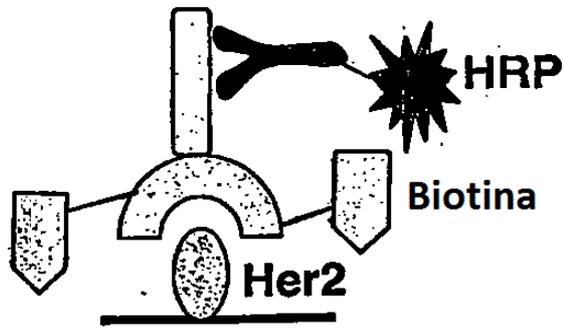


Figura 13A

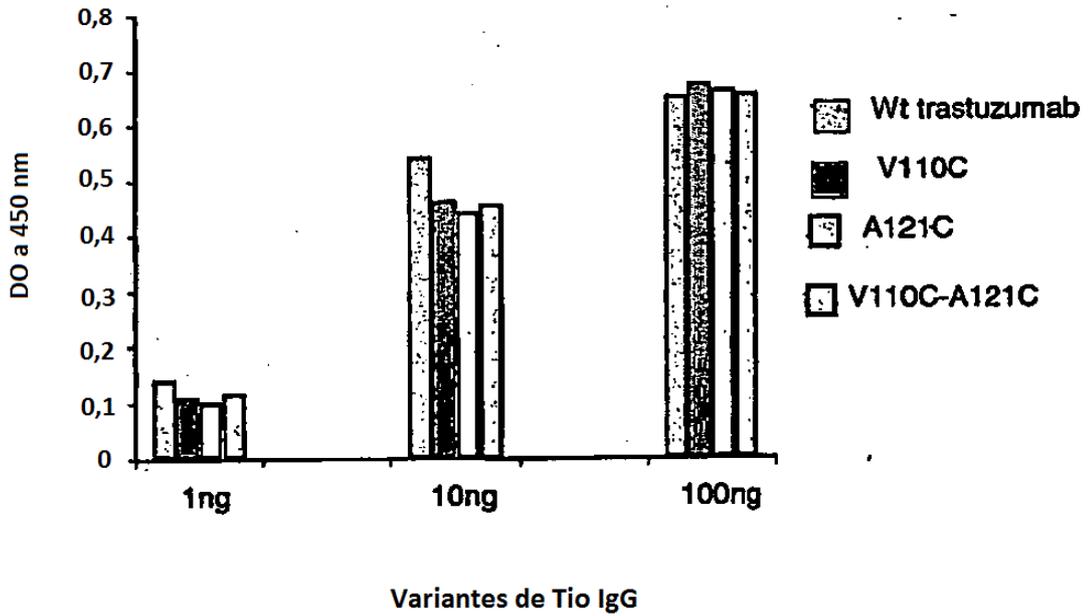


Figura 13B

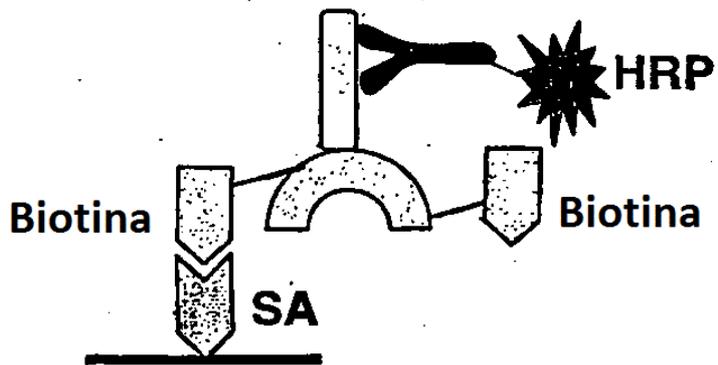


Figura 14A

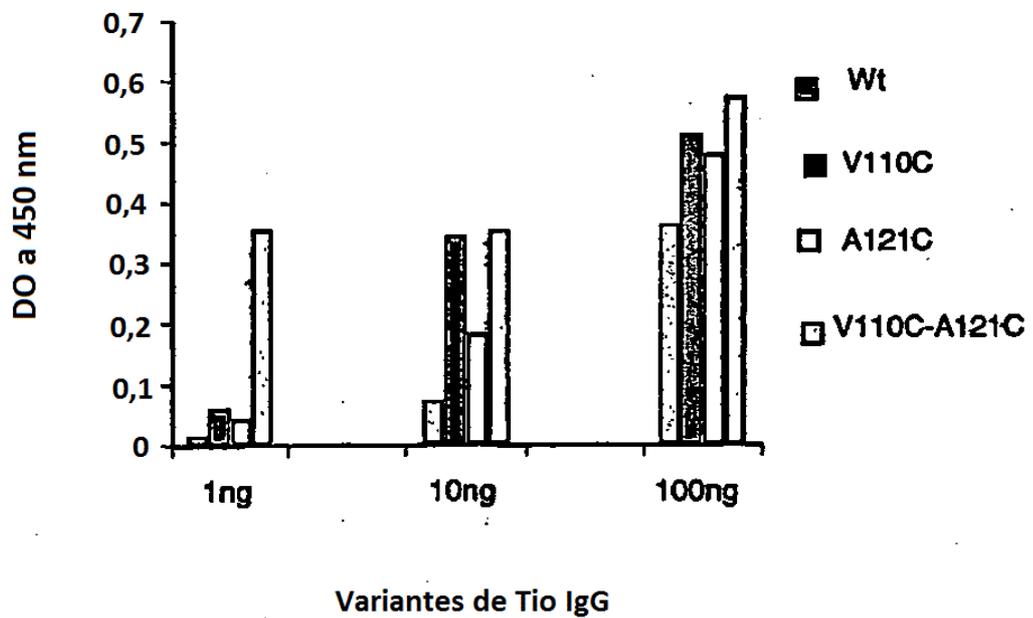
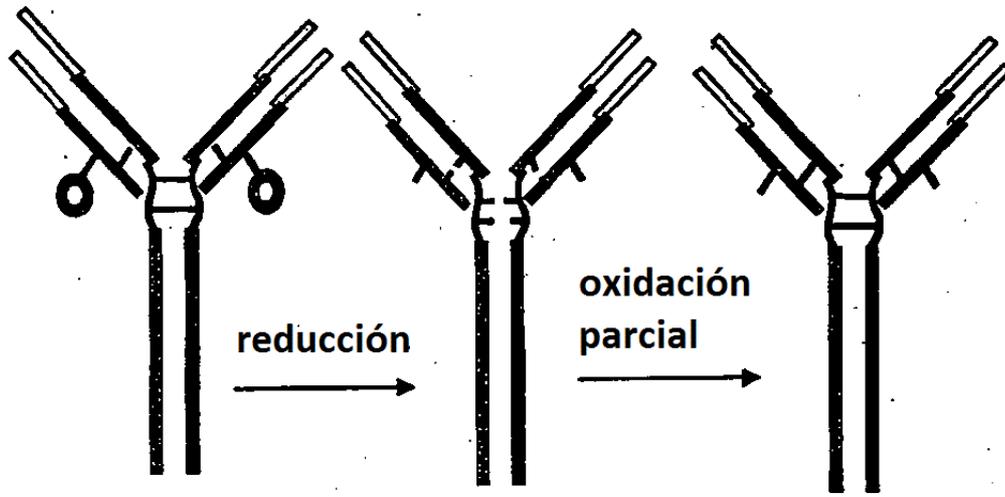


Figura 14B



Tio-Mab

Reducido

Reoxidado

○ Aducto de cis

Figura 15

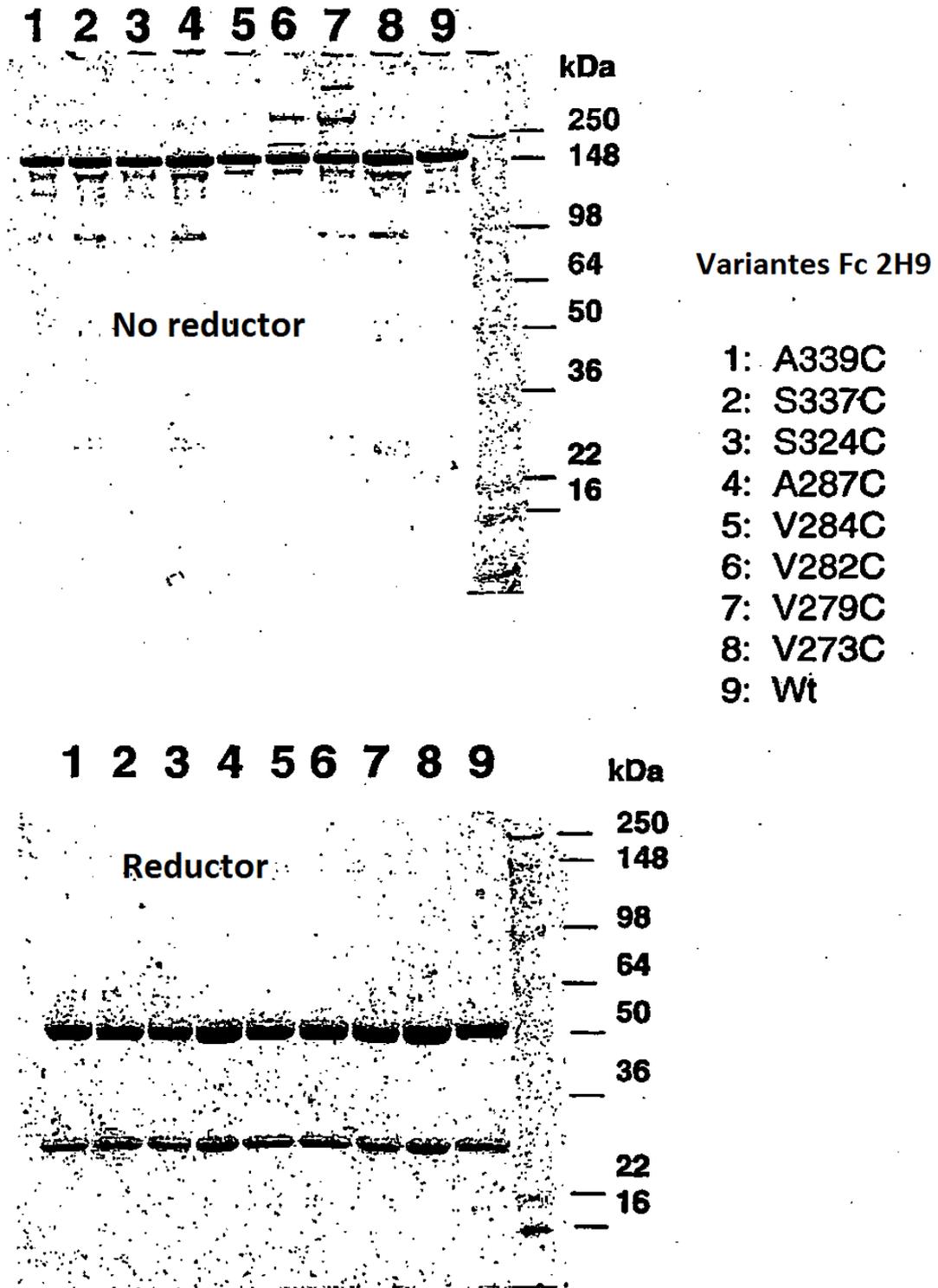


Figura 16

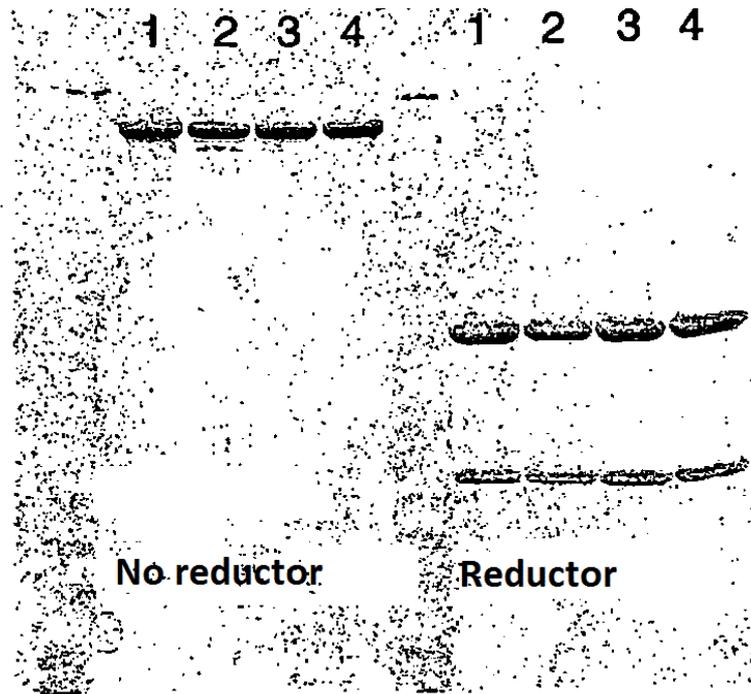


Figura 17A

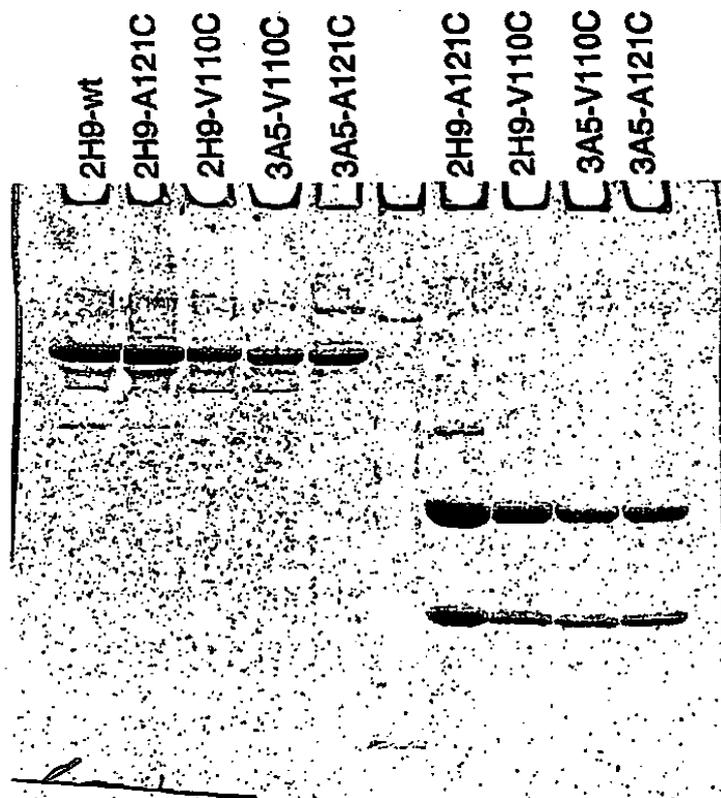


Figura 17B

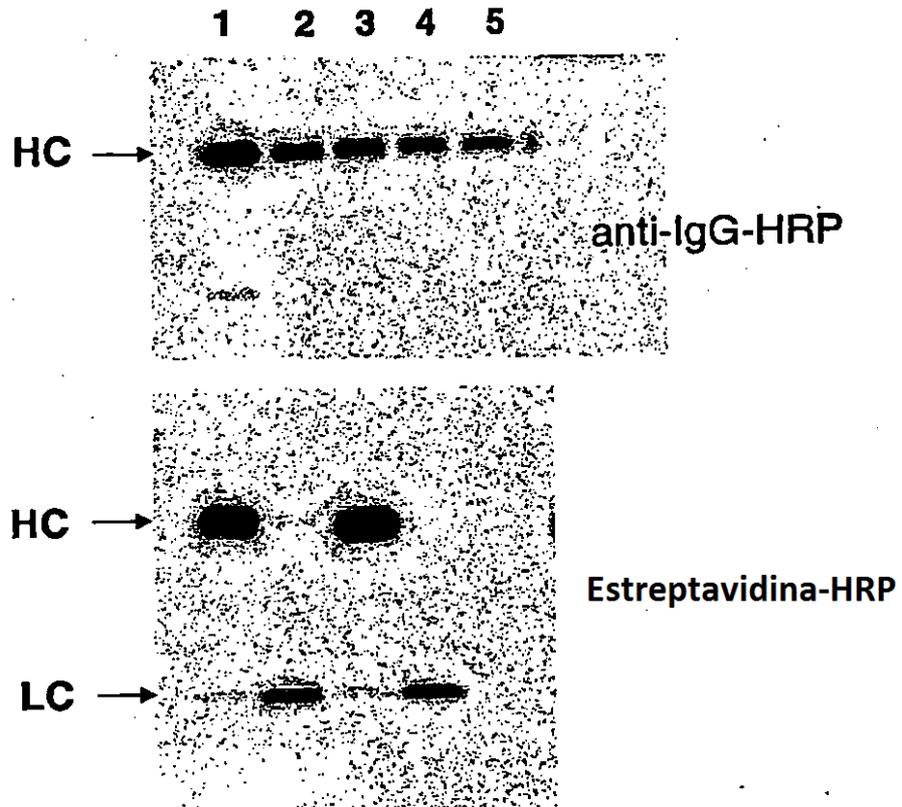
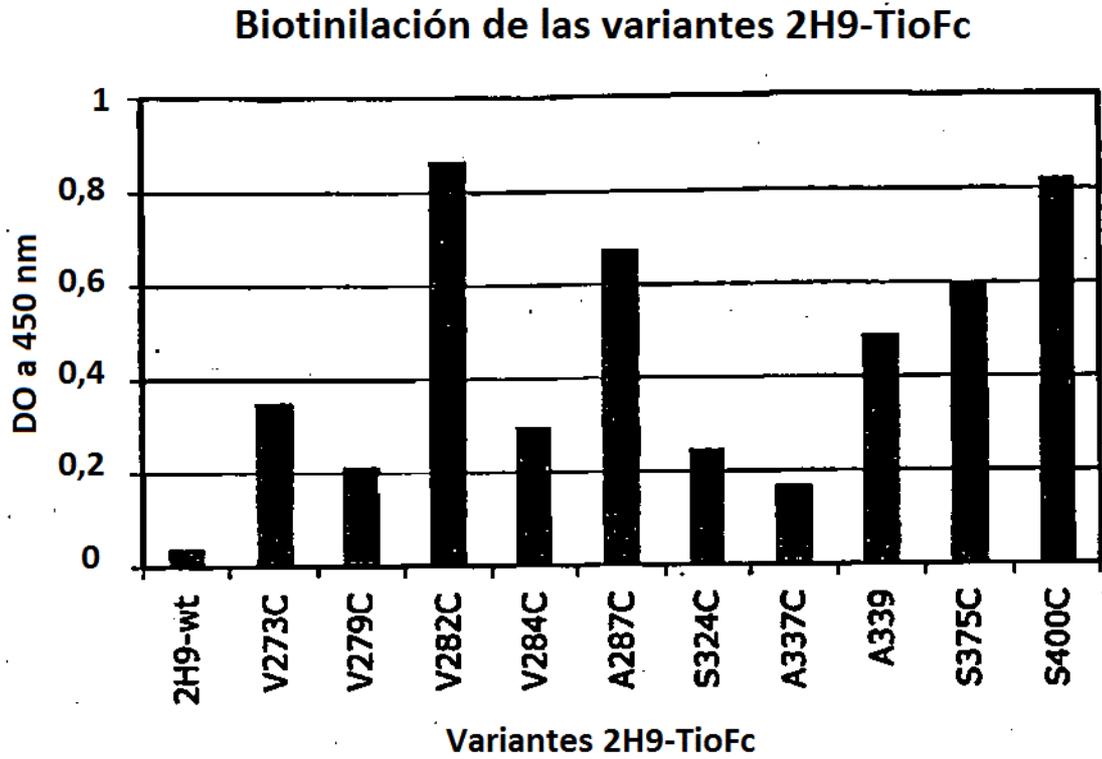


Figura 18



**Figura 19**

SK-BR-3

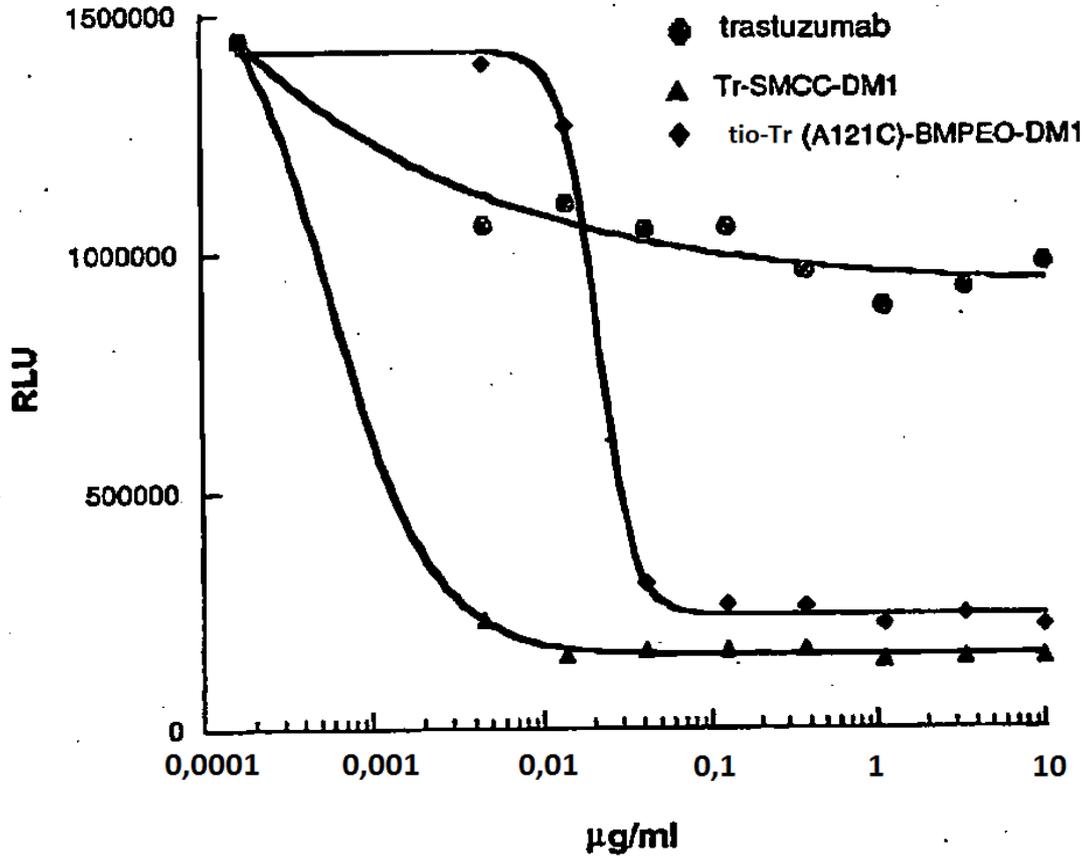


Figura 20

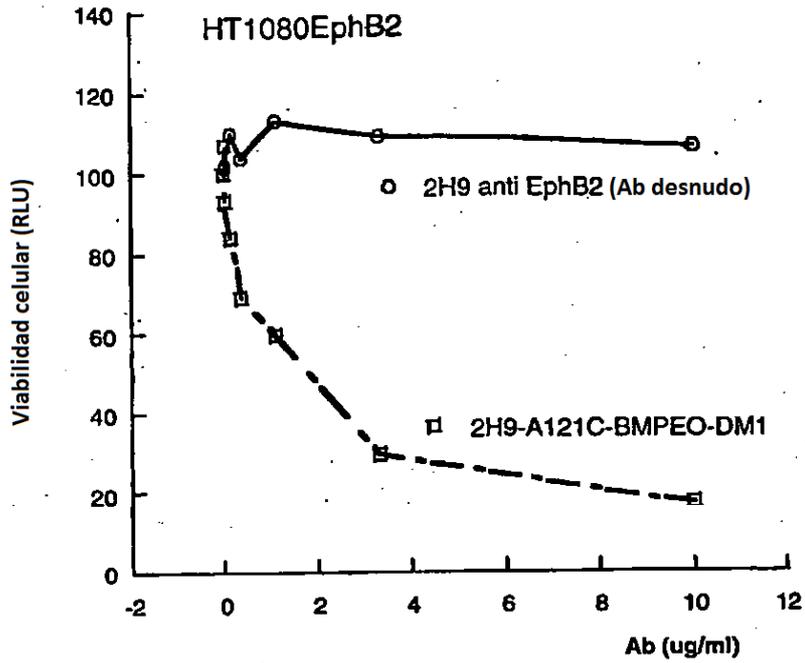


Figura 21A

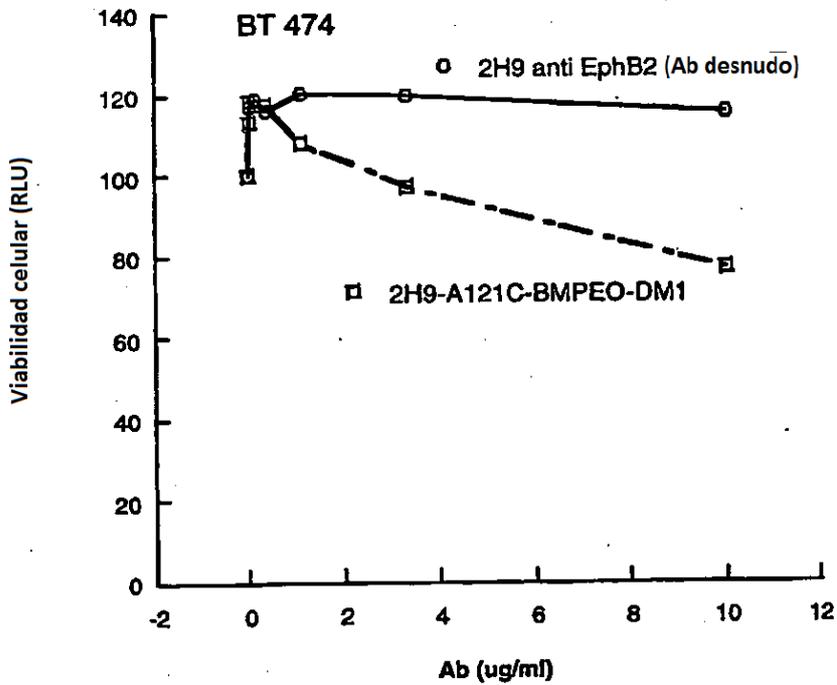


Figura 21B

PC3/neo  
ensayo de proliferación celular in vitro

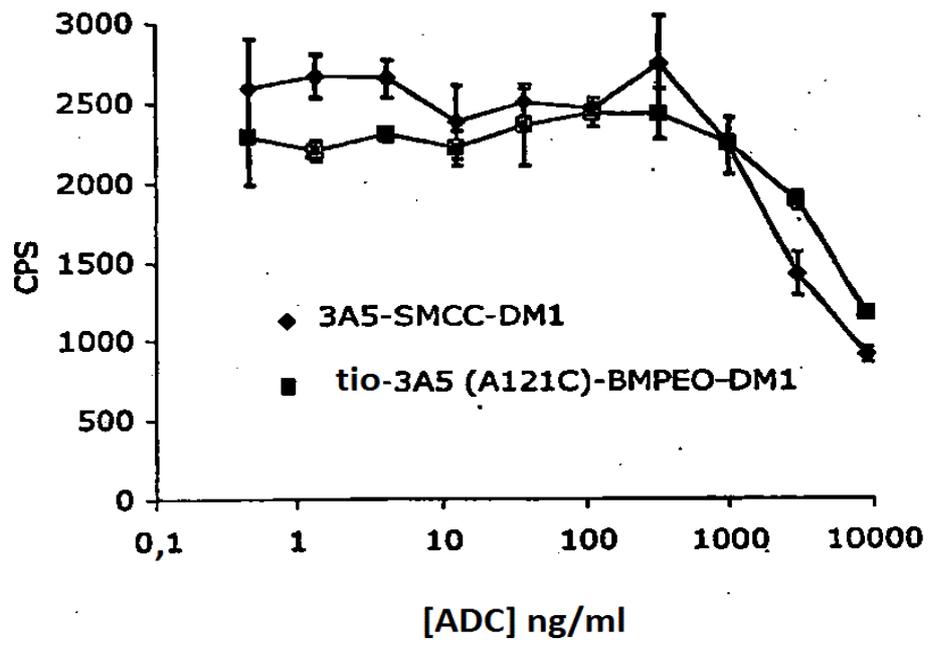


Figura 22

PC3/MUC16  
ensayo de proliferación celular in vitro

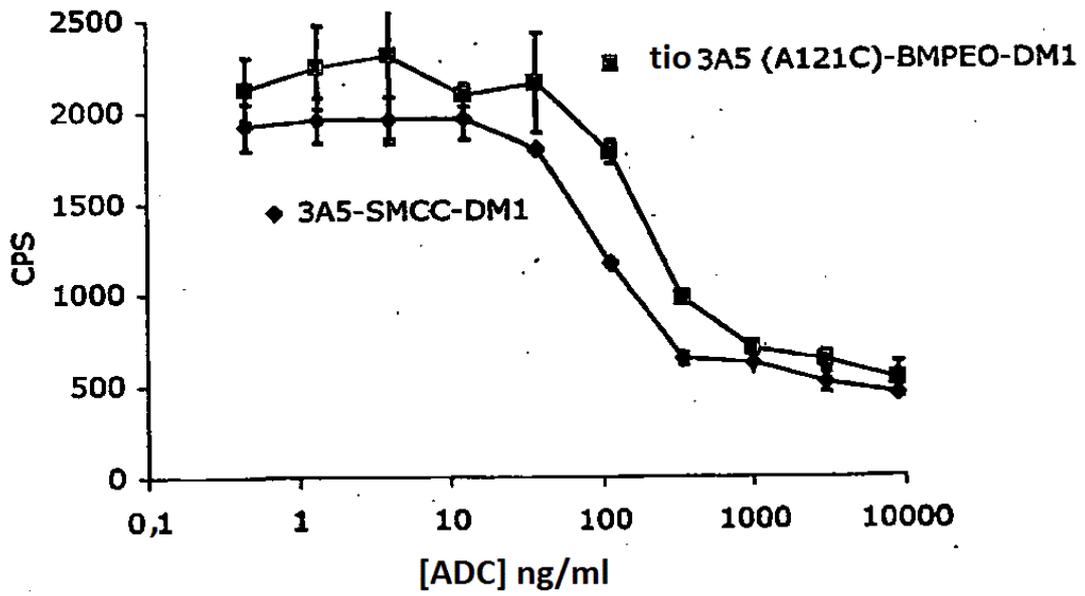
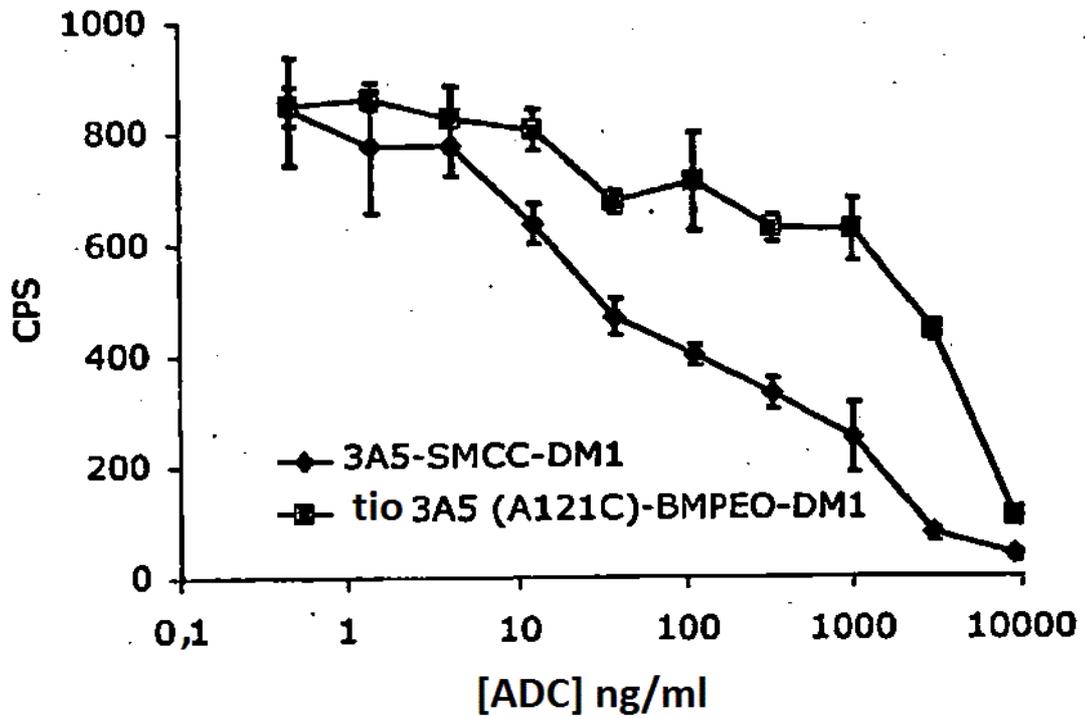


Figura 23

**OVCAR-3**

ensayo de proliferación celular in vitro



**Figura 24**

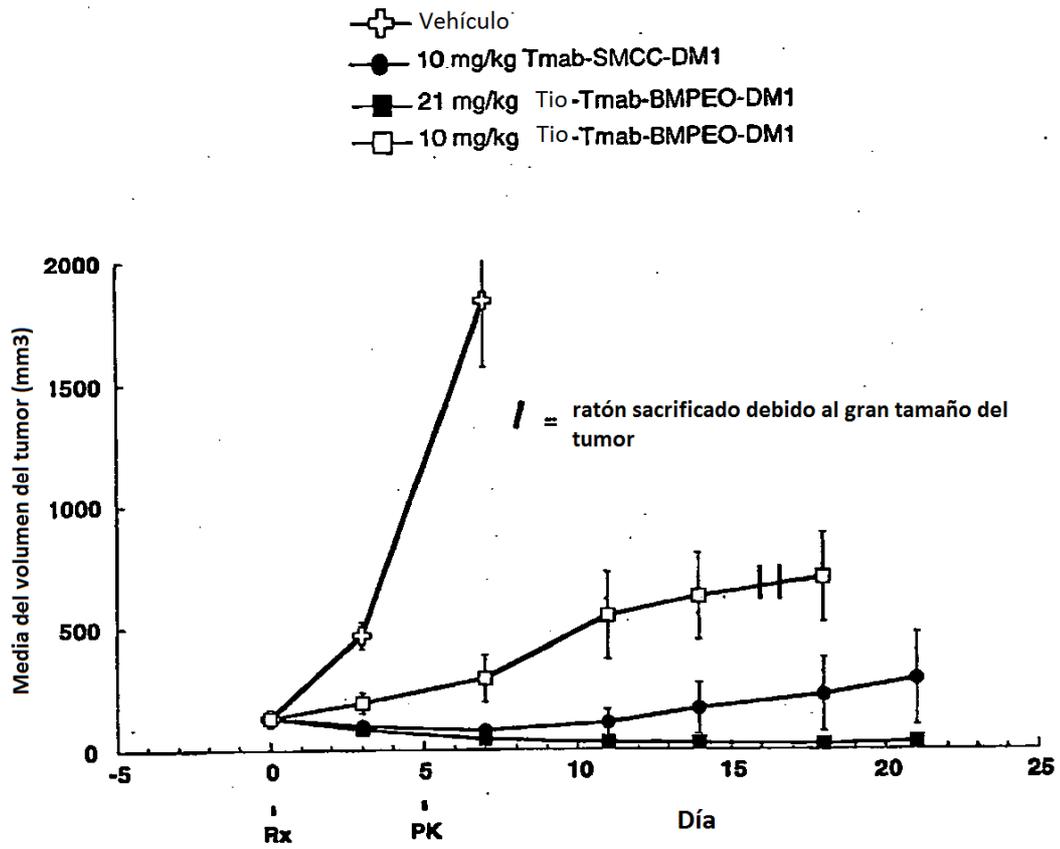


Figura 25