

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 605 443**

(51) Int. Cl.:

**A61K 38/06** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**C07K 7/02** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2004 E 12157776 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2478912**

(54) Título: **Conjugados de auristatina con anticuerpos anti-HER2 o anti-CD22 y su uso en terapia**

(30) Prioridad:

**06.11.2003 US 518534 P  
26.03.2004 US 557116 P  
04.08.2004 US 598899 P  
27.10.2004 US 622455 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.03.2017**

(73) Titular/es:

**SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)  
21823 30th Drive, S.E.  
Bothell, WA 98021, US**

(72) Inventor/es:

**DORONINA, SVETLANA O.;  
SENTER, PETER D.;  
TOKI, BRIAN E.;  
EBENS, ALLEN J.;  
KLINE, TONI BETH;  
POLAKIS, PAUL;  
SLIWOWSKI, MARK X. y  
SPENCER, SUSAN D.**

(74) Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

### Observaciones:

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

**ES 2 605 443 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Conjugados de auristatina con anticuerpos anti-HER2 o anti-CD22 y su uso en terapia

**5 1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere a conjugados de anticuerpo-fármaco, a composiciones que los incluyen y a métodos para el uso de los mismos para tratar el cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa. Además, en el presente documento se describen métodos para usar compuestos de conjugados de anticuerpo-fármaco para diagnóstico o tratamiento *in vitro*, *in situ*, e *in vivo* de células de mamífero, o afecciones patológicas asociadas.

**10 2. Antecedentes de la invención**

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

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

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

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

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal de IgG1 kappa de murino dirigido frente al antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de linfocitos B normales y malignos y en radioisótopo <sup>111</sup>In o <sup>90</sup>Y unido mediante un quelante-conector de tiourea (Wiseman et al. (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27 (7): 766-77; Wiseman et al. (2002) Blood 99 (12): 4336-42; Witzig et

al. (2002) J. Clin. Oncol. 20 (10): 2453-63; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20 (15): 3262-69). A pesar de que ZEVALIN tiene actividad frente al Linfoma no Hodgkin de linfocitos B (NHL), su administración da como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de fármaco y anticuerpo compuesto por un anticuerpo hu CD33 unido a caliqueamicina, se aprobó en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25 (7): 686; Patentes de Estados Unidos Nº 4970198; Nº 5079233; Nº 5585089; Nº 5606040; Nº 5693762; Nº 5739116; Nº 5767285; Nº 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de fármaco y anticuerpo compuesto por el anticuerpo huC242 unido a través del conector disulfuro SPP al resto de fármaco maitansinoide, DM1, está avanzando en ensayos en Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), conjugado de fármaco y anticuerpo ah compuesto por el anticuerpo monoclonal de antígeno de membrana específico antipróstata (PSMA) unido al resto de fármaco maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el tratamiento potencial de tumores de próstata. El mismo resto de fármaco maitansinoide, DM1, se unió a través de un conector no disulfuro, SMCC, a un anticuerpo monoclonal murino de ratón, TA.1 (Chari et al. (1992) Cancer Research 52: 127-131). Se informó que este conjugado era 200 veces menos potente que el correspondiente conjugado de conector disulfuro. Se consideró que el conector SMCC en el mismo era "no escindible".

Se han aislado varios compuestos peptídicos cortos a partir del molusco marino *Dolabella auricularia* y se ha encontrado que tienen actividad biológica (Pettit et al. (1993) Tetrahedron 49: 9151; Nakamura et al. (1995) Tetrahedron Letters 36: 5059-5062; Sone et al. (1995) Jour. Org. Chem. 60: 4474). También se han preparado análogos de estos compuestos, y se encontró que algunos tienen actividad biológica (para una revisión, véase Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13: 243-277). Por ejemplo, auristatina E (Patente de Estados Unidos Nº 5635483) es un análogo sintético del producto natural marino Dolastatina 10, un agente que inhibe la polimerización de la tubulina mediante unión al mismo dominio en la tubulina que el fármaco anticáncer vincristina (G. R. Pettit, (1997) Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 70: 1-79). Dolastatina 10, auristatina PE, y auristatina E son péptidos lineales que tienen cuatro aminoácidos, tres de los cuales son únicos esta clase de compuestos de dolastatina, y una amida C-terminal.

Los péptidos auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron con: (i) anticuerpos monocionales químéricos cBR96 (específicos de Lewis Y en carcinomas); (ii) cAC10 que es específico de CD30 en neoplasias hematológicas (Klussman, et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15 (4): 765-773; Doronina et al. (2003) Nature Biotechnology 21 (7): 778-784; "Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"; Francisco et al. (2003) Blood 102 (4): 1458-1465; Publicación de Estados Unidos Nº 2004/0018194; (iii) anticuerpos anti-CD20 tales como RITUXAN® (documento WO 04/032828) para el tratamiento de cánceres que expresan CD20 y trastornos inmunes; (iv) anticuerpos anti-EphB2 2H9 y anti-IL-8 para el tratamiento de cáncer colorrectal (Mao, et al. (2004) Cancer Research 64 (3): 781-788); (v) anticuerpo E-selectina (Bhaskar et al. (2003) Cancer Res. 63: 6387-6394); y (vi) otros anticuerpos anti-CD30 (documento WO 03/043583).

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

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

La familia ErbB de tirosina quinasas son mediadores importantes del crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. La familia de receptores incluye cuatro miembros distintos que incluyen receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1, HER1), HER2 (ErbB2 o p 185<sup>neu</sup>), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tiro2). Se ha caracterizado un panel de anticuerpos anti-ErbB2 usando la línea celular de tumor de mama humano SKBR3 (Hudziak et al., (1989) Mol. Cell. Biol. 9 (3): 1165-1172. La inhibición máxima se obtuvo con el anticuerpo denominado 4D5 que inhibió la proliferación celular en un 56 %. Otros anticuerpos en el panel redujeron la proliferación celular en menor grado en este ensayo. Se encontró adicionalmente que el anticuerpo 4D5 sensibilizada líneas celulares de tumores de mama que sobreexpresan ErbB2 a los efectos citotóxicos de TNF-a (Patente de Estados Unidos Nº 5677171). Los anticuerpos anti-ErbB2 analizados en Hudziak et al. se caracterizan adicionalmente en Fendly et al. (1990) Cancer Research 50: 1550-1558; Kotts et al. (1990) In vitro 26 (3): 59A; Sarup et al. (1991) Growth Regulation 1: 72-82; Shepard et al. J. (1991) Clin. Immunol. 11 (3): 117-127; Kumar et al. (1991) Mol. Cell. Biol. 11 (2) 979-986; Lewis et al. (1993) Cancer Immunol. Immunother. 37: 255-263; Pietras et al. (1994) Oncogene 9: 1829-1838; Vitetta et al. (1994) Cancer Research 54: 5301-5309; Sliwkowski et al. (1994) J. Biol. Chem. 269 (20): 14661-14665; Scott et al. (1991) J. Biol. Chem. 266: 14300-5; D'souza et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91: 7202-7206; Lewis et al. (1996) Cancer Research 56: 1457-1465; y Schaefer et al. (1997) Oncogene 15: 1385-1394.

65 Se han descrito otros anticuerpos anti-ErbB2 con diversas propiedades en Tagliabue et al. Int. J. Cancer 47: 933-937 (1991); McKenzie et al. Oncogene 4: 543-548 (1989); Maier et al. Cancer Res. 51: 5361-5369 (1991); Bacus et al.

Molecular Carcinogenesis 3: 350-362 (1990); Stancovski et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8691-8695 (1991); Bacus et al. Cancer Research 52: 2580-2589 (1992); Xu et al. Int. J. Cancer 53: 401-408 (1993); documento WO94/00136; Kasprzyk et al. Cancer Research 52: 2771-2776 (1992); Hancock et al. (1991) Cancer Res. 51: 4575-4580; Shawver et al. (1994) Cancer Res. 54: 1367-1373; Arteaga et al. (1994) Cancer Res. 54: 3758-3765; Harwerth et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 15160-15167; Patente de Estados Unidos Nº 5783186; y Klapper et al. (1997) Oncogene 14: 2099-2109.

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

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

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

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

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

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

### 3. Sumario de la invención

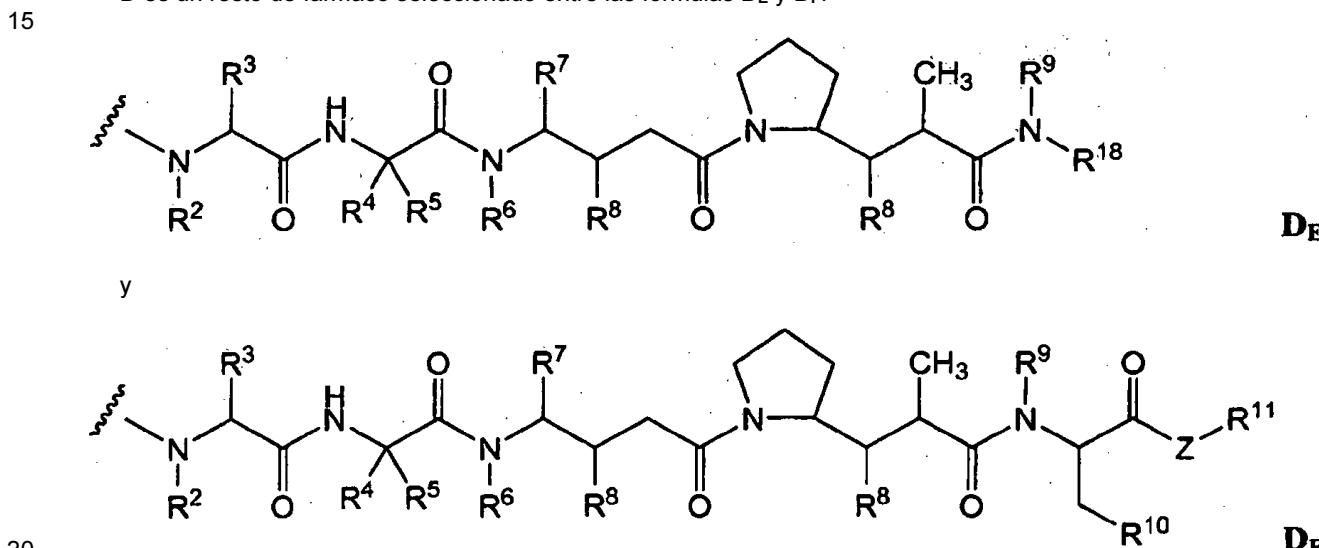
La presente invención proporciona un compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo unido covalentemente a uno o más restos de fármacos, teniendo el compuesto la fórmula Ic:

Ab-(A<sub>a</sub>-W<sub>w</sub>-Y<sub>y</sub>-D)<sub>p</sub>

Ic

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

- 5 Ab es un anticuerpo que se une a HER2;  
 A es una unidad Bastidor,  
 a es 0 o 1,  
 cada W es independientemente una unidad de aminoácido,  
 w es un número entero que varía de 0 a 12,  
 10 Y es una unidad espaciadora, e  
 y es 0, 1 o 2,  
 en la que  
 p varía de 1 a 20, y  
 D es un resto de fármaco seleccionado entre las fórmulas D<sub>E</sub> y D<sub>F</sub>:



en las que la línea ondulada de D<sub>E</sub> y D<sub>F</sub> indican el sitio de unión covalente a A, W o Y e independientemente en cada localización:

- 25 R<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);  
 R<sup>4</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);  
 30 R<sup>5</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y metilo;  
 o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> conjuntamente forman un anillo carbocíclico que tiene la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>- en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre el grupo que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6;  
 R<sup>6</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 35 R<sup>7</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);  
 cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);  
 R<sup>9</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 40 R<sup>10</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en arilo y heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>;  
 Z es O, S, NH o NR<sup>12</sup>, en el que R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 R<sup>11</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, arilo, heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup>, y -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>;  
 m es un número entero que varía entre 1-1000;  
 45 R<sup>13</sup> es alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>;  
 R<sup>14</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 cada aparición de R<sup>15</sup> es independientemente H, COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 50 cada aparición de R<sup>16</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH;  
 R<sup>18</sup> se selecciona entre -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-arilo, -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), y -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); y  
 n es un número entero que varía de 0 a 6.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco tal como se ha definido anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

- 5 También se proporciona un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco tal como se ha definido anteriormente para su uso en el tratamiento de un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de estómago, cáncer de endometrio, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer de próstata y cáncer de vejiga.
- 10 También se proporciona un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco tal como se ha definido anteriormente para su uso en combinación con na cantidad eficaz de un agente adicional seleccionado entre el grupo que consiste en un agente anticáncer, un agente inmunosupresor y un agente antiinfeccioso para su uso en el tratamiento de un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de endometrio, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer de próstata y cáncer de vejiga.
- 15 También se proporciona el uso de un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco tal como se ha definido anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de endometrio, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer de próstata o cáncer de vejiga.
- 20 También se proporciona el uso de un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco tal como se ha definido anteriormente en la fabricación de un medicamento para su uso en combinación con una cantidad eficaz de un agente adicional seleccionado entre el grupo que consiste en un agente anticáncer, un agente inmunosupresor y un agente antiinfeccioso para el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de estómago, cáncer de endometrio, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer de próstata o cáncer de vejiga.
- 25 También se proporciona el uso de un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco tal como se ha definido anteriormente en la fabricación de un medicamento para su uso en combinación con una cantidad eficaz de un agente adicional seleccionado entre el grupo que consiste en un agente anticáncer, un agente inmunosupresor y un agente antiinfeccioso para el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de estómago, cáncer de endometrio, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer de próstata o cáncer de vejiga.

### 30 Breve descripción de los dibujos

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

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

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

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

Las Figuras 5a y 5b muestran la actividad *in vitro* de conjugados de cBR96-anticuerpo-fármaco frente a líneas celulares Le<sup>y+</sup>.

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

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

50 La Figura 8 muestra un ensayo de proliferación celular, *in vitro* con células BT-474 tratadas con ADC: -●- Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab, -○-Trastuzumab-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab, y -Δ- Trastuzumab-MC-MMAF, 4,8 MMAF/Ab.

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

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

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

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

65 La Figura 13 muestra el cambio del volumen tumoral medio con el tiempo en ratones atípicos desnudos con aloinjertos de tumor de Mama MMTV-HER2 Fo5 dosificados el Día 0 con Vehículo, Trastuzumab-MC-vc-PAB-

MMAE ( $1250 \mu\text{g}/\text{m}^2$ ) y Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF ( $555 \mu\text{g}/\text{m}^2$ ). (H = Trastuzumab).

La Figura 14 muestra el cambio del volumen tumoral medio con el tiempo en ratones atípicos desnudos con aloinjertos de tumor de Mama MMTV-HER2 Fo5 dosificados el Día 0 con  $10 \text{ mg/kg}$  ( $660 \mu\text{g}/\text{m}^2$ ) de Trastuzumab-MC-MMAE y  $1250 \mu\text{g}/\text{m}^2$  de Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF.

5 La Figura 15 muestra el cambio del volumen tumoral medio con el tiempo en ratones atípicos desnudos con aloinjertos de tumor de Mama MMTV-HER2 Fo5 dosificados el Día 0 con Vehículo y  $650 \mu\text{g}/\text{m}^2$  de trastuzumab-MC-MMAF.

10 La Figura 16 muestra el cambio del volumen tumoral medio con el tiempo en ratones atípicos desnudos con aloinjertos de tumor de Mama MMTV-HER2 Fo5 dosificados el Día 0 con Vehículo y  $350 \mu\text{g}/\text{m}^2$  de cuatro conjugados de trastuzumab-MC-MMAF cuando la relación de MMAF/trastuzumab (H) es 2, 4, 5,9 y 6.

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

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

25 La Figura 19 muestra el Cambio medio en el grupo, con barras de error, en pesos corporales de rata Sprague Dawley (Media  $\pm$  DT) después de la administración de trastuzumab (H)-MC-MMAF a dosis de  $2105$ ,  $3158$ , y  $4210 \mu\text{g}/\text{m}^2$ . El conector MC se une a través de una cisteína de trastuzumab para cada conjugado.

#### 4. Descripción detallada de las realizaciones a modo de ejemplo

##### 4.1 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

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

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

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

40 Cada anticuerpo tiene principalmente dos regiones: una región variable y una región constante. La región variable, situada en los extremos de los brazos de la Y, se une a e interactúa con el antígeno diana. Esta región variable incluye una región de determinación de la complementariedad (CDR) que reconoce y se une a un sitio de unión específico en un antígeno en particular. La región constante, situada en la cola de la Y, es reconocida por e interactúa con el sistema inmune (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immuno Biology, 5<sup>a</sup> Ed., Garland Publishing, Nueva York). Un antígeno diana generalmente tiene numerosos sitios de unión, también denominados epítopos, reconocidos por las CDR en múltiples 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.

50 El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, también se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud total o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud total, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión antígenos que se une de forma inmunoespecífica a un antígeno de una diana de interés o parte de la misma, incluyendo dichas dianas pero no limitadas a, célula o células cancerosas que producen anticuerpos autoinmunes asociados con una enfermedad autoinmune. La inmunoglobulina que se desvela en el presente documento puede ser de cualquier tipo (*por ejemplo*, IgG, IgE, IgM, IgD, e IgA), clase (*por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas se pueden derivar de cualquier especie. En un aspecto, sin embargo, la inmunoglobulina es de origen humano, murino, o de conejo. En otro aspecto, los anticuerpos son anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, humanos, humanizados o químéricos, anticuerpos de una sola cadena, Fv, fragmentos

55 de Fab, fragmentos de F(ab'), fragmentos de F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos producidos con una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), CDR, y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores que se unen de forma inmunoespecífica a antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos.

60 La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos básicamente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales

que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos frente a un solo sitio antigenico. Además, al contrario que las preparaciones de anticuerpo políclonal que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a determinantes diferentes (epítopos), capa anticuerpo monoclonal se dirige

- 5 frente a un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se pueden sintetizar sin ser contaminados por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo tal como si se obtuviera a partir de una población de anticuerpos básicamente homogéneos, y no se debe interpretar como que se necesite la producción del anticuerpo mediante cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención se  
10 pueden preparar con el método del hibridoma descrito primero por Kohler et al. (1975) Nature 256: 495, o se pueden preparar con métodos de ADN recombinante (véase, Patente de Estados Unidos Nº 4816567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de fagotecas de anticuerpos usando las técnicas que se describen, por ejemplo, en Clackson et al. (1991) Nature, 352: 624-628 y Marks et al. (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597.

- 15 En el presente documento, los anticuerpos monoclonales incluyen específicamente anticuerpos "químéricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos  
20 de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos Nº 4816567; y Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855).

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

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

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

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

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

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

65 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, se pueden asignar anticuerpos intactos a diferentes "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE,

IgG, e IgM, y varias de éstas se pueden dividir adicionalmente en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , respectivamente. Se conocen bien estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas.

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

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

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

35 "Heregulina" (HRG) se refiere a un polipéptido codificado por el producto genético de heregulina tal como se desvela en la Patente de Estados Unidos Nº 5641869 o en Marchionni et al., Nature, 362: 312-318 (1993). Ejemplos de heregulinas incluyen heregulina- $\alpha$ , heregulina- $\beta$ 1, heregulina- $\beta$ 2 y heregulina- $\beta$ 3 (Holmes et al., Science, 256: 1205-1210 (1992); y Patente de Estados Unidos Nº 5641869); factor de diferenciación neu (NDF) (Peles et al., Cell 69: 205-216 (1992)); actividad de inducción de receptores de acetilcolina (ARIA) (Falls et al. (1993) Cell 72: 801-815); factores de crecimiento glial (GGF) (Marchionni et al., Nature, 362: 312-318 (1993)); factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF) (Ho et al., J. Biol. Chem., 270: 14523-14532 (1995));  $\gamma$ -heregulina (Schaefer et al., Oncogene, 15: 1385-1394 (1997)). El término incluye fragmentos biológicamente activos y/o variantes de secuencias de aminoácidos de un polipéptido HRG de secuencia nativa, tal como un fragmento de dominio de tipo EGF de los mismos (por ejemplo, HRG $\beta$ 1177-244).

40 45 El "hetero-olígomero de ErbB" es un olígomero asociado de forma no covalente que comprende al menos dos receptores ErbB diferentes. Un "dímero de ErbB" es un olígomero asociado de forma no covalente que comprende dos receptores ErbB diferentes. Dichos complejos se pueden formar cuando una célula que expresa dos o más receptores ErbB se expone a un ligando ErbB. Oligómeros de ErbB, tales como dímeros de ErbB, se pueden aislar por inmunoprecipitación y analizar por SDS-PAGE tal como se describe, por ejemplo, en Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269 (20): 14661-14665 (1994). Ejemplos de dichos hetero-olímeros de ErbB incluyen complejos EGFR-ErbB2 (también denominado HER1/HER2), ErbB2-ErbB3 (HER2/HER3) y ErbB3-ErbB4 (HER3/HER4). Además, el ErbB hetero-olígomero puede comprender dos o más receptores ErbB2 combinados con un receptor ErbB diferente, tal como ErbB3, ErbB4 o EGFR (ErbB1). Otras proteínas, tales como una subunidad receptora de citoquinas (por ejemplo, gp130) se pueden incluir en el hetero-olígomero.

50 55 Un polipéptido de "secuencia nativa" es uno que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido, por ejemplo, receptor de antígeno asociado a tumores, procedente de la naturaleza. Dichos polipéptidos de secuencia narrativa se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir por medios recombinantes o sintéticos. Por lo tanto, un polipéptido de secuencia narrativa puede tener la secuencia de aminoácidos de polipéptido humano de origen natural, polipéptido de murino, o polipéptido a partir de cualquier otra especie de mamífero.

60 65 La expresión "variante de secuencia de aminoácidos" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren hasta cierto punto de un polipéptido de secuencia nativa. Habitualmente, las variantes de secuencias de aminoácidos poseerán al menos una homología de aproximadamente un 70 % con al menos un dominio de unión a receptores de un ligando nativo, o con al menos un dominio de unión ligandos de un receptor

nativo, tal como un antígeno asociado a tumores, y preferentemente, serán homólogos en al menos aproximadamente un 80 %, más preferentemente, al menos aproximadamente un 90 % con dichos dominios de unión a receptores o a ligandos. Las variaciones secuencias de aminoácidos poseen sustituciones, supresiones, y/o inserciones en determinadas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa.

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

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

Los términos "receptor Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferente es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gama) e incluye receptores de las subclases Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, y Fc $\gamma$ RIII, que incluyen variantes alélicas y formas empalmadas alternativamente de estos receptores. Los receptores Fc $\gamma$ RII incluyen Fc $\gamma$ RIIA (un "receptor de activación") y Fc $\gamma$ RIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares y difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de las mismas. El receptor de activación Fc $\gamma$ RIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptora (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor de inhibición Fc $\gamma$ RIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunoreceptora (ITIM) en su dominio citoplasmático. (Véase revisión M. in 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., Immunomethods, 4: 25-34 (1994); y de Haas et al., J. Lab. Clin. Med., 126: 330-41 (1995). Otros FcR, que incluyen los que se van a identificar en el futuro, están incluidos con el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternales al feto. (Guyer et al., J. Immunol., 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol., 24:249 (1994)).

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

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

La expresión "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende generalmente restos de aminoácidos de una "región de determinación de la complementariedad" o "CDR" (*por ejemplo*, los restos

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

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento de "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de unión a antígeno y que además es capaz de reticular antígenos.

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

El fragmento de Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos de Fab' de diferencia de los fragmentos de Fab mediante la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi del dominio CH1 de cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. El presente documento, Fab'-SH es la denominación para Fab' en la que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes soportan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> se producían originalmente como pares de fragmentos de Fab' que tienen cisternas bisagra entre ellos. Además, se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno o dos tipos claramente distintos, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), sobre la base de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

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

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

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

Anticuerpos anti-ErbB2 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) tal como se describe en la Tabla 3 de la Patente de Estados Unidos Nº 5821337 que se incorpora expresamente en el presente documento por referencia; 520C9

humanizado (documento WO 93/21319) y anticuerpos 2C4 humanizados tal como los que se describen a continuación en el presente documento.

- 5 Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros absolutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferentes, el anticuerpo estará purificado (1) hasta más de un 95 % en peso del anticuerpo tal como se determina con el método de Lowry, y lo más preferentemente más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencias de aminoácidos N-terminales o internos 10 mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes dado que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.
- 15 15 Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de intereses uno capaz de unirse a ese antígeno con una afinidad suficiente de modo que el anticuerpo es útil para dirigirse a una célula que expresa el antígeno.
- 20 Un anticuerpo que "induce apoptosis" es una que induce muerte celular programada tal como se determina mediante unión de anexina V, fragmentación del ADN, encogimiento celular, dilatación del retículo endoplasmático, fragmentación celular, y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). Las células 25 una célula tumoral, *por ejemplo*, una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, pancreática o de vejiga. Diversos métodos están disponibles para evaluar los sucesos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de la fosfatidil serina (PS) se puede medir mediante unión de anexina; la fragmentación del ADN se puede evaluar a través de marcado del ADN; y la condensación nuclear/cromatina junto con la fragmentación del ADN se puede evaluar mediante cualquier aumento de células hipodiploides.
- 30 30 Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento de la presente invención. Éste incluye trastornos o enfermedades, crónicos y agudos, que incluyen las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en el presente documento incluyen tumores benignos y malignos; leucemia y neoplasias linfoides, en particular cáncer mama, ovarios, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, pancreático, cáncer de próstata o vejiga; trastornos neuronales, 35 gliales, astrocíticos, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocoélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.
- 40 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz el fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (*es decir*, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (*es decir*, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) metástasis tumorales; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en la que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o eliminación de las células cancerosas existentes, éste puede ser citostático y/o citotóxico. Para el tratamiento del cáncer, la eficacia, por ejemplo, se puede medir por evaluación del tiempo de progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinar la velocidad de respuesta (RR).
- 45 La expresión "cantidad básica" se refiere a una mayoría, *es decir* > 50 % de una población, de una colección o de una muestra.
- 50 50 La expresión "metabolito intracelular" se refiere a un compuesto que resulta de un proceso metabólico o de una reacción dentro de una célula en un conjugado de fármaco de anticuerpo (ADC). El proceso metabólico o la reacción de ser un proceso enzimático tal como escisión proteolítica y un conector étílico del ADC, o hidrólisis de un grupo funcional tal como una hidrazone, éster, o amida. Los metabolitos intracelulares incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y fármacos libres que han experimentado escisión intracelular después de entrada, difusión, absorción o 55 transporte en una célula.
- 60 Las expresiones "escindido intercelularmente" y "escisión intracelular" se refieren a un proceso metabólico o reacción dentro de la célula en un Conjugado de Fármaco-Ligando, un Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando, un conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC) o similares a través de los cuales la unión covalente, *por ejemplo*, el conector, entre el resto de fármaco (D) y el anticuerpo (Ab) se rompe, dando como resultado el fármaco libre disociado a partir del anticuerpo dentro de la célula. Los restos escindidos del Conjugado de Fármaco-Ligando, un Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando o ADC son por lo tanto metabolitos intracelulares.
- 65 65 El término "biodisponibilidad" se refiere a la disponibilidad sistémica (*es decir*, niveles en sangre/plasma) de una cantidad cada de fármaco administrada a un paciente. La biodisponibilidad es un término absoluto que indica la medida tanto del tiempo (velocidad) como de la cantidad total (alcance) de fármaco que alcanza la circulación

general de una forma de fármaco administrada.

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

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que por lo general se caracteriza por un crecimiento celular sin regular. Un "tumor" comprender una o mas células cancerosas.

Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o neoplasias linfoides. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (*por ejemplo*, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas ("NSCLC"), adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello del útero, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o de útero, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma del pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

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

Un cáncer "caracterizado por una activación excesiva" de un receptor ErbB2 es uno en el que la extensión de la activación del receptor ErbB2 en células cancerosas supera significativamente el nivel de activación de ese receptor en células no cancerosas del mismo tipo de tejido. Dicha activación excesiva puede dar como resultado una sobreexpresión del receptor ErbB2 y/o niveles superiores a los normales de un ligando ErbB2 disponible para la activación del receptor ErbB2 en las células cancerosas. Dicha activación excesiva puede provocar y/o ser provocada por un estado maligno de una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el cáncer estará sometido a un ensayo de diagnóstico o de pronóstico para determinar si se está produciendo una amplificación y/o sobreexpresión de un receptor ErbB2 lo que da como resultado dicha activación excesiva del receptor ErbB2. Como alternativa, o adicionalmente, el cáncer se puede someter a un ensayo de diagnóstico o de pronóstico para determinar si se está produciendo una amplificación y/o sobreexpresión de un ligando ErbB2 en el cáncer que se atribuye a una activación excesiva del receptor. En un subconjunto de dichos cánceres, una activación excesiva del receptor puede dar como resultado una ruta de estimulación autocrina.

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

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

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

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

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

10 Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes de alquilación tales como tiotepa y ciclosfosfamida CYTOXAN®; alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina; TLK 286 (TELCYTA™); acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (que incluye el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; callistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptofincinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (que incluyen los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobia; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozoticina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; bisfosfonatos, tales como clodronato; antibióticos tales como los antibióticos de enedina (*por ejemplo*, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)) y antraciclinas tales como annamicina, AD 32, alcarubicina, daunorubicina, dextrazoxano, DX-52-1, epirubicina, GPX-100, idarubicina, KRN5500, menogarilo, 20 dinemicina, que incluye dinemicina A, una esperamicina, cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos relacionados de antibiótico de enedina cromoproteínas, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (que incluye morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, liposomal doxorubicina, y desoxidoxorrubicina), esorubicin, marcelomicina, mitomicinas tales 25 como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodotrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, y zorrubicina; análogos de ácido fólico tales como denopterina, pteropterina, y trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, y tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azaauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, y floxuridina; andrógenos tales como 30 calusterona, propionato de dromoestanolona, epitiostanol, mepitiostano, y testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, y trilostano; reforzadores de ácido fólico tales como ácido folínico (leucovorina); aceglatona; agentes antineoplásicos de antifolato tales como ALIMTA®, LY231514 pemetrexed, inhibidores de la dihidrofolato reductasa tales como metotrexato, antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo (5-FU) y sus profármacos tales como UFT, S-1 y capecitabina, y inhibidores de la timidilato sintasa e inhibidores de la glicinamida 35 ribonucleótido formiltransferasa tales como raltitrexed (TOMUDEX™, TDX); inhibidores de la dihidropirimidina deshidrogenasa tales como eniluracilo; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptino; una epotilona; etoglúcidio; nitrato de galio; hidroxuirea; lentinano; ionidaina; maitansinoides tales como maitansíne y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; molidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazina; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides y taxano, *por ejemplo*, TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), 40 ABRAXANE™ sin Cremophor, formulación de nanopartículas modificadas por ingeniería con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois), y TAXOTERE® doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopericina; platino; análogos de platino o análogos a base de platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); alcaloides de la vinca; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatraxato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; RFS 2000 inhibidor de la topoisomerasa; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los mencionados anteriormente; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) 45 combinado con 5-FU y leucovorina.

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

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

Un "inhibidor de la tirosina quinasa" es una molécula que inhibe hasta cierto punto la actividad de tirosina quinasa de una tirosina quinasa como un receptor ErbB. Ejemplos de dichos inhibidores incluyen los fármacos dirigidos a EGFR indicados en el párrafo precedente así como quinazolininas tales como PD 153035, 4-(3-cloroanilino) quinazolina, piridopirimidinas, pirimidopirimidinas, pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706, y pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidinas, curcumina (diferuloíl metano, 4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalamida), tifostinas que contienen restos de nitrotiopheno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas antisentido (*por ejemplo*, las que se unen a ácidos nucleicos que codifican ErbB); quinoxalinas (Patente de Estados Unidos Nº 5.804.396); trifostinas (Patente de Estados Unidos Nº 5804396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores de pan-ErbB tales como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de Imatinib (Gleevac; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxanib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); o tal como se describe en cualquier de las siguientes publicaciones de patente: Patente de Estados Unidos Nº 5804396; documento WO 99/09016 (American Cyanamid); documento WO 98/43960 (American Cyanamid); documento WO 97/38983 (Warner Lambert); documento WO 99/06378 (Warner Lambert); documento WO 99/06396 (Warner Lambert); documento WO 96/30347 (Pfizer, Inc); documento WO 96/33978 (Zeneca); documento WO 96/3397 (Zeneca); y documento WO 96/33980 (Zeneca).

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

El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por la población celular que actúan sobre otras células como mediadores intercelulares. Ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas politécnicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas de crecimiento tales como hormona de crecimiento humano, hormona de crecimiento humano N-metionilo, y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroides; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteicas tales como hormona de estimulante de folículos (FSH), hormona estimulante de tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor- $\alpha$  y - $\beta$  de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento de transformación (TGF) tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; factor de crecimiento de tipo insulinílico I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón- $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\gamma$ ; factores de estimulación de colonias (CSF) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (IL) tales como IL-

1, IL-1 $\alpha$ , 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 tal como TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ ; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando kit (KL). Tal como se usa en el presente documento, el término citoquina incluye proteínas a partir de fuentes naturales o a partir de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

- 5 El término "profármaco" tal como se usa en la presente solicitud se refiere a un precursor o forma de derivados de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco precursor y destapar de ser activada o convertida de forma enzimática o hidrolítica en la forma precursora más activa. véanse, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 10 14, páginas 375-382, 615º Meeting Belfast (1986) y Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), páginas 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen  $\beta$ -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco sin citotóxicos más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivatizar en una forma de profármaco para uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los agentes quimioterapéuticos que se han descrito anteriormente.
- 10 20 Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para administrar un fármaco (tal como se incluyen los anticuerpos anti-CD30, CD40, CD70 o Lewis Y y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico) a un mamífero. Los componentes del liposoma se colocan normalmente en una formación de bicapa, similar a la colocación lipídica de membranas biológicas. El término "prospecto" se usa para hacer referencia a instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de 15 25 productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.
- 20 30 Una molécula "aislada" de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa a partir de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en la fuente natural de ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula aislada de ácido nucleico es distinta en la forma o configuración en la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas aisladas de ácido nucleico se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe en células naturales. Sin embargo, una molécula aislada de ácido nucleico incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el anticuerpo cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico esta en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.
- 35 40 La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación unida operativamente en un organismo huésped en particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosomas. Se sabe que las células eucariotas usan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.
- 45 50 Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una secuencia previa o directora de secreción está unido operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como una proteína previa que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está unido operativamente a una secuencia de codificación si está colocado de modo que se facilite la traducción. Generalmente, "unido operativamente" Server las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas, y, en el caso de una directora de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La unión se puede realizar por ligadura en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos se pueden usar de acuerdo con la práctica convencional.
- 55 60 Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas las denominaciones incluyen progenie. Por lo tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y cultivos derivados de las mismas sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie pues de no ser exactamente idéntica en el contenido del ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica tal como se identifica sistemáticamente en la célula transformada originalmente. Siempre que se pretenden denominaciones distintas, éstas serán evidentes a partir del contexto.
- 65 En el presente documento, una "enfermedad autoinmune" es una enfermedad o trastorno que se deriva de y que se dirige frente a tejidos propios de un individuo o un cosegregado o manifestación de la misma o afeción resultante de la misma. Ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunes incluyen, pero no se limitan a artritis (artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriática, y espondilitis anquilosante), psoriasis,

dermatitis que incluye dermatitis atópica; urticaria idiopática crónica, que incluye urticaria autoinmune crónica, polimiositis/dermatomiositis, necrólisis epidémica tóxica, esclerodermia sistémica y esclerosis, respuestas asociadas con enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), e IBD con cosegregado de pioderma gangrenoso, eritema nodoso, colangitis esclerosante primaria, y/o epiescleritis), síndrome de dificultad respiratoria, que incluye síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS), meningitis, enfermedades mediadas por IgE tales como anafilaxis y rinitis alérgica, encefalitis tales como encefalitis de Rasmussen, uveítis, colitis tal como colitis microscópica y colitis colágena, glomerulonefritis (GN) tal como GN membranosa, GN membranosa idiopática, GN membranosa proliferativa (MPGN), que incluye Tipo I y Tipo II, y GN rápidamente progresiva, afecciones alérgicas, eccema, asma, afecciones que implican infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas, aterosclerosis, miocarditis autoinmune, deficiencia de adhesión de leucocitos, lupus sistémico eritematoso (SLE) tal como SLE cutáneo, lupus (que incluye nefritis, cerebritis, pediátrica, no renal, discoide, alopecia), diabetes de inicio juvenil, esclerosis múltiple (MS) tal como MS espino-óptica, encefalomielitis alérgica, respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citoquinas y por linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis que incluye granulomatosis de Wegener, agranolocitosis, vasculitis (incluyendo vasculitis de Vasos Grandes (que incluye Polimialgia Reumática y Arteritis de Células Gigantes (de Takayasu)), vasculitis de Vasos Medios (que incluye Enfermedad de Kawasaki y Poliarteritis Nodosa), vasculitis del SCN, y vasculitis asociada a ANCA, tales como vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS)), anemia aplásica, anemia positiva de Coombs, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica inmune que incluye anemia hemolítica autoinmune (AIHA), anemia perniciosa, aplasia pura de glóbulos rojos (PRCA), deficiencia del Factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmune, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapédesis de leucocitos, trastornos inflamatorios del SCN, síndrome de disfunción orgánica múltiple, miastenia gravis, enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípido, neuritis alérgica, enfermedad de Bechet, síndrome de Castleman, Síndrome de Goodpasture, Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjorgen, síndrome de Stevens-Johnson, rechazo al transplante de órganos sólidos (que incluye tratamiento previo para títulos de anticuerpos de panel reactivo alto, depósito de IgA en tejidos, y rechazo que surge del transplante renal, transplante de hígado, trasplante de intestino, trasplante de corazón, etc.), enfermedad de injerto frente a huésped (GVHD), penfigoide bulloso, pénfigo (que incluye pénfigo vulgaris, foliáceo, y penfigoide de la membrana mucosa), poliendoocrinopatías autoinmunes, enfermedad de Reiter, síndrome del hombre rígido, nefritis por complejos inmunes, polineuropatías de IgM o neuropatía mediada por IgM, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia (como la desarrollada por pacientes con infarto de miocardio, por ejemplo), que incluye trombocitopenia autoinmune, enfermedad autoinmune de los testículos y ovarios que incluye orquitis y ooforitis, hipotiroidismo primario; enfermedad endocrina autoinmunes que incluye tiroiditis autoinmune, tiroiditis crónica (Tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares autoinmunes (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), diabetes de Tipo I también denominada diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), que incluye IDDM pediátrica, y síndrome de Sheehan; hepatitis autoinmune, neumonitis intersticial Linfoide (HIV), bronquiolitis obliterante (no trasplante) frente a NSIP, Síndrome de Guillain-Barré, Enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), cirrosis biliar primaria, esprue celíaco (enteropatía por gluten), esprue refractario con dermatitis herpetiforme cosegregada, crioglobulinemia, esclerosis lateral amiotrófica (ALS; enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad arterial coronaria, enfermedad autoinmune del oído interno (AIED), pérdida de audición autoinmune, síndrome de opsoclono mioclonia (OMS), policondritis tal como policondritis refractaria, proteinosis alveolar pulmonar, amiloidosis, hepatitis de células gigantes, escleritis, gammopathía monoclonal de significado incierto/desconocido (MGUS), neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, canalopatías tales como epilepsia, migraña, arritmia, trastornos musculares, sordera, severa, parálisis periódica, y canalopatías del SCN; autismo, miopatía inflamatoria, y glomeruloesclerosis segmentaria focal (FSGS).

"Alquilo" es hidrocarburo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> que contiene átomos de carbono, normales, secundarios, terciarios o cíclicos. Son ejemplos metilo (Me, -CH<sub>3</sub>), etilo (Et, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, -CH(CH<sub>3</sub>) CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1-pentilo (n-pentilo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-pentilo (-CH(CH<sub>3</sub>) CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-pentilo (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-metil-2-butilo (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-metil-2-butilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3-metil-1-butilo (-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1-hexilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-hexilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-hexilo (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-metil-2-pentilo (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-metil-2-pentilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4-metil-2-pentilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3-metil-3-pentilo (-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-metil-3-pentilo (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,3-dimetil-2-butilo (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,3-dimetil-2-butilo (-CH(CH<sub>3</sub>)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

"Alquenilo" es hidrocarburo C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub> que contiene átomos de carbono, normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir un doble enlace sp<sup>2</sup>, carbon-carbono. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: etileno o vinilo (-CH=CH<sub>2</sub>), alilo (-CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), ciclopentenilo (-C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>), y 5-hexenilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>).

"Alquinilo" es hidrocarburo C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub> que contiene átomos de carbono, normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir un triple enlace sp, carbon-carbono. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: acetilénico (-C≡CH) y propargilo (-CH<sub>2</sub>C=CH).

"Alquieno" se refiere un radical hidrocarburo saturado, de cadena ramificada o lineal o cílico de 1-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros de radical monovalente que se obtiene por la retirada de dos átomos de hidrógeno a partir del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alcano precursor. Los radicales alquieno habituales incluyen, pero no se limitan a: metileno (-CH<sub>2</sub>-), 1,2-etilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,3-propilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,4-butilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), y similares.

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

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

"Arilo" significa un radical hidrocarburo aromático monovalente de 6-20 átomos de carbono que se obtiene por la retirada de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillo aromático precursor.

Algunos grupos arilo se representan en las estructuras a modo de ejemplo como "Ar". Los grupos arilo habituales incluyen, pero no se limitan a, radicales derivados de benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo, y similares.

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

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

"Alquilo sustituido", "arilo sustituido", y "arilalquilo sustituido" se refieren a alquilo, arilo, y arilalquilo respectivamente, en el que uno o más átomos de hidrógeno cada uno está reemplazado independientemente con un sustituyente. Los sustituyentes habituales incluyen, pero no se limitan a, -X, -R, -O<sup>-</sup>, -OR, -SR, -S<sup>-</sup>, -NR<sub>2</sub>, -NR<sub>3</sub>, =NR, -CX<sub>3</sub>, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO<sub>2</sub>, =N<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, NC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -S(=O)<sub>2</sub>R, -OS(=O)<sub>2</sub>OR, -S(=O)<sub>2</sub>NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)<sub>2</sub>, -P(=O)(OR)<sub>2</sub>, -PO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO<sub>2</sub>R, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -C(=S)NR<sub>2</sub>, -C(=NR)NR<sub>2</sub>, en los que cada X es independientemente un halógeno: F, Cl, Br, o I; y cada R es independientemente -H, alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>, heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>, grupo protector o resto de profármaco. Los grupos alquieno, alquenileno, y alquinileno tal como se ha descrito anteriormente también pueden estar sustituidos de forma similar.

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

Se describen heterociclos en Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, Nueva York, 1968), particularmente en los Capítulos 1, 3, 4, 6, 7, y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 hasta la actualidad), en particular los Volúmenes 13, 14, 16, 19, y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82: 5566.

Ejemplos de heterociclos incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo oxidado con azufre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzoimida-zolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranoilo, bis-

tetrahidrofuranoilo, tetrahidropiranilo, bis-tetrahidropiranilo, tetrahydroquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, decahydroquinolinilo, octahydroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tianthrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizinilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizinilo, ftalazinilo, naftiridinilo, 5 quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, 4aH-carbazolilo, carbazolilo,  $\beta$ -carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, benzoisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo, e isatinoilo.

- 10 A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos unidos a carbono están unidos en la posición 2, 3, 4, 5 o 6 de una piridina, en la posición 3, 4, 5 o 6 de una piridazina, en la posición 2, 4, 5 o 6 de una pirimidina, en la posición 2, 3, 5 o 6 de un pirazina, en la posición 2, 3, 4 o 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, en la posición 2, 4 o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, en la posición 3, 4 o 5 de un isoxazol, pirazol, o isotiazol, en la posición 2 o 3 de una aziridina, en la posición 2, 3 o 4 de una azetidina, en la posición 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 de una quinolina o en la posición 1, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 de una isoquinolina. Además de forma más habitual, los heterociclos unidos a carbono incluyen 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 5-piridilo, 6-piridilo, 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 5-piridazinilo, 6-piridazinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 6-pirimidinilo, 2-pirazinilo, 3-pirazinilo, 5-pirazinilo, 6-pirazinilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, o 5-tiazolilo.
- 15 20 A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos unidos a nitrógeno están unidos en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, en la posición 2 de un isoindol, o isoindolina, en la posición 4 de una morfolina, y que la posición 9 de un carbazol, o  $\beta$ -carbolina. Still Además de forma más habitual, los heterociclos unidos a nitrógeno incluyen 1-aziridilo, 1-azetedilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo, y 1-piperidinilo.

- 25 "Carbociclo" se refiere a un anillo saturado por insaturado que tiene de 3 a 7 átomos de carbono como un monociclo o de 7 a 12 átomos de carbono como un biciclo. Dos carbociclos monocíclicos tienen de 3 a 6 átomos en el anillo, además de forma más habitual 5 o 6 átomos en el anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen de 7 a 12 átomos en el anillo, *por ejemplo*, colocados con un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], o 9 o 10 átomos en el anillo colocados con un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. Ejemplos carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclobexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, cicloheptilo, y ciclooctilo.
- 30 35 "Conector", "Unidad Conectora", o "conectar" se refiere un resto químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo a un resto de fármaco. En diversas realizaciones, conectó se especifica como LU. Los conectores incluyen un radical divalente tal como un alquildiilo, un arildiilo, un heteroarildiilo, restos tales como: -(CR<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O(CR<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, unidades repetición de alquiloglioxi (*por ejemplo*, polietilenoxi, PEG, polimetilenoxi) y alquilamino (*por ejemplo*, polietilenamino, Jeffamina™); y éster diácido y amidas que incluyen succinato, succinamida, diglicolato, malonato, y caproamida.

- 40 45 El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superposición del compañero en la imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que se superponen en su compañero en la imagen especular.
- 50 55 El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen constitución química idéntica, pero que difieren con respecto a la colocación de los átomos o grupos en el espacio.
- "Diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen propiedades físicas diferentes, *por ejemplo*, puntos de fusión, puntos de ebullición, sociedades espectrales, de actividades. Las mezclas de diastereómeros se pueden separar con procedimientos analíticos de alta resolución tales como electroforesis y cromatografía.

- "Enantiómeros" se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí.
- Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en el presente documento por lo general siguen S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel, E. y Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, IncNueva York. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de girar el plano de luz polarizada en un plano. Al describir un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S, se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula alrededor de su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se usan para designar el signo de rotación de la luz polarizada en el plano por el compuesto, con (-) o l significando que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos excepto en que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también se puede denominar enantiómero, y una mezcla de dichos isómeros a menudo se denomina una mezcla de

enantiomérica. Una mezcla de enantiómeros a 50:50 se denomina una mezcla racémica o un racemato, que se puede producir cuando no se ha producido estereoselección ni estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Las expresiones "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovistas de actividad óptica.

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

10 "Arilo" se refiere a un grupo aromático carbocíclico. Ejemplos de grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo y antracenilo. Un grupo aromático carbocíclico o un grupo aromático heterocíclico pueden estar sin sustituir o sustituidos con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; en los que cada R' se selecciona independientemente entre H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo.

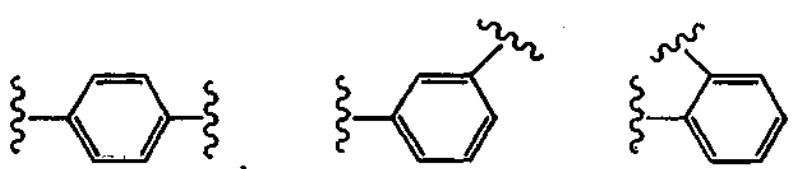
15 El término "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un hidrocarburo saturado o insaturado, de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 8 átomos de carbono. Grupos "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>" representativos incluyen, pero no se limitan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

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

40 Un "carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>" se refiere a un grupo carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> que se ha definido anteriormente en el que uno de los átomos de hidrógeno de los grupos carbociclo está reemplazado con un enlace.

45 Un "alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>" es un grupo hidrocarburo saturado, de cadena lineal de fórmula -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-10</sub>. Ejemplos de un alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> incluyen metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno y decaleno.

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



55 en las que el grupo fenilo puede estar sin sustituir o sustituido con hasta cuatro grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; en los que cada R' se selecciona independientemente entre H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo.

60 Un "heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>" se refiere a un carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> aromático o no aromático en el que de uno a cuatro de los átomos de carbono en el anillo están reemplazados independientemente con un heteroátomo del grupo que consiste en O, S y N. Los ejemplos representativos de un heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> incluyen, pero no se limitan a, benzofuranilo,

benzotiofeno, indolilo, benzopirazolilo, coumarinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo. Un heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> puede estar sin sustituir o sustituido con hasta siete grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O) R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub> - NHC(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N (R')<sub>2</sub> y -CN; en los que cada R' se selecciona independientemente entre H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo.

"Heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>" se refiere a un grupo heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> que se ha definido anteriormente en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo heterociclo está reemplazado con un enlace. Un heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> puede estar sin sustituir o sustituido con hasta seis grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub> - NHC(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; en los que cada R' se selecciona independientemente entre H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo.

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

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

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

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

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

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

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

60 En el presente documento se usan las siguientes abreviaturas y tienen las definiciones que se indican: AE es auristatina E, Boc es N-(t-butoxicarbonilo), cit es citrulina, dap es dolaproína, DCC es 1,3-diciclohexilcarbodiímidida, DCM es diclorometano, DEA es dietilamina, DEAD es dietilazodicarboxilato, DEPC es dietilfosforilcianidato, DIAD es diisopropilazodicarboxilato, DIEA es N,N-diisopropiletilamina, dil es dolaisoleucina, DMAP es 4-dimetilaminopiridina, DME es etilenglicol dimetil éter (o 1,2-dimetoxietano), DMF es N,N-dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfóxido, doe es dolafenina, dov es N,N-dimetilvalina, DTNB es ácido 5,5'-ditiosobis(2-nitrobenzoico), DTPA es ácido dietilentriaminopentaacético, DTT es ditiotreitol, EDCl es clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etylcarbodiímidida, EEDQ es 2-etoxy-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, ES-MS es espectrometría de masas por electronebulización, EtOAc es acetato de etilo, Fmoc es N-(9-fluorenilmetoxicarbonilo), gly es glicina, HATU es hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N',N'-tetrametiluronio, HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, HPLC es cromatografía líquida de

alta presión, ile es isoleucina, lys es lisina, MeCN ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) es acetonitrilo, MeOH es metanol, Mtr es 4-anisildifenilmetilo (o 4-metoxitritilo), nor es (1S, 2R)-(+)-norefedrina, PAB es p-aminobencilo, PBS es solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4), PEG es polietilenglicol, Ph es fenilo, Pnp es p-nitrofenilo, MC es 6-maleimidocaproilo, phe es L-fenilalanina, PyBrop es hexafluorofosfato de bromo *tris*-pirrolidino fosfonio, SEC es cromatografía de exclusión por tamaño, Su es succinimida, TBTU es tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N,N-tetrametiluronio, TFA es ácido trifluoroacético, TLC es cromatografía en capa fina, UV es ultravioleta, y val es valina.

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

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

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

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

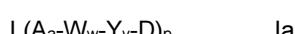
En el contexto de una enfermedad infecciosa, el término "que trata" incluye cualquiera o todos de: prevenir el crecimiento, multiplicación o replicación del agente patógeno que causa la enfermedad infecciosa y mejorar uno o más síntomas de una enfermedad infecciosa.

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

#### 4.2 Compuestos

##### 4.2.1 LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA (Ia)

En el presente documento se describen Conjugados Fármaco-Conector-Ligando que tienen la Fórmula Ia:



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo en la que,

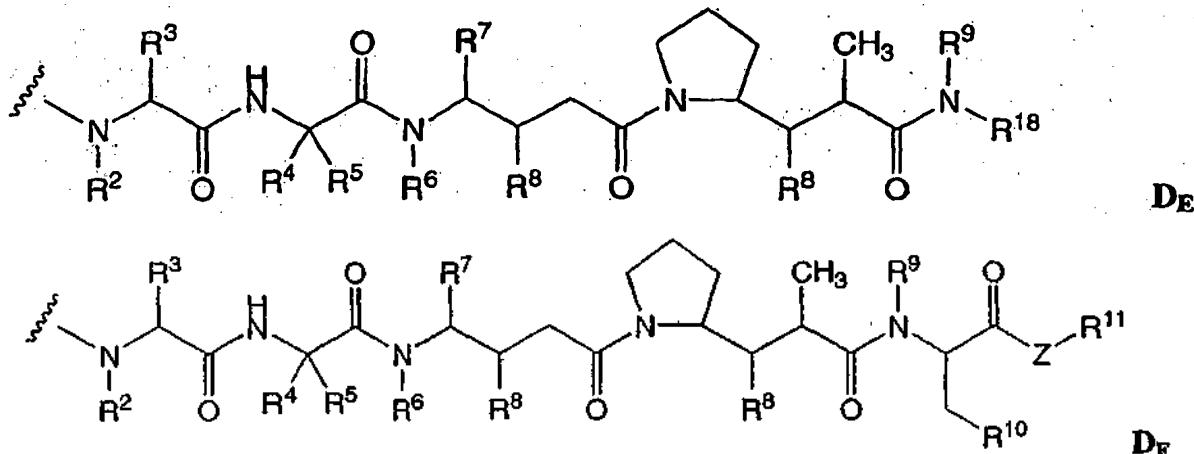
L- es una unidad Ligando;  
-A<sub>a</sub>-W<sub>w</sub>-Y<sub>y</sub>- es una unidad Conectora (LU), en la que la unidad Conectora incluye:

-A- es a unidad Bastidor,  
a es 0 o 1,  
cada -W- es independientemente una unidad Aminoácido,  
w es un número entero que varía de 0 a 12,

-Y- es una unidad Espaciadora, y  
y es 0, 1 o 2;

5 p varía de 1 a aproximadamente 20; y

-D es una unidad de Fármaco que tiene las Fórmulas D<sub>E</sub> y D<sub>F</sub>:



10 en las que en cada ubicación:

R<sup>2</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>3</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

15 R<sup>4</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>5</sup> se selecciona entre H y metilo;

o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> conjuntamente forman un anillo carbocíclico y tiene la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>- en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6;

20 R<sup>6</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>7</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>9</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

25 R<sup>10</sup> se selecciona entre arilo y heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>;

Z es O, S, NH o NR<sup>12</sup>, en el que R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

30 R<sup>11</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, arilo, heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup>, y -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>;  
m es un número entero que varía entre 1-1000;

R<sup>13</sup> es alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>14</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

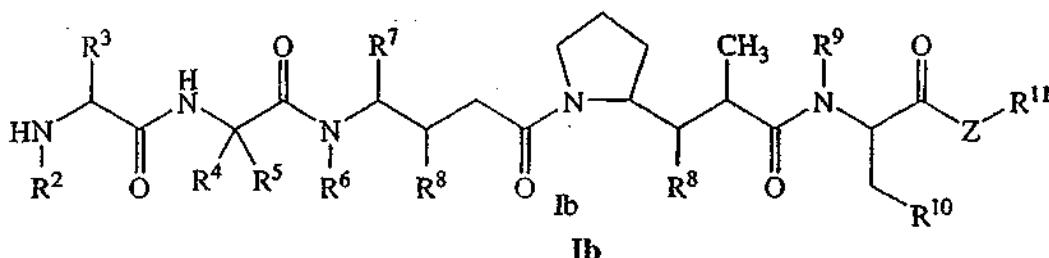
cada aparición de R<sup>15</sup> es independientemente H, COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

cada aparición de R<sup>16</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH;

35 R<sup>18</sup> se selecciona entre -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-arilo, -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), y -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); y

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

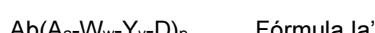
40 En el presente documento también se describen Compuestos de Fármaco que tienen la Fórmula Ib:



o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que:

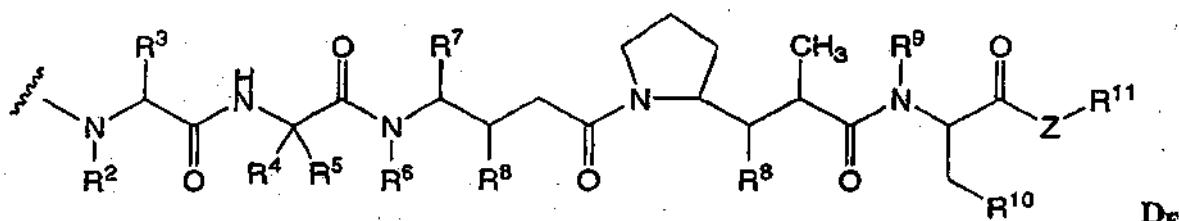
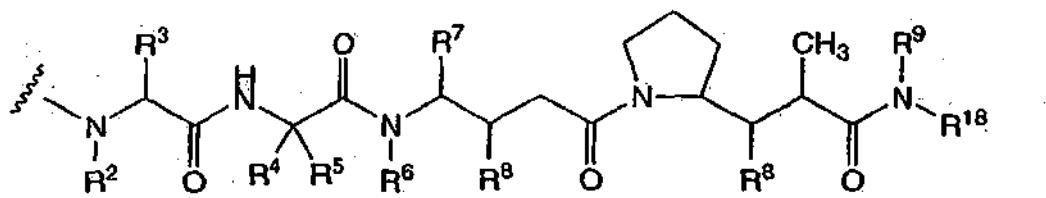
- R<sup>2</sup> se selecciona entre hidrógeno y -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;
- R<sup>3</sup> se selecciona entre hidrógeno, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, -alquil-arilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);
- R<sup>4</sup> se selecciona entre hidrógeno, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, -alquil-arilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>) en el que R<sup>5</sup> se selecciona entre -H y -metilo;
- R<sup>6</sup> y R<sup>5</sup> conjuntamente, tienen la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub> en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre -H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6 y forman un anillo con el átomo de carbono al que están unidos;
- R<sup>6</sup> se selecciona entre H y -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;
- R<sup>7</sup> se selecciona entre H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, -alquil-arilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);
- cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre H, -OH, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);
- R<sup>9</sup> se selecciona entre H y -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;
- R<sup>10</sup> se selecciona entre un grupo arilo o -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>;
- Z es -O-, -S-, -NH- o -NR<sup>12</sup>, en el que R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;
- R<sup>11</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, arilo, -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup> o -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>;
- m es un número entero que varía entre 1-1000;
- R<sup>13</sup> es -alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>;
- R<sup>14</sup> es H o -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;
- cada aparición de R<sup>15</sup> es independientemente H, -COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;
- cada aparición de R<sup>16</sup> es independientemente H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH;
- y n es un número entero que varía de 0 a 6.

También se describen en el presente documento conjugados de Fármaco-Conector-Ligando que tienen la Fórmula la':



o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que:

- Ab es un anticuerpo,
- A es una unidad Bastidor,
- a es 0 o 1,
- cada W es independientemente una unidad de aminoácido,
- w es un número entero que varía de 0 a 12,
- Y es una unidad espaciadora, e
- y es 0, 1 o 2,
- p varía de 1 a aproximadamente 20, y
- D es un resto de fármaco seleccionado entre las Fórmulas D<sub>E</sub> y D<sub>F</sub>:



en las que, independientemente en cada ubicación:

- R<sup>2</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;
- R<sup>3</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); R<sup>4</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); R<sup>5</sup> se selecciona entre H y metilo;

5 o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> conjuntamente forman un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>- en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6;

R<sup>6</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

10 R<sup>7</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>); R<sup>9</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

15 R<sup>10</sup> se selecciona entre arilo o heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>; Z es O, S, NH o NR<sup>12</sup>, en el que R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>11</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, arilo, heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup> o -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>; m es un número entero que varía entre 1-1000; R<sup>13</sup> es alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>;

20 R<sup>14</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; cada aparición de R<sup>15</sup> es independientemente H, COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; cada aparición de R<sup>16</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH;

25 R<sup>18</sup> se selecciona entre -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-arilo, -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), y -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); y n es un número entero que varía de 0 a 6.

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

(1)-(35):

30 (1) BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB, Nº de acceso en Genbank NM\_001203);

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, Nº de acceso en Genbank NM\_003486);

(3) STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata, Nº de acceso en Genbank NM\_012449);

35 (4) 0772P (CA125, MUC16, Nº de acceso en Genbank AF361486);

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor de potenciación de megacariocitos, mesotelina, Nº de acceso en Genbank NM\_005823);

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, familia de vehículos de soluto 34 (fosfato sódico), miembro 2, vehículo de fosfato dependiente de sodio de tipo II 3b, Nº de acceso en Genbank NM\_006424);

40 (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (de tipo 1 y similar al tipo 1), dominio transmembrana (TM) and dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B, Nº de acceso en Genbank AB040878);

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 gene, Nº de acceso en Genbank AY358628);

45 (9) ETBR (Receptor de endotelina de tipo B, Nº de acceso en Genbank AY275463);

(10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, Nº de acceso en Genbank NM\_017763);

(11) STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata 2, proteína de próstata de seis dominios transmembrana, Nº de acceso en Genbank AF455138);

50 (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial de receptores transitorios, subfamilia M, miembro 4, Nº de acceso en Genbank NM\_017636);

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, Nº de acceso en Genbank NP\_003203 o NM\_003212);

(14) CD21 (CR2 (Receptor de complemento2) o C3DR (receptor de C3d/virus de Epstein Barr) o Hs.73792, Nº de acceso en Genbank M26004);

55 (15) CD79b (IGb (asociado a inmunoglobulina beta), B29, Nº de acceso en Genbank NM\_000626);

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína de anclaje 1a de fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C, Nº de acceso en Genbank NM\_030764);

(17) HER2 (Nº de acceso en Genbank M11730);

60 (18) NCA (Nº de acceso en Genbank M18728);

(19) MDP (Nº de acceso en Genbank BC017023);

(20) IL20R $\alpha$  (Nº de acceso en Genbank AF184971);

(21) Brevican (Nº de acceso en Genbank AF229053);

(22) Ephb2R (Nº de acceso en Genbank NM\_004442);

(23) ASLG659 (Nº de acceso en Genbank AX092328);

65 (24) PSCA (Nº de acceso en Genbank AJ297436);

- (25) GEDA (Nº de acceso en Genbank AY260763);  
 (26) BAFF-R (Nº de acceso en Genbank NP\_443177.1);  
 (27) CD22 (Nº de acceso en Genbank NP-001762.1);  
 5 (28) CD79a (CD79A, CD79 $\alpha$ , asociado a inmunoglobulina alfa, una proteína específica de linfocitos B que interactúa covalentemente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie de moléculas de IgM, transduce una señal implicada en la diferenciación de linfocitos B, Nº de acceso en Genbank NP\_001774.1);  
 (29) CXCR5 (receptor del linfoma de Burkitt 1, un receptor acoplado a la proteína G que se activa con la quimioquinas CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y en la defensa humoral, desempeña un papel en la infección por VIH-2 y quizás en el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma, y leucemia, Nº de acceso en Genbank NP\_001707.1);  
 10 (30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula MHC de clase II (antígeno Ia) que se une a péptidos y los presenta a linfocitos T CD4+, Nº de acceso en Genbank NP\_002111.1);  
 (31) P2X5 (Canal iónico 5 abierto por el ligando receptor purinérgico P2X, un canal aniónico abierto por ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión y en la neurogénesis sináptica, la deficiencia puede contribuir a la patofisiología de inestabilidad, Nº de acceso en Genbank NP\_002552.2);  
 15 (32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de linfocitos B, Lyb-2, Nº de acceso en Genbank NP\_001773.1);  
 (33) LY64 (Antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repetición rica en leucina (LRR), regula la activación y apoptosis de linfocitos B, la pérdida de función está asociada con mayor actividad de la enfermedad en pacientes con lupus sistémico eritematoso, Nº de acceso en Genbank NP\_005573.1);  
 20 (34) FCRH1 (proteína 1 de tipo receptor de Fc, supuesto receptor para el dominio Fc de la inmunoglobulina que contiene los dominios similar a Ig de tipo C2 e ITAM, puede tener un papel en la diferenciación de linfocitos B, Nº de acceso en Genbank NP\_443170.1); y/o  
 (35) IRTA2 (Translocación asociada al receptor 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas, un supuesto inmunoreceptor con posibles papeles en el desarrollo y la linfomagénesis de linfocitos B; la desregulación de los genes por translocación se produce en algunas neoplasias de linfocitos B, Nº de acceso en Genbank NP\_112571.1).

En una realización -Ww- es -Val-Cit-.

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

- 35 Además, en otro ejemplo, cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCH<sub>3</sub>.

En un ejemplo, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno metilo, R<sup>5</sup> es -H, R<sup>7</sup> es sec-butilo, cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCH<sub>3</sub>, y R<sup>9</sup> es -H.

- 40 En un ejemplo, Z es -O- o -NH-.

En un ejemplo, R<sup>10</sup> es arilo.

En un ejemplo particular, R<sup>10</sup> es -fenilo.

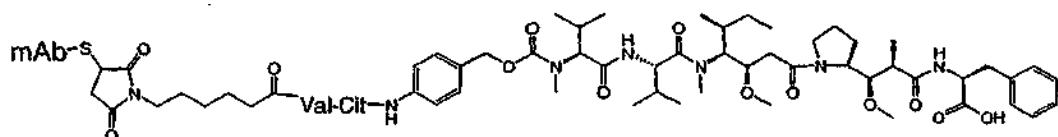
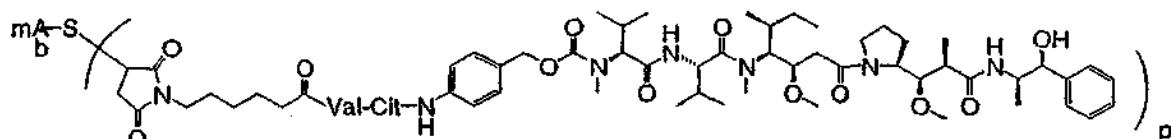
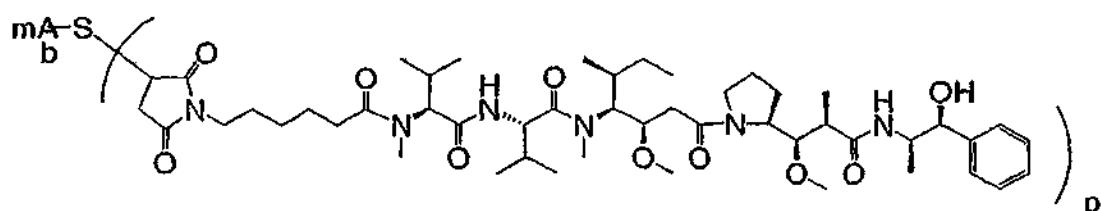
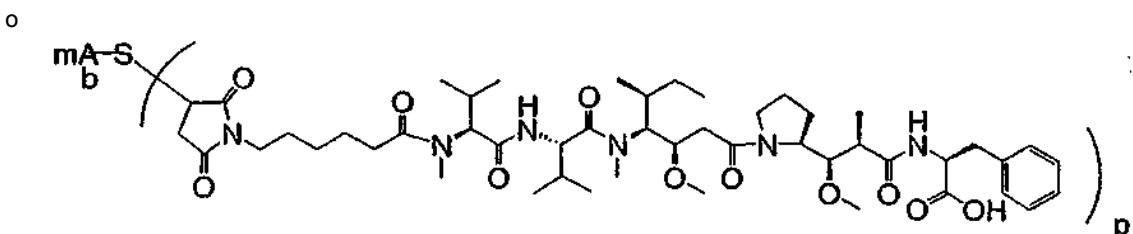
- 45 En un ejemplo particular, cuando Z es -O-, R<sup>11</sup> es -H, metilo o t-butilo.

En un ejemplo, cuando Z es -NH, R<sup>11</sup> es -CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>, en el que R<sup>15</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub> y R<sup>16</sup> es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH.

- 50 En otro ejemplo, cuando Z es -NH, R<sup>11</sup> es -CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>, en el que R<sup>15</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H.

Ab puede ser cAR96, cS2C6, c1F6, c2F2, hAC10, hBR96, hS2C6, h1F6, y h2F2.

- 55 Los conjugados a modo de ejemplo de fórmula la tienen las siguientes estructuras:

**L-MC-vc-PAB-MMAF****L-MC-vc-PAB-MMAE****L-MC-MMAE****L-MC-MMAAF**

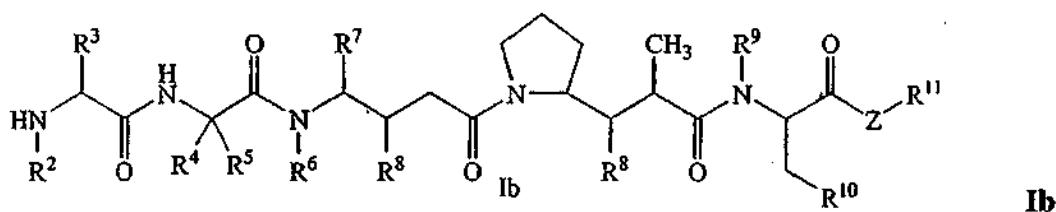
5

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

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

#### 20 4.2.2 LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA (Ib)

También se describen en el presente documento Compuestos de Fármaco que tienen la Fórmula (Ib):



25

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que.

- 5      R<sup>2</sup> se selecciona entre -hidrógeno y -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 R<sup>3</sup> se selecciona entre -hidrógeno, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, -alquil-arilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);  
 R<sup>4</sup> se selecciona entre -hidrógeno, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -arilo, -alquil-arilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>) en el que R<sup>5</sup> se selecciona entre -H y -metilo;
- 10     o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> conjuntamente, tienen la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub> en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre -H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6, y forman un anillo con el átomo de carbono al que están unidos;
- 15     R<sup>6</sup> se selecciona entre -H y -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 R<sup>7</sup> se selecciona entre -H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, -alquil-arilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);  
 20     cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre -H, -OH, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);  
 R<sup>9</sup> se selecciona entre -H y -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 R<sup>10</sup> se selecciona entre un grupo arilo o -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>;  
 Z es -O-, -S-, -NH- o -NR<sup>12</sup>-, en el que R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 25     R<sup>11</sup> se selecciona entre -H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, arilo, -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup> o -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>;  
 m es un número entero que varía entre 1-1000;  
 R<sup>13</sup> es -alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>;  
 R<sup>14</sup> es -H o -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 cada aparición de R<sup>15</sup> es independientemente -H, -COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 30     cada aparición de R<sup>16</sup> es independientemente -H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH; y  
 n es un número entero que varía de 0 a 6.

En un ejemplo, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente isopropilo o sec-butilo y R<sup>5</sup> es -H. En un ejemplo particular, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>5</sup> es -H, y R<sup>7</sup> es sec-butilo.

- 35     30     En otro ejemplo, R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno metilo, y R<sup>9</sup> es -H.

Además, en otro ejemplo, cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCH<sub>3</sub>.

- 35     35     En un ejemplo particular, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno metilo, R<sup>5</sup> es -H, R<sup>7</sup> es sec-butilo, cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCH<sub>3</sub>, y R<sup>9</sup> es -H.

En un ejemplo, Z es -O- o -NH-.

- 40     40     En un ejemplo, R<sup>10</sup> es arilo.

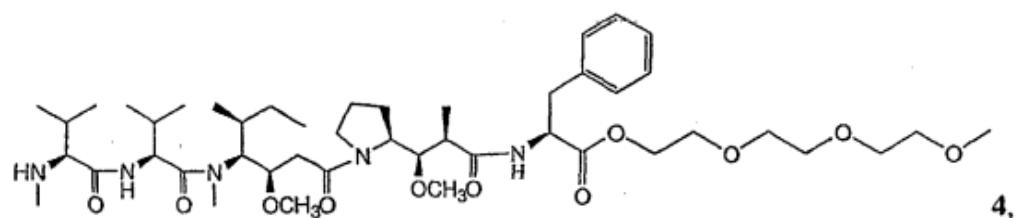
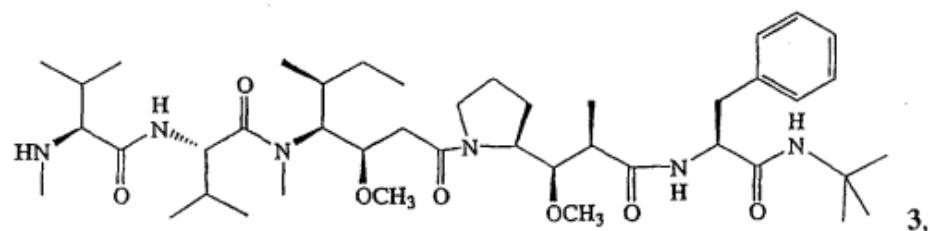
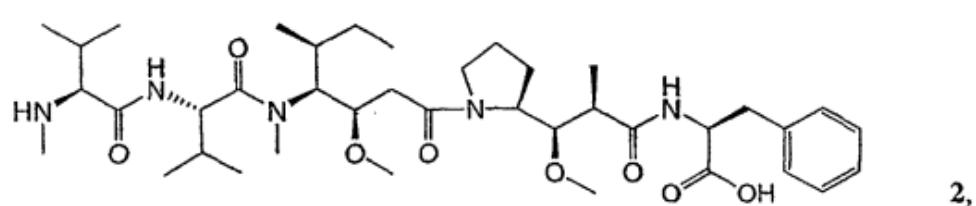
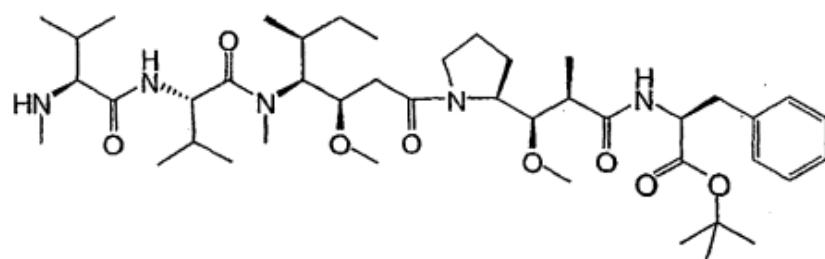
En un ejemplo particular, R<sup>10</sup> es -fenilo.

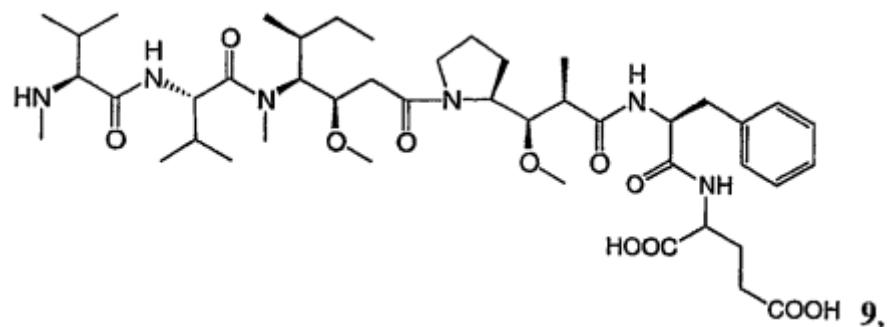
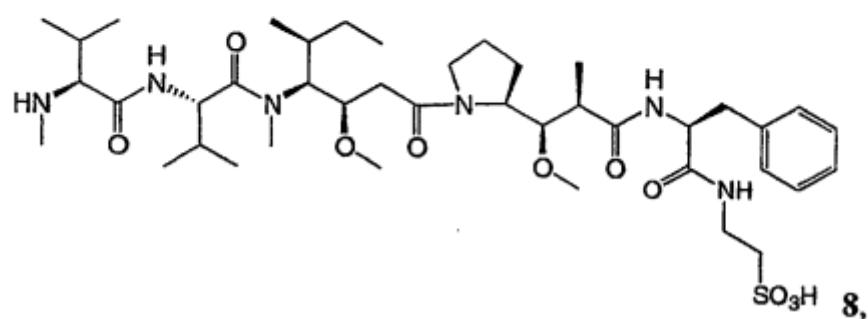
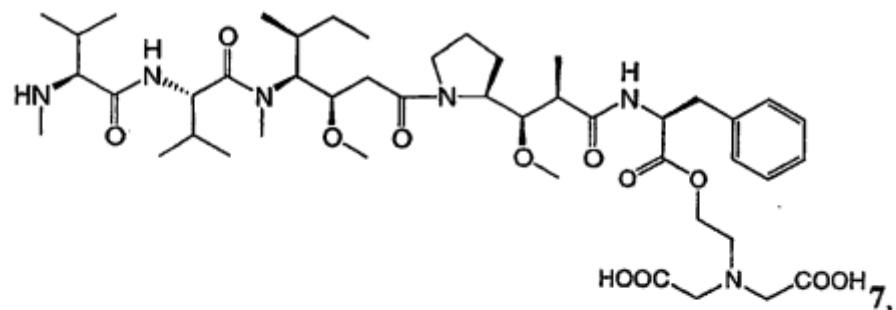
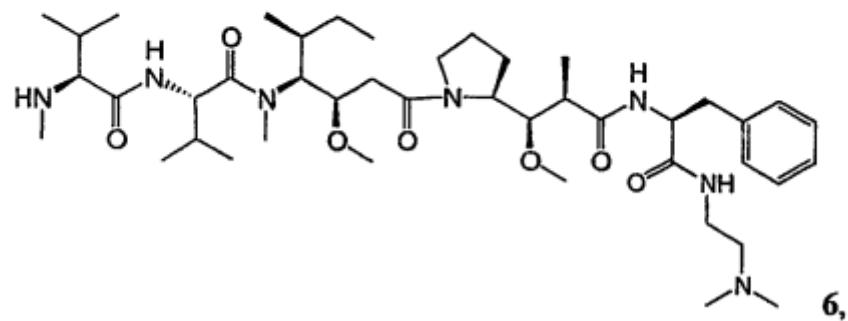
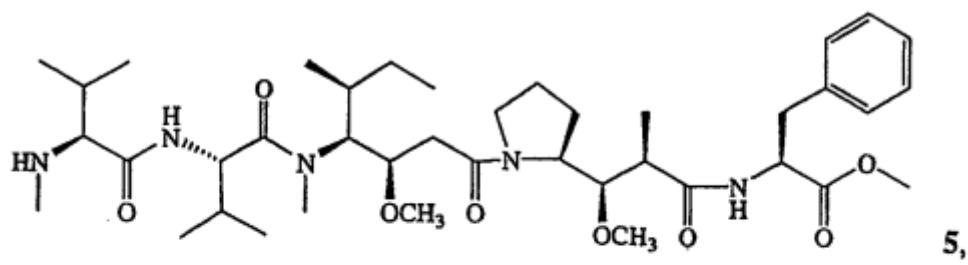
45     45     En un ejemplo particular, cuando Z es -O-, R<sup>11</sup> es -H, metilo o t-butilo.

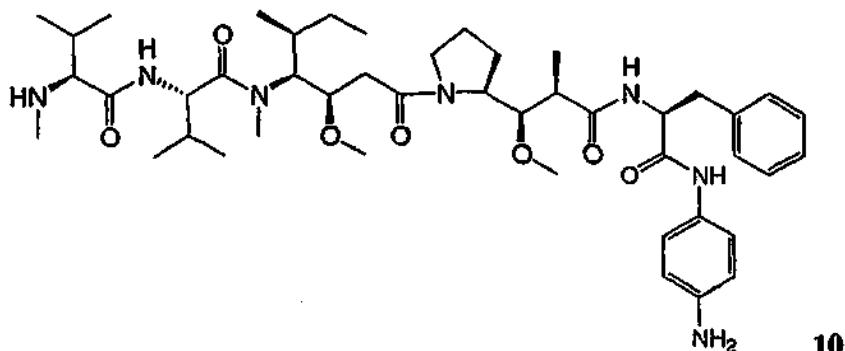
45     45     En un ejemplo, cuando Z es -NH, R<sup>11</sup> es -CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>, en el que R<sup>15</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub> y R<sup>16</sup> es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH.

50     50     En otro ejemplo, cuando Z es -NH, R<sup>11</sup> es -CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>, en el que R<sup>15</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H.

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







y sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

## 5 LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA (Ic)

También se describen en el presente documento compuestos de conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que tienen la Fórmula Ic:

10 Ab(A<sub>a</sub>-W<sub>w</sub>-Y<sub>y</sub>-D)<sub>p</sub> 1c

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

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

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

- 20 (1) BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB, Nº de acceso en Genbank NM\_001203);  
(2) E16 (LAT1, SLC7A5, Nº de acceso en Genbank NM\_003486);  
(3) STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata, Nº de acceso en Genbank NM\_012449);  
(4) 0772P (CA125, MUC16, Nº de acceso en Genbank AF361486);  
25 (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor de potenciación de megacariocitos, mesotelina, Nº de acceso en Genbank NM\_005823);  
(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, familia de vehículos de soluto 34 (fosfato sódico), miembro 2, vehículo de fosfato dependiente de sodio de tipo II 3b, Nº de acceso en Genbank NM\_006424);  
(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (de tipo 1 y similar al tipo 1), dominio transmembrana (TM) and dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B, Nº de acceso en Genbank AB040878);  
30 (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 gene, Nº de acceso en Genbank AY358628);  
(9) ETBR (Receptor de endotelina de tipo B, Nº de acceso en Genbank AY275463);  
35 (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, Nº de acceso en Genbank NM\_017763);  
(11) STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata 2, proteína de próstata de seis dominios transmembrana, Nº de acceso en Genbank AF455138);  
(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial de receptores transitorios, subfamilia M, miembro 4, Nº de acceso en Genbank NM\_017636);  
40 (13) CRIPTO, (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, Nº de acceso en Genbank NP\_003203 o NM\_003212);  
(14) CD21 (CR2 (Receptor de complemento2) o C3DR (receptor de C3d/virus de Epstein Barr) o Hs.73792 Nº de acceso en Genbank M26004);  
45 (15) CD79b (CD79B, CD79β, IGB (asociado a inmunoglobulina beta), B29, Nº de acceso en Genbank NM\_000626);  
(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína de anclaje 1a de fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C, Nº de acceso en Genbank NM\_030764);  
(17) HER2 (Nº de acceso en Genbank M11730);  
(18) NCA (Nº de acceso en Genbank M18728);  
50 (19) MDP (Nº de acceso en Genbank BC017023);  
(20) IL20R $\alpha$  (Nº de acceso en Genbank AF184971);  
(21) Brevican (Nº de acceso en Genbank AF229053);

- (22) Ephb2R (Nº de acceso en Genbank NM\_004442);  
 (23) ASLG659 (Nº de acceso en Genbank AX092328);  
 (24) PSCA (Nº de acceso en Genbank AJ297436);  
 (25) GEDA (Nº de acceso en Genbank AY260763);  
 5 (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, receptor 3 de BLyS, BR3, NP\_443177.1);  
 (27) CD22 (isoforma CD22-B de receptores de linfocitos B, NP\_001762.1);  
 (28) CD79a (CD79A, CD79 $\alpha$ , asociado a inmunoglobulina alfa, una proteína específica de linfocitos B que interactúa covalentemente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie de moléculas de IgM, transduce una señal implicada en la diferenciación de linfocitos B, Nº de acceso en Genbank NP\_001774.1);  
 10 (29) CXCR5 (receptor del linfoma de Burkitt 1, un receptor acoplado a la proteína G que se activa con la quimioquina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y en la defensa humoral, desempeña un papel en la infección por VIH-2 y quizás en el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma, y leucemia, Nº de acceso en Genbank NP\_001707.1);  
 (30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula MHC de clase II (antígeno Ia) que se une a péptidos y los presenta a linfocitos T CD4+, Nº de acceso en Genbank NP\_002111.1);  
 15 (31) P2X5 (Canal iónico 5 abierto por el ligando receptor purinérgico P2X, un canal aniónico abierto por ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión y en la neurogénesis sináptica, la deficiencia puede contribuir a la patofisiología de inestabilidad, Nº de acceso en Genbank NP\_002552.2);  
 (32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de linfocitos B, Lyb-2, Nº de acceso en Genbank NP\_001773.1);  
 20 (33) LY64 (Antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repetición rica en leucina (LRR), regula la activación y apoptosis de linfocitos B, la pérdida de función está asociada con mayor actividad de la enfermedad en pacientes con lupus sistémico eritematoso, Nº de acceso en Genbank NP\_005573.1);  
 (34) FCRH1 (proteína 1 de tipo receptor de Fc, supuesto receptor para el dominio Fc de la inmunoglobulina que contiene los dominios similar a Ig de tipo C2 e ITAM, puede tener un papel en la diferenciación de linfocitos B, Nº de acceso en Genbank NP\_443170.1); y  
 25 (35) IRTA2 (Translocación asociada al receptor 2 de la super familia de inmunoglobulinas, un supuesto inmunoreceptor con posibles papeles en el desarrollo y la linfomagenésis de linfocitos B; la desregulación de los genes por translocación se produce en algunas neoplasias de linfocitos B, Nº de acceso en Genbank NP\_112571.1).

A es a unidad Bastidor,

a es 0 o 1,

cada W es independientemente una unidad Aminoácido,

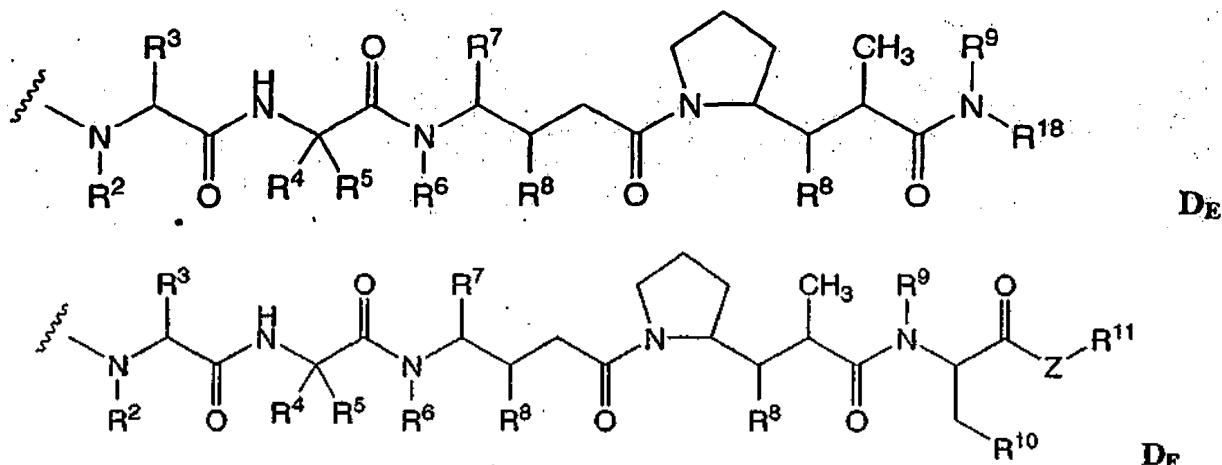
w es un número entero que varía de 0 a 12,

Y es a unidad Espaciadora, e

y es 0, 1 o 2,

p varía de 1 a aproximadamente 8, y

D es un resto de Fármaco que tiene la Fórmula D<sub>F</sub>:



en las que la línea ondulada de  $D_E$  y  $D_F$  indica el sitio de unión covalente para A, W o Y, e independientemente en cada ubicación:

R<sup>2</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>3</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

50 R<sup>4</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

- R<sup>5</sup> se selecciona entre H y metilo;  
o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> conjuntamente forman un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>- en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6;  
R<sup>6</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;
- 5 R<sup>7</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);  
cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);  
R<sup>9</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;
- 10 R<sup>10</sup> se selecciona entre arilo o heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>;  
Z es O, S, NH o NR<sup>12</sup>, en el que R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
R<sup>11</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, arilo, heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup> o -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>;  
m es un número entero que varía entre 1-1000;  
R<sup>13</sup> es alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>;
- 15 R<sup>14</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
cada aparición de R<sup>15</sup> es independientemente H, COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H, o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
cada aparición de R<sup>16</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH;  
R<sup>18</sup> se selecciona entre -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-arilo, -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), y -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); y  
20 n es un número entero que varía de 0 a 6.

En un ejemplo -Ww- es -Val-Cit-.

- 25 En otro ejemplo, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente isopropilo o sec-butilo y R<sup>5</sup> es -H. En un ejemplo particular, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>5</sup> es -H, y R<sup>7</sup> es sec-butilo.

En otro ejemplo más, R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno metilo, y R<sup>9</sup> es -H.

Además, en otro ejemplo, cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCH<sub>3</sub>.

- 30 En un ejemplo particular, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno metilo, R<sup>5</sup> es -H, R<sup>7</sup> es sec-butilo, cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCH<sub>3</sub>, y R<sup>9</sup> es -H.

En un ejemplo, Z es -O- o -NH-.

- 35 35 En un ejemplo, R<sup>10</sup> es arilo.

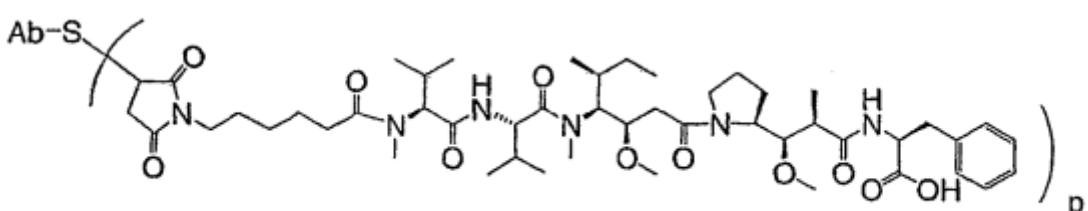
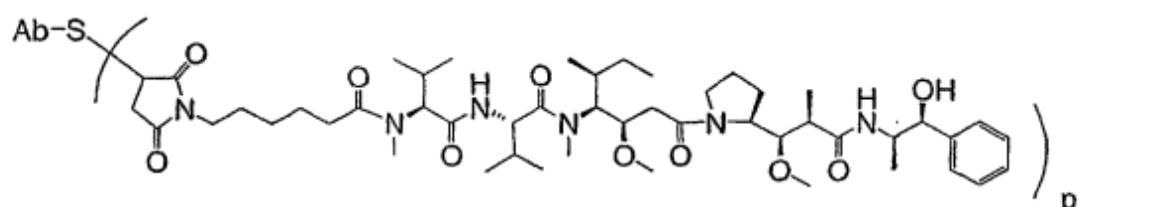
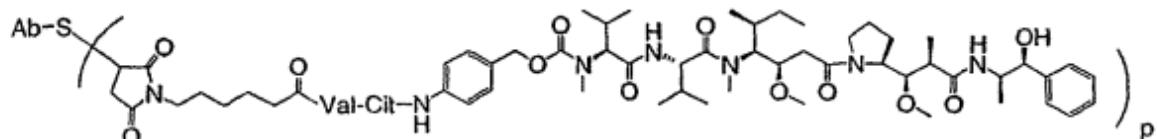
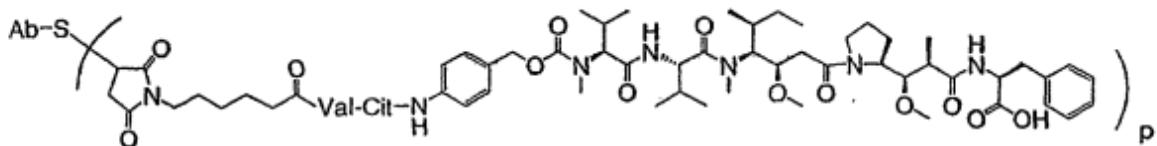
En un ejemplo particular, R<sup>10</sup> es -fenilo.

- 40 40 En un ejemplo particular, cuando Z es -O-, R<sup>11</sup> es -H, metilo o t-butilo.

En un ejemplo, cuando Z es -NH, R<sup>11</sup> es -CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>, en el que R<sup>15</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub> y R<sup>16</sup> es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH.

- 45 45 En otro ejemplo, cuando Z es -NH, R<sup>11</sup> es -CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>, en el que R<sup>15</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H.

Los conjugados de ADC de Fórmula Ic tienen las siguientes estructuras:



en las que Ab es un anticuerpo que se une a uno o más receptores de antígenos asociados a tumor (1)-(35); Val es 5 valina; y Cit es citrulina.

La carga de fármacos se representa por p, el número medio de fármacos por anticuerpo en una molécula de Fórmula I. La carga del fármaco puede variar de 1 a 20 fármacos (D) por anticuerpo (Ab o mAb). Las composiciones de ADC de Fórmula I incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con un intervalo de fármacos, de 1 a 20. El 10 número medio de fármacos por anticuerpo en las preparaciones de ADC a partir de reacciones de conjugación se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectroscopía de UV/visible, espectrometría de masas, ensayo de ELISA, y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de ADC en términos de p. En algunos casos, la separación purificación, y caracterización de ADC homogéneos en los que p es un determinado valor a partir de ADC con otras cargas de fármaco se pueden conseguir por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis.

Para algunos conjugados de fármaco de anticuerpo, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el 20 anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión es un tiol de la cisteína, tal como las realizaciones a modo de ejemplo mencionadas anteriormente, un anticuerpo puede tener solamente uno o varios grupos tiol de la cisteína, o por detener solamente uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través los que se puede unir un conector.

Por lo general, menos del máximo teórico de restos de fármaco se conjugan con un anticuerpo durante una reacción 25 de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, muchos restos de lisina que no reaccionan con el compuesto intermedio de fármaco-conector o reactivo conector. Solamente los grupos lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo conector de amina-reactivo. Generalmente, los anticuerpos no contienen muchos, si los hubiera, grupos tiol de la cisteína libres y reactivos que se pueden unir a un resto de fármaco. La mayoría de los restos tiol de la cisteína en los anticuerpos de los compuestos de la invención existen como puentes disulfuro se deben reducir con un agente reductor tal como ditiotreitol (DTT). Además, el anticuerpo se debe someter a condiciones de desnaturización para dejar al descubierto grupos nucleófilos reactivos tales como lisina o cisteína.

La carga (relación de fármaco/anticuerpo) de un ADC se puede controlar diferentes maneras, que incluyen: (i) limitar el exceso molar de compuesto intermedio de fármaco-conector o reactivo conector con respecto al anticuerpo, (ii) limitar el tiempo o la temperatura de la reacción de conjugación, y (iii) hacer parciales o limitar las condiciones de reducción para la modificación del tiol de la cisteína.

- 5 Se debe observar que cuando más de un grupo nucleófilo reacciona con un compuesto intermedio de fármaco-conector, o reactivo conector seguido de reactivo de resto de fármaco, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de uno o más restos de fármaco unidos a un anticuerpo. El número medio de fármacos por anticuerpo se puede calcular a partir de la mezcla mediante ensayos de anticuerpos por ELISA doble, específicos para anticuerpos y específicos para el fármaco. Se pueden identificar moléculas individuales de ADC en la mezcla por espectroscopía de masas, y separa por HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrófoba ("Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", Hamblett, K.J., et al, Resumen Nº 624, American Association for Cancer Research; Annual Meeting de 2004, 27-31 de marzo de 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, marzo de 2004; "Controlling the Location of Drug Attachment in Antibody-Drug Conjugates", Alley, S.C., et al, Resumen Nº 627, American Association for Cancer Research; Annual Meeting de 2004, 27-31 de marzo de 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, marzo de 2004). Por lo tanto, un ADC homogéneo con un solo valor de carga se puede aislar a partir de la mezcla de conjugación mediante electroforesis o cromatografía.
- 10
- 15

## 20 4.3 LA UNIDAD CONECTORA

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



30 en la que:

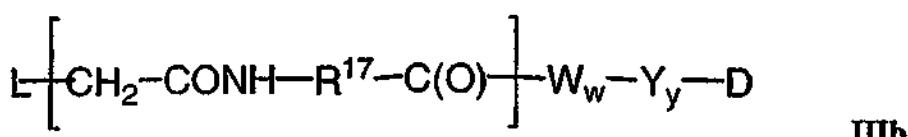
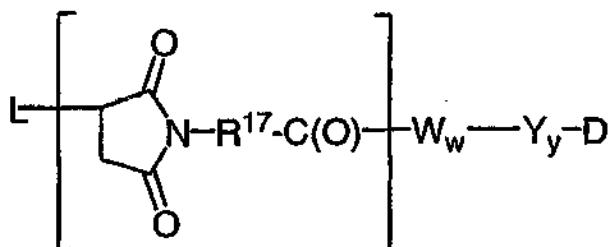
- A- es a unidad Bastidor;  
a es 0 por 1;  
cada -W- es independientemente una unidad Aminoácido;  
35 w es independientemente un número entero que varía de 0 a 12;  
-Y- es a unidad Espaciadora; y  
y es 0, 1 o 2.

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

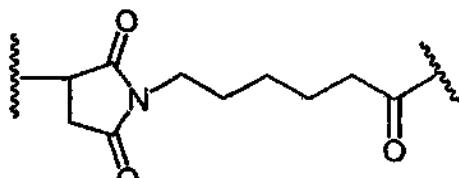
### 4.3.1 LA UNIDAD BASTIDOR

45 La unidad Bastidor (-A-), cuando está presente, es capaz de unirse a una unidad Ligando para formar una unidad aminoácido (-W-). A este respecto, un Ligando (L) tiene un grupo funcional que puede formar un enlace con grupo funcional de un Bastidor. Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un ligando, bien naturales o a través de manipulación química incluyen, pero no se limitan a, sulfhidrilo (-SH), amino, hidroxilo, carboxi, el grupo hidroxilo anómero de un hidrato de carbono, y carboxilo. Los grupos funcionales de Ligando pueden ser sulfhidrilo y amino. Los grupos sulfhidrilo se pueden generar por reducción de un enlace disulfuro intramolecular de un Ligando. 50 Como alternativa, los grupos sulfhidrilo se pueden generar por reacción de un grupo amino de un resto de lisina de un Ligando usando 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otro reactivo que genere sulfhidrilo.

55 La unidad Bastidor puede formar un enlace con un átomo de azufre de la unidad Ligando. El átomo de azufre puede provenir de un grupo sulfhidrilo de un Ligando. Las unidades Bastidor representativas de la presente realización se representan dentro de los corchetes de las Fórmulas IIIa y IIIb, en las que L-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal como se han definido anteriormente, y R<sup>17</sup> se selecciona entre -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> -, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-, -arileno-, -alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-arileno-, -arilen-alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>1</sub> -, -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-, -alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-, y -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-, y r es un número entero que varía de 1-10. Se debe entender que a partir de todos los conjungados a modo de ejemplo de Fórmula Ia, tales como III-VI, que incluso cuando no se indica de forma expresa, de 1 a 20 restos de fármaco están unidos a un Ligando (p = 1-20).

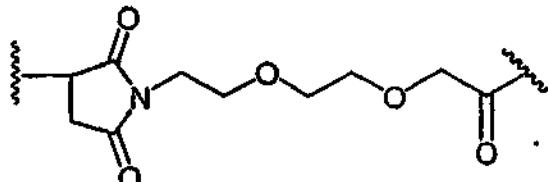


Una unidad Bastidor ilustrativa es la de Fórmula IIIa en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-:



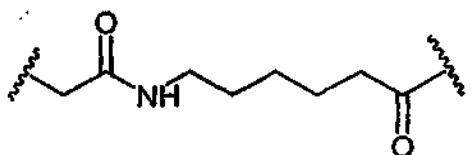
5

Otra unidad Bastidor ilustrativa es la 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:

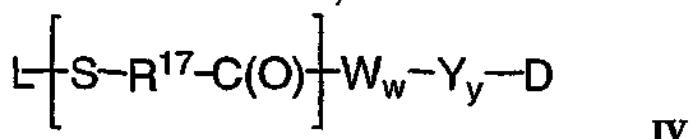


10

Además, otra unidad Bastidor ilustrativa es la de Fórmula IIIb en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-:



- 15 En otro ejemplo, la unidad Bastidor está unida a la unidad Ligando a través de un enlace disulfuro entre un átomo de azufre de la unidad Ligando y un átomo de azufre de la unidad Bastidor. Una unidad Bastidor representativa se representa dentro de los corchetes de Fórmula IV, en la que R<sup>17</sup>, L-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal como se han definido anteriormente.

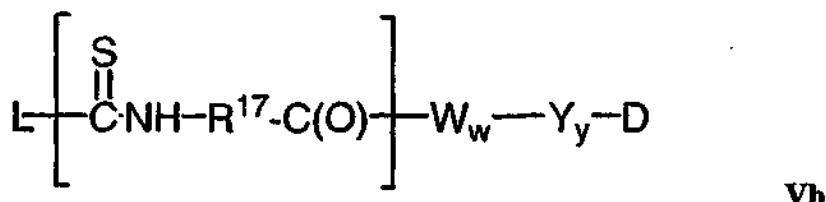
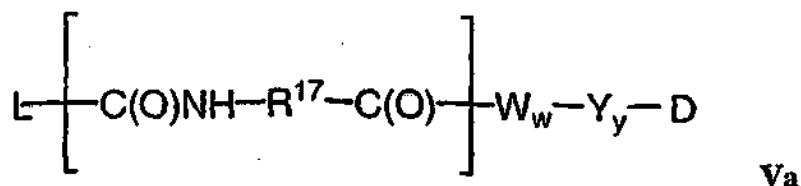


20

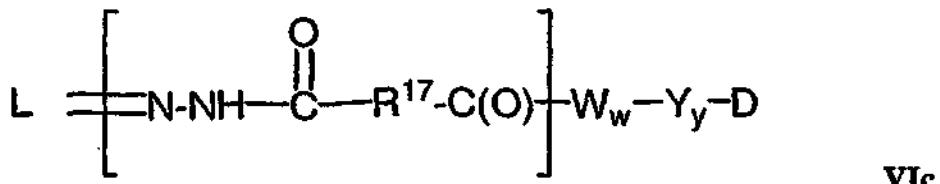
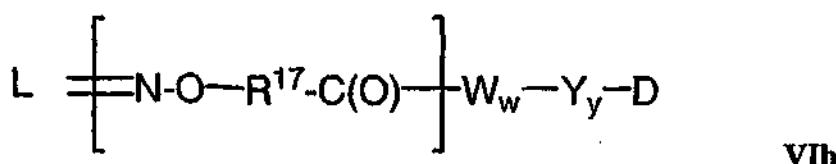
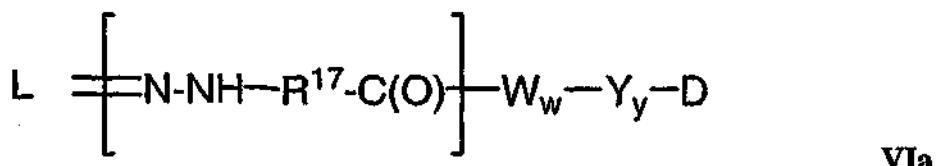
En otro ejemplo más, el grupo reactivo del Bastidor contiene husillo reactivo que puede formar un enlace con un grupo amino primario o secundario de un Ligando. Ejemplos de estos sitios reactivos incluyen, pero no se limitan a, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Las unidades

25

Bastidor representativas se representan dentro de los corchetes de las Fórmulas **Va** y **Vb**, en las que -R<sup>17</sup>- , L-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal como se han definido anteriormente;

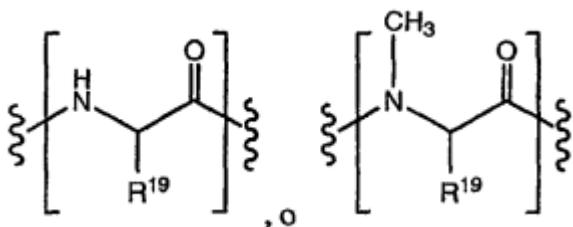


- 5 El grupo reactivo del Bastidor puede contener un sitio reactivo que es reactivo a un grupo modificado del hidrato de carbono (-CHO) que puede estar presente en un por. Por ejemplo, un hidrato de carbono se puede oxidar suavemente usando un reactivo tal como peryodato sódico y la unidad (-CHO) resultante del hidrato de carbono oxidado se puede condensar con un Bastidor que contiene una funcionalidad tal como una hidrazida, una oxima, una amina primaria o secundaria, una hidrazina, una tiosemicarbazona, un carboxilato de hidrazina, y una arilhidrazida tal como las que se describen en Kaneko, T. et al. (1991) Bioconjugate Chem 2: 133-41. Las unidades Bastidor representativas se representan dentro de los corchetes de Fórmulas **VIa**, **VIb**, y **VIc**, en las que -R<sup>17</sup>- , L-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal como se han definido anteriormente.



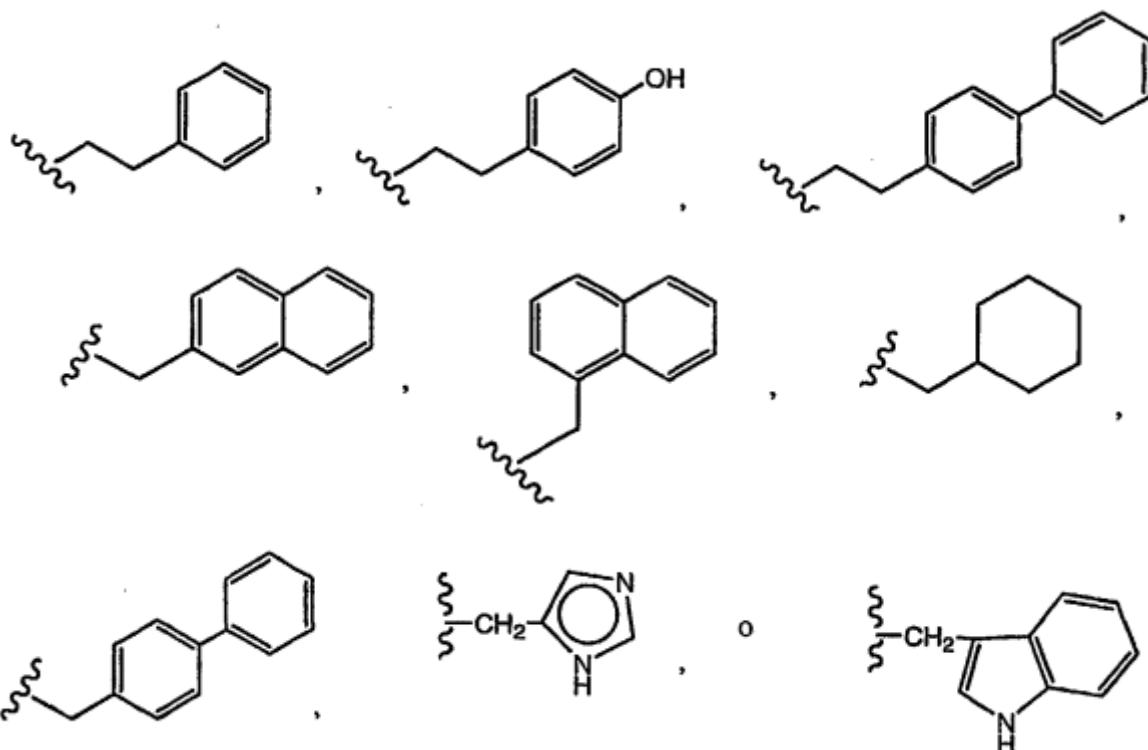
#### 4.3.2 LA UNIDAD AMINOÁCIDO

- 20 La unidad Aminoácido (-W-), cuando está presente, une la unidad Bastidor a la unidad Espaciadora si la unidad Espaciadora está presente, une la unidad Bastidor al resto de Fármaco si la unidad Espaciadora está ausente, y une la unidad Ligando a la unidad de Fármaco si la unidad Bastidor y la unidad Espaciadora están ausentes.
- 25 W<sub>w</sub>- es una unidad dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido. Cada unidad -W- tiene independientemente la fórmula que se indica a continuación entre paréntesis, y w es un número entero que varía de 0 a 12:



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

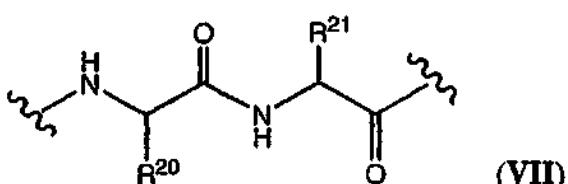
5



10

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

15



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

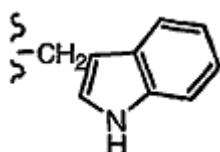
$\text{R}^{20}$	$\text{R}^{21}$
bencilo	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ;
metilo	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ;
isopropilo	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ;

isopropilo                     $(CH_2)_3NHCONH_2;$

bencilo                     $(CH_2)_3NHCONH_2;$

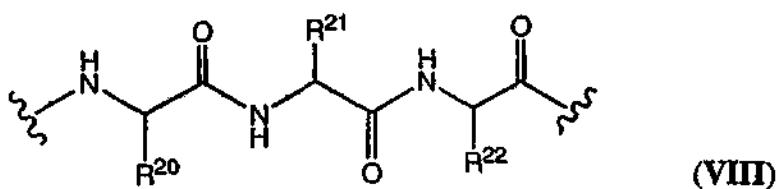
isobutilo                     $(CH_2)_3NHCONH_2;$

sec-butilo                     $(CH_2)_3NHCONH_2;$



bencilo                    metilo; y

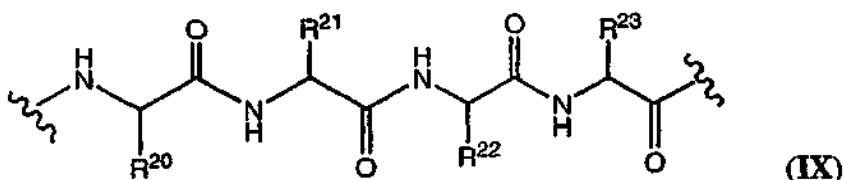
bencilo                     $(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2;$



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

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

5



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

$R^{20}$	$R^{21}$	$R^{22}$	$R^{23}$
H	bencilo	isobutilo	H; y
metilo	isobutilo	metilo	Isobutilo

10

Unidades Aminoácido a modo de ejemplo unidad incluyen, pero no se limitan a, unidades de fórmula (VII) en la que:  $R^{20}$  es bencilo y  $R^{21}$  es  $-(CH_2)_4NH_2;$   $R^{20}$  isopropilo y  $R^{21}$  es  $-(CH_2)_4NH_2;$   $R^{20}$  isopropilo y  $R^{21}$  es  $-(CH_2)_3NHCONH_2.$  Otra unidad Aminoácido a modo de ejemplo es una unidad de fórmula (VIII) en la que  $R^{20}$  es bencilo,  $R^{21}$  es bencilo, y  $R^{22}$  es  $-(CH_2)_4NH_2.$

15

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

20

En un ejemplo,  $-W_w-$  es un dipéptido, tripéptido, tetrapéptido o pentapéptido.

Cuando  $R^{19}$ ,  $R^{20}$ ,  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  o  $R^{23}$  es distinto de hidrógeno, el átomo de carbono al que  $R^{19}$ ,  $R^{20}$ ,  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  o  $R^{23}$  está unido es quiral.

Cada átomo de carbono al que R<sup>19</sup>, R<sup>20</sup>, R<sup>21</sup>, R<sup>22</sup> o R<sup>23</sup> está unido está independientemente en la configuración (S) o (R).

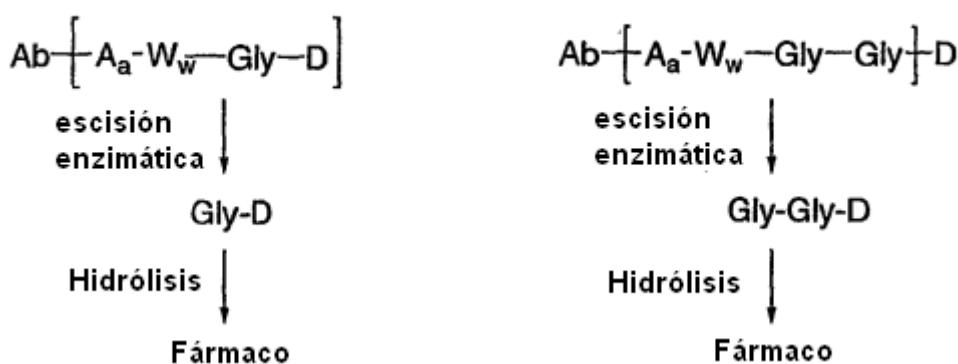
- 5 En un ejemplo de la unidad Aminoácido, la unidad Aminoácido es valina-citrulina. En otro aspecto, la unidad Aminoácido es fenilalanina-lisina (es decir, fk). En otro ejemplo más de la unidad Aminoácido, la unidad Aminoácido es N-metilvalina-citrulina. En otro aspecto más, la unidad Aminoácido es ácido 5-aminovalérico, homo fenilalanina lisina, tetraisoquinolinacarboxilato de lisina, ciclohexilalanina lisina, ácido isonipecótico lisina, beta-alanina lisina, glicina serina valina glutamina y ácido isonipecótico.
- 10 En determinados casos, la unidad Aminoácido puede comprender aminoácidos naturales. En otros casos, la unidad Aminoácido puede comprender aminoácidos no naturales.

#### 4.3.3 LA UNIDAD ESPACIADORA

- 15 La unidad Espaciadora (-Y-), cuando está presente, une una unidad Aminoácido al resto de Fármaco cuando una unidad Aminoácido está presente. Como alternativa, la unidad Espaciadora une la unidad Bastidor al resto de Fármaco cuando la unidad Aminoácido está ausente. La unidad Espaciadora también une el resto de Fármaco a la unidad Ligando cuando tanto la unidad Aminoácido como la unidad Bastidor están ausentes.
- 20 Las unidades Espaciadoras son de dos tipos generales: autoinmolativas y no autoinmolativas. Una unidad Espaciadora no autoinmolativa es una en la que parte o toda la unidad Espaciadora permanece unida al resto de Fármaco después de la escisión, particularmente enzimática, de una unidad Aminoácido a partir del Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando o del Compuesto Fármaco-Conector. Ejemplos de una unidad Espaciadora no autoinmolativa incluyen, pero no se limitan a una unidad Espaciadora (glicina-glicina) y una unidad Espaciadora glicina (ambas representadas en el Esquema 1) (véase a continuación). Cuando un Compuesto a modo de Ejemplo que contiene una unidad Espaciadora glicina-glicina o una unidad Espaciadora glicina experimenta escisión enzimática a través de una proteasa asociada a células tumorales, una proteasa asociada a células cancerosas o una proteasa asociada a linfocitos, un resto de Fármaco glicina-glicina o un resto de Fármaco glicina se escinde de L-A<sub>a</sub>-W<sub>w</sub>. En una realización, una reacción de hidrólisis independiente se produce dentro de la célula diana, escindiendo el resto de Fármaco glicina y liberando el Fármaco.
- 25
- 30
- 35

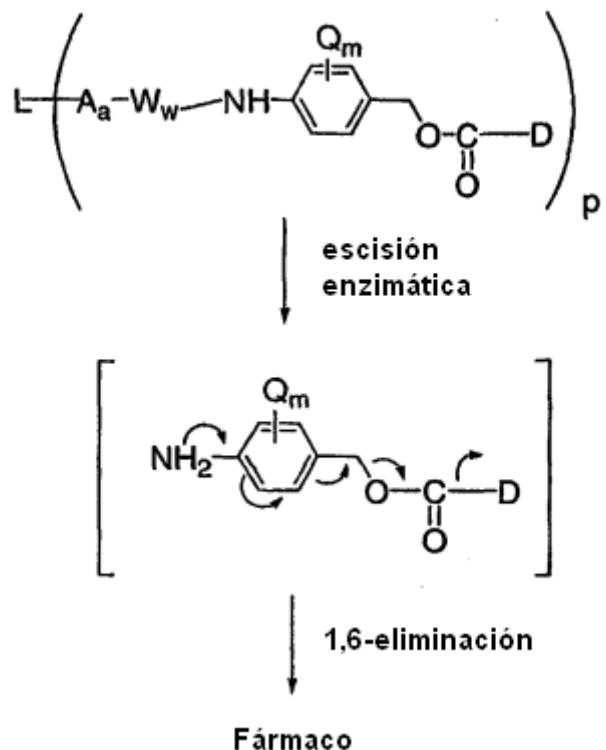
En otro ejemplo, -Y- es una unidad de alcohol p-aminobencílico (PAB) (véanse los Esquemas 2 y 3) cuya porción de fenileno está sustituida con Q<sub>m</sub> en el que Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0-4.

#### Esquema 1



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

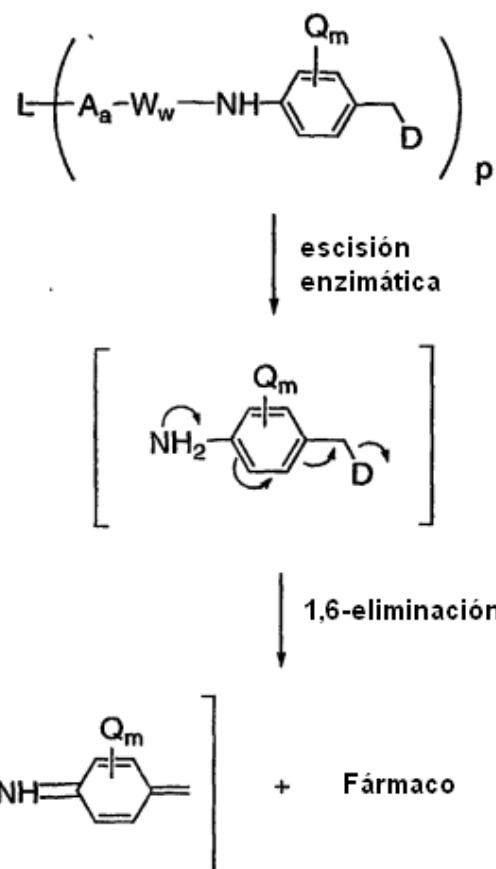
- 40 En un ejemplo, se proporciona un Compuesto de Fármaco-Conector o un Conjugado de Fármaco-Conector Ligando en el que la unidad Espaciadora está ausente (y = 0), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 45 Como alternativa, un Compuesto a modo de Ejemplo que contiene una unidad Espaciadora autoinmolativa puede liberar -D sin la necesidad de una etapa de hidrólisis separada. En esta realización, -Y- es un grupo PAB que se une a -W<sub>w</sub>- a través del átomo de nitrógeno del amino del grupo PAB, y se conecta directamente a -D a través de un grupo carbonato, carbamato o éter. Sin quedar ligado a teoría o mecanismo alguno en particular, el Esquema 2 representa un mecanismo posible de liberación de Fármaco de un grupo PAB que se une directamente a -D a través de un grupo carbamato o carbonato adoptado por Toki et al. (2002) J Org. Chem. 67: 1866-1872.
- 50

Esquema 2

en el 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 varía de 0-4; y p varía de 1 a aproximadamente 20.

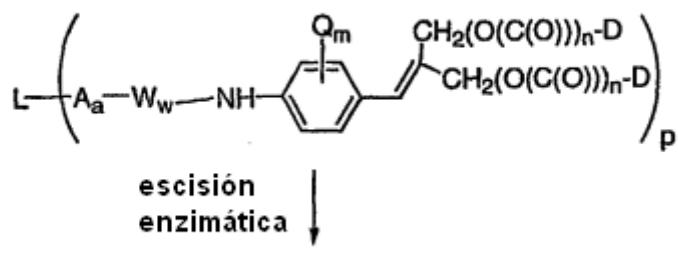
5

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

Esquema 3

en el 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 varía de 0-4; y p varía de 1 a aproximadamente 20.

- 5        Otros ejemplos de espaciadores autoinmolativos incluyen, pero no se limitan a, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) y orto o para-aminobencilacetales. Se pueden usar espaciadores que experimentan ciclación tras la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas sustituidas y sin sustituir del ácido 4-aminobutírico (Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2, 223), sistemas de anillo biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] sustituidos apropiadamente (Storm, et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815) y amidas del ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990, 55, 5867). La eliminación de fármacos que contienen amina que están sustituidos en la posición a de la glicina (Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447) también son ejemplos de espaciador autoinmolativo útil en Compuestos a modo de Ejemplo.
- 10      En un ejemplo, la unidad Espaciadora es una unidad de bis(hidroximetil)estireno (BHMS) ramificado tal como se representa en el Esquema 4, que se puede usar para incorporar y liberar múltiples fármacos.
- 15

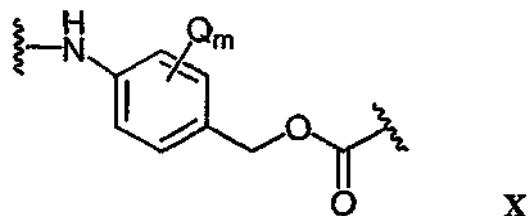
Esquema 4

en el 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 varía de 0-4; n es 0 o 1; y p varía de 1 a aproximadamente 20.

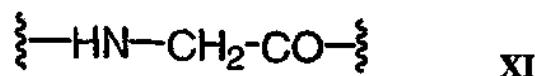
En un ejemplo, los restos -D son los mismos. En otra realización más, los restos -D son diferentes.

5

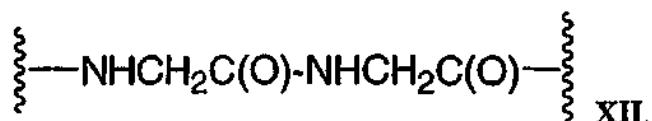
En un ejemplo, las unidades Espaciadoras (-Yy-) se representan con las Fórmulas (X)-(XII):



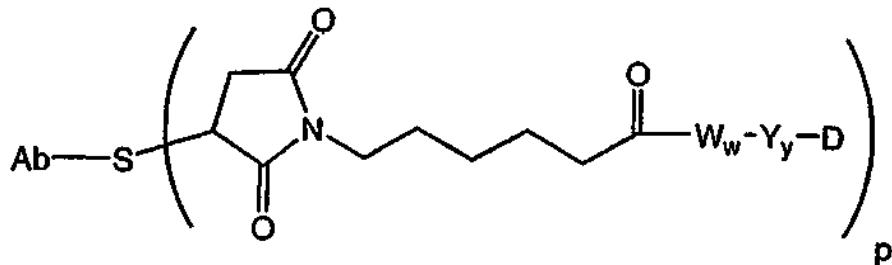
10 en la que Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0-4;



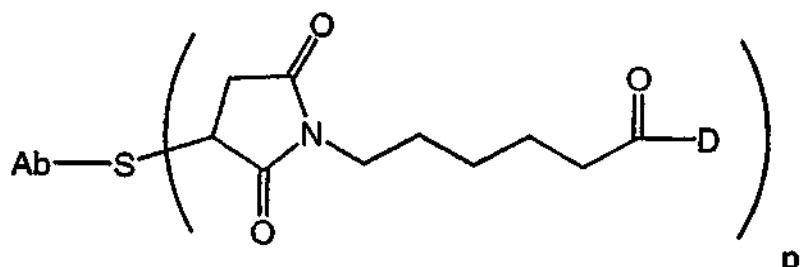
15 y



20 Los ejemplos de los compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco de Fórmulas Ia' e Ic incluyen:

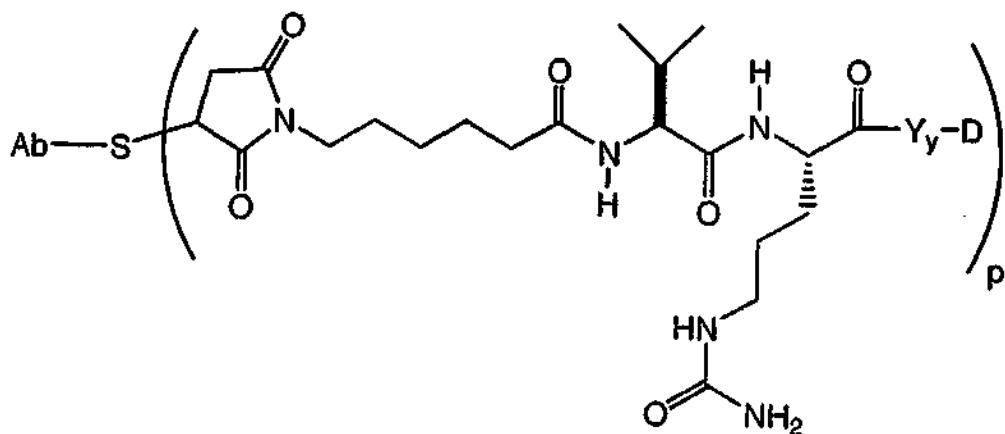
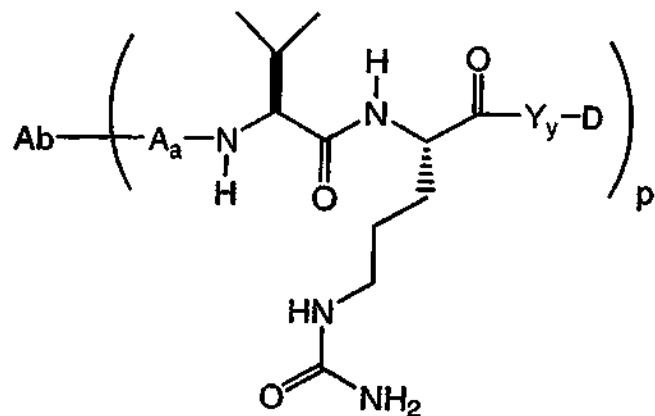


y,

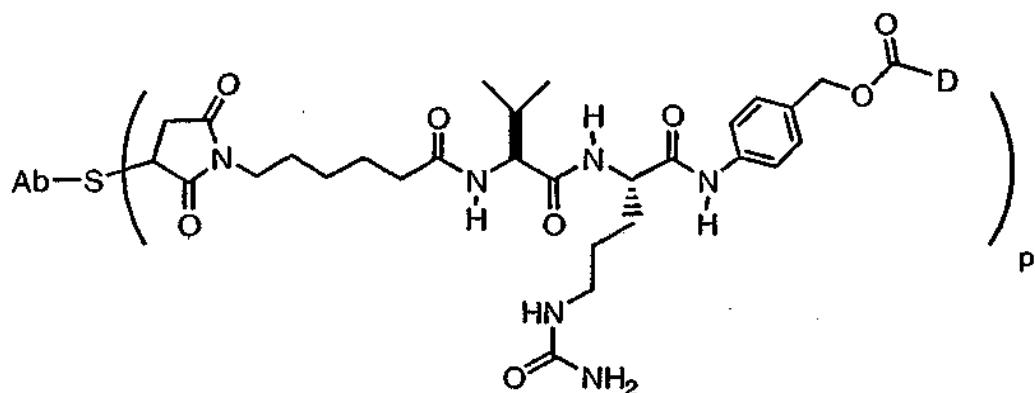


25

en las que w e y son cada uno 0,



y



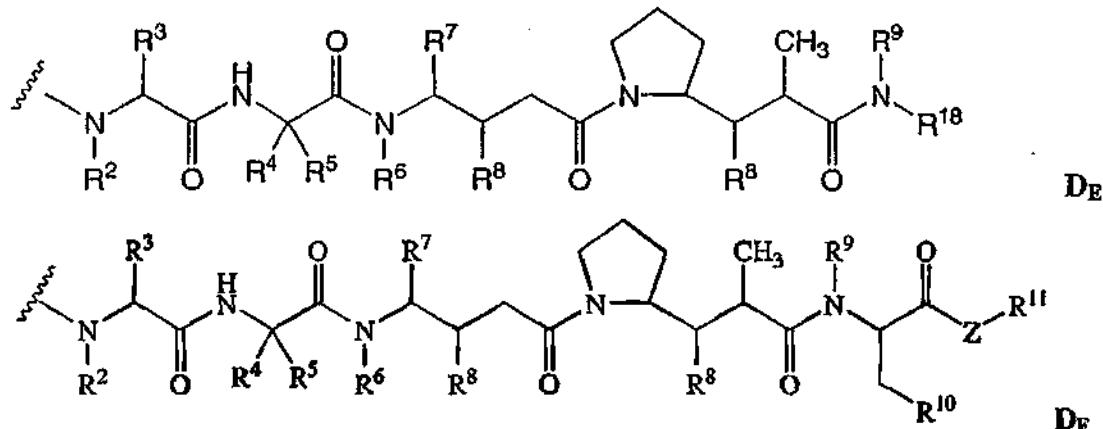
5

#### 4.4 LA UNIDAD FÁRMACO (RESTO)

- 10 El resto de fármaco (D) de los conjugados de anticuerpo fármaco (ADC) son los del tipo dolastatina/auristatina (Patentes de Estados Unidos Nº 5635483; Nº 5780588) que se ha mostrado que interfieren con la dinámica de microtúbulos, hidrólisis de GTP, y división nuclear y celular (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents y Chemother. 45 (12): 3580-3584) y tienen actividad anticáncer (Patente de Estados Unidos Nº 5663149) y antifúngica (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2961-2965).
- 15 D es una unidad de Fármaco (resto) que tiene un átomo de nitrógeno que puede formar un enlace con la unidad Espaciadora cuando y = 1 o 2, con el grupo carboxilo C-terminal de una unidad Aminoácido cuando y = 0, con el grupo carboxilo de una unidad Bastidor cuando w e y = 0, y con el grupo carboxilo de una unidad de Fármaco cuando a, w, e y = 0. se debe observar que las expresiones "unidad de fármaco" y "resto de fármaco" son sinónimos

y se usan indistintamente en el presente documento.

En un ejemplo, -D es cualquiera de las fórmulas D<sub>E</sub> o D<sub>F</sub>:



en las que, independientemente en cada ubicación:

- 10      R<sup>2</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
       R<sup>3</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);  
       R<sup>4</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);  
       R<sup>5</sup> se selecciona entre H y metilo;  
       o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> conjuntamente forman un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>- en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre 2,3,4,5 y 6;  
       R<sup>6</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
       R<sup>7</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>; arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);  
       20     cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);  
       R<sup>9</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
       R<sup>10</sup> se selecciona entre arilo o heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>;  
       Z es O, S, NH o NR<sup>12</sup>, en el que R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
       25     R<sup>11</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, arilo, heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup> o -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>;  
       m es un número entero que varía entre 1-1000;  
       R<sup>13</sup> es alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>;  
       R<sup>14</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
       30     cada aparición de R<sup>15</sup> es independientemente H, COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
       cada aparición de R<sup>16</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH;  
       R<sup>18</sup> se selecciona entre -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-arilo, -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), y -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); y  
       n es un número entero que varía de 0 a 6.  
       35     En un ejemplo, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente isopropilo o sec-butilo y R<sup>5</sup> es -H. En un ejemplo particular, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>5</sup> es H, y R<sup>7</sup> es sec-butilo.  
       En otro ejemplo, R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno metilo, y R<sup>9</sup> es H.  
       40     Además, en otro ejemplo, cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCH<sub>3</sub>.  
       En un ejemplo particular, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno metilo, R<sup>5</sup> es H, R<sup>7</sup> es sec-butilo, cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCH<sub>3</sub>, y R<sup>9</sup> es H.  
       45     En un ejemplo, Z es -O- o -NH-.  
       En un ejemplo, R<sup>10</sup> es arilo.  
       50     En un ejemplo particular, R<sup>10</sup> es fenilo.

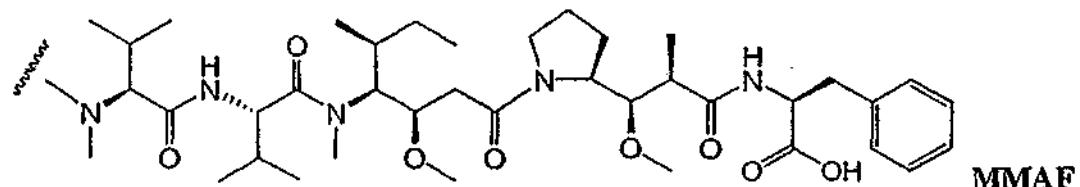
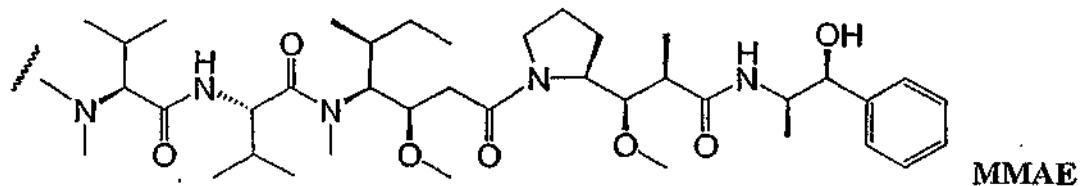
En un ejemplo particular, cuando Z es -O-, R<sup>11</sup> es H, metilo o t-butilo.

En un ejemplo particular, cuando Z es -NH, R<sup>11</sup> es -CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>, en el que R<sup>15</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, y R<sup>16</sup> es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH.

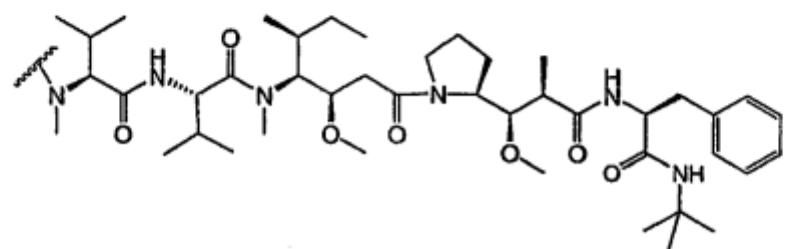
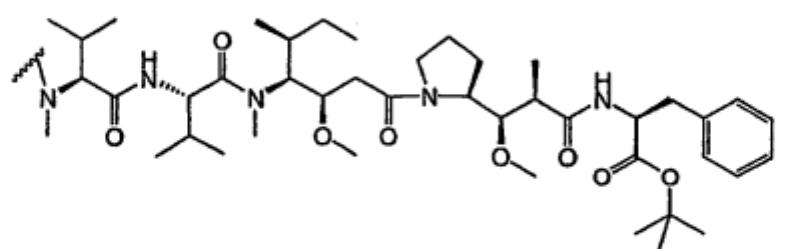
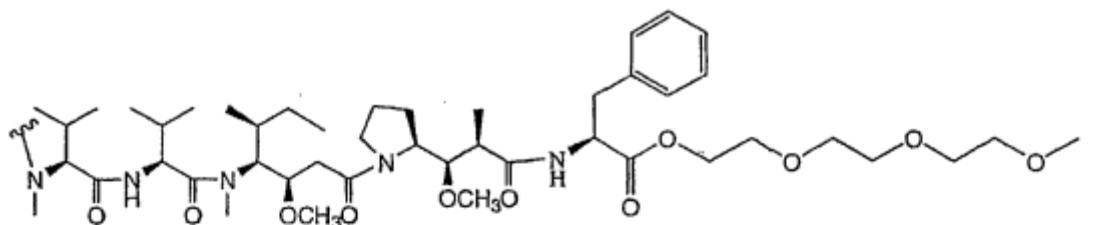
5

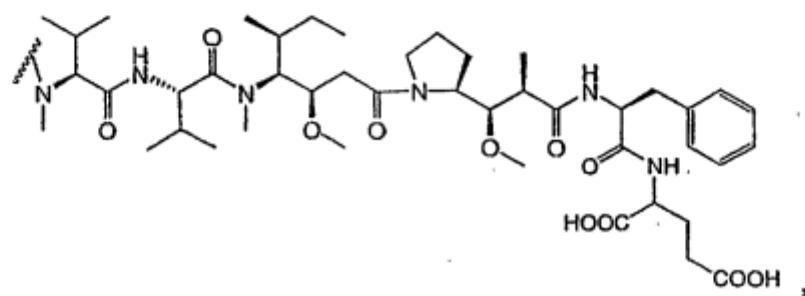
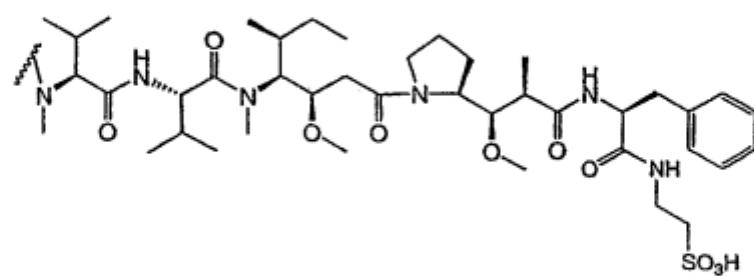
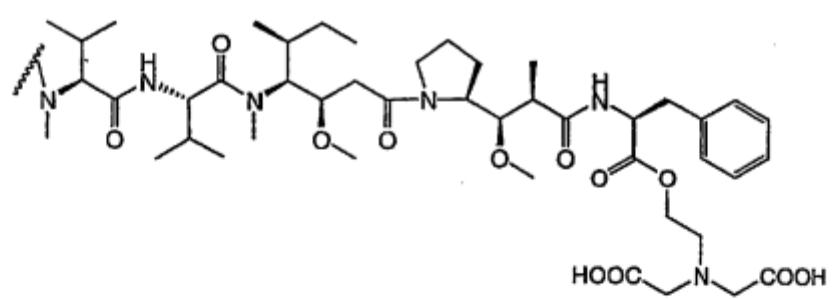
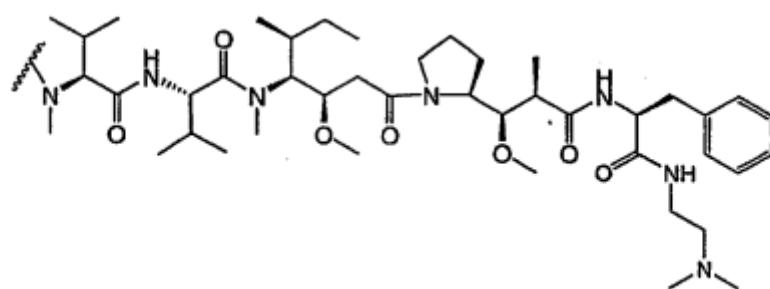
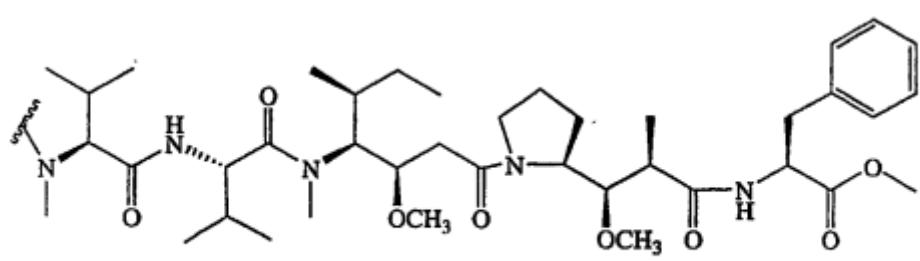
En otro ejemplo, cuando Z es -NH, R<sup>11</sup> es -CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>, en el que R<sup>15</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H.

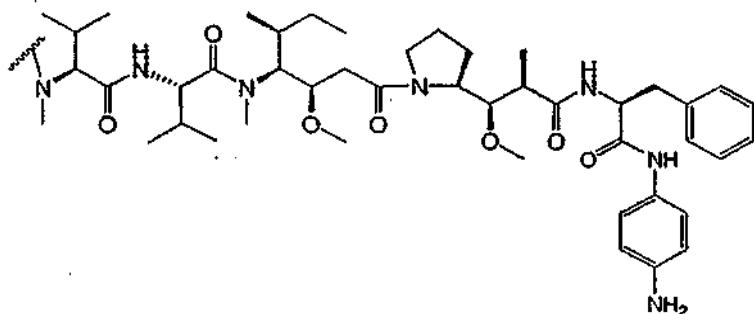
Unidades de Fármaco (-D) a modo de ejemplo incluyen las unidades de fármaco que tiene las siguientes estructuras:



10







y sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de las mismas.

- 5 Los grupos hidrófilos, como tales, pero no limitados a ésteres de trietilenglicol (TEG), como se ha mostrado anteriormente, se pueden unir a la Unidad de Fármaco en R<sup>11</sup>. Sin quedar ligado a la teoría, los grupos hidrófilos ayudan en la internalización y no aglomeración de la Unidad de Fármaco.

#### 4.5 LA UNIDAD LIGANDO

- 10 La unidad Ligando (L-) incluye dentro de su alcance cualquier unidad de un Ligando (L) que se una o que se asocie de forma reactiva o que forme complejos con un receptor, antígeno u otro resto receptor asociado con una relación dada de células diana. Un Ligando es una molécula que se une a, forma complejos con, o reacciona con un resto de una población celular que se trata de modificar terapéuticamente o de otro modo biológicamente. En un aspecto, la unidad Ligando actúa para administrar la unidad de Fármaco a la población de células diana en particular con la que reacciona la unidad Ligando. Dichos Ligandos incluyen, pero no se limitan a, proteínas de alto peso molecular tales como, por ejemplo, anticuerpos de longitud total, fragmento de anticuerpos, proteínas de peso molecular más pequeño, polipéptidos o péptidos, lectinas, glicoproteínas, no péptidos, vitaminas, moléculas vehículoas de nutrientes (tales como, pero no limitadas a, transferrina), o cualquier otra molécula o sustancia de unión a células.
- 15 Una unidad Ligando puede formar un enlace con una unidad Bastidor, una unidad Aminoácido, una Unidad Espaciadora, o una Unidad Fármaco. Una unidad Ligando puede formar un enlace con una unidad Conectora a través de un heteroátomo del Ligando. Los heteroátomos que pueden estar presentes en una unidad Ligando incluyen azufre (en una realización, de un grupo sulfhidrilo de un Ligando), oxígeno (en una realización, de un grupo carbonilo, carboxilo o hidroxilo de un Ligando) y nitrógeno (en una realización, de un grupo amino primario o secundario de un Ligando). Estos heteroátomos pueden estar presentes en el Ligando en el estado natural del Ligando, por ejemplo un anticuerpo de origen natural, o se pueden introducir en el Ligando a través de modificación química.
- 20 25 30 35 40 45 50
- En un ejemplo, un Ligando tiene un grupo sulfhidrilo y el Ligando se une a la unidad Conectora a través del átomo de azufre del grupo sulfhidrilo.
- En otro ejemplo más, el Ligando tiene uno o más restos de lisina que se pueden modificar químicamente para introducir uno o más grupos sulfhidrilo. La unidad Ligando se une a la unidad Conectora a través del átomo de azufre del grupo sulfhidrilo. Los reactivos que se pueden usar para modificar lisinas incluyen, pero no se limitan a, S-acetilitoacetato de N-succinimidilo (SATA) y Clorhidrato de 2-iminotiolano (Reactivio de Traut).
- En otro ejemplo, el Ligando puede tener uno o más grupos de hidrato de carbono que se puede modificar químicamente para que tengan uno o más grupos sulfhidrilo. La unidad Ligando se une a la Unidad Conectora, tal como la Unidad Bastidor, a través del átomo de azufre del grupo sulfhidrilo.
- En otro ejemplo más, el Ligando puede tener uno o más grupos de hidratos de carbono que se pueden oxidar para proporcionar un grupo aldehído (-CHO) (véase, por ejemplo Laguzza, et al., J. Med. Chem. 1989, 32 (3), 548-55). El aldehído correspondiente puede formar un enlace con un Sitio Reactivo en un Bastidor. Los sitios reactivos en un Bastidor que pueden reaccionar con a grupo carbonilo en un Ligando incluyen, pero no se limitan a, hidrazina e hidroxilamina. Otros protocolos para la modificación de proteínas para la unión o asociación de Unidades de Fármaco se describen en Coligan et al., Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley & Sons (2002), que se incorpora en el presente documento por referencia.
- Ligandos útiles no inmunoreactivos de proteína, polipéptido, o péptido incluyen, pero no se limitan a, transferrina, factores de crecimiento epidérmico ("EGF"), bombesina, gastrina, péptido de liberación de gastrina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, IL-2, IL-6, factores de crecimiento transformantes ("TGF"), tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , factor de crecimiento de vaccinia ("VGF"), factores de crecimiento I y II insulínicos y de tipo insulínico, lectinas y apoproteína de lipoproteína de baja densidad.

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

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

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

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

De acuerdo con un enfoque diferente, dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se condensan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones C<sub>H</sub>2, y C<sub>H</sub>3, bisagra. Es preferente que la primera región constante de cadena pesada (C<sub>H</sub>1) que contiene el sitio necesario para unión a la cadena ligera, esté presente en al menos una de las fusiones. Los ácidos nucleicos con secuencias que codifican las fusiones de cadenas pesadas de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Ésto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación para dos o todas las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado altos rendimientos cuando las relaciones no son particularmente significativas.

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

Para detalles adicionales para generar anticuerpos biespecíficos véanse, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 1986, 121: 210; Rodrigues et al., 1993, *J. of Immunology* 151: 6954-6961; Carter et al., 1992, *Bio/Technology* 10: 163-167; Carter et al., 1995, *J. of Hemotherapy* 4: 463-470; Merchant et al., 1998, *Nature Biotechnology* 16: 677-681. Usando dichas técnicas, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades tal como se define en el presente documento.

Además, se describen anticuerpos bifuncionales, en Publicación de Patente Europea Nº EPA 0 105 360. Tal como se desvela en esta referencia, los anticuerpos híbridos o bifuncionales se pueden derivar biológicamente, es decir, mediante técnicas de fusión celular, o químicamente, especialmente con agentes de reticulación o reactivos formadores de puentes disulfuro, y puede comprender anticuerpos enteros o fragmentos de los mismos. Métodos para obtener dichos anticuerpos híbridos se desvelan por ejemplo, en la Publicación Internacional WO 83/03679, y en la Publicación de Patente Europea Nº EPA 0 217 577.

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

Otros anticuerpos útiles incluyen fragmentos de anticuerpos tales como, pero no limitados a, fragmentos de F(ab')<sub>2</sub>, que contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada que se pueden producir por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y fragmentos de Fab, que se pueden generar por reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos de F(ab')<sub>2</sub>. Otros anticuerpos útiles son dímeros de cadena pesada y de cadena ligera de anticuerpos, o cualquier fragmento mínimo de los mismos tales como Fvs o anticuerpos de una sola cadena single (SCA) (*por ejemplo*, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 4946778; Bird, 1988, Science 242: 423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; y Ward et al., 1989, Nature 334: 544-54), o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo.

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

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables y se pueden producir usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes endógenos de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, pero que pueden expresar genes humanos de cadena pesada y ligera. Los ratones transgénicos e inmuran de la forma habitual con un抗igeno seleccionado, *por ejemplo*, toda o una porción de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos frente al抗igeno se pueden obtener usando tecnología convencional de hibridomas. Los transgenes de inmunoglobulina humana alojados en los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de linfocitos B, y posteriormente experimentan intercambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión de conjunto de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93). Para un análisis detallado de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, *por ejemplo*, las Patentes de Estados Unidos Nº 5625126; Nº 5633425; Nº 5569825; Nº 5661016; Nº 5545806. Los anticuerpos humanos pueden obtener en el mercado en, *por ejemplo*, Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Genpharm (San Jose, CA).

Los anticuerpos totalmente humanos que reconocen un epítopo seleccionado se pueden generar usando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, *por ejemplo*, un anticuerpo de ratón, se usa para guiar la selección de un anticuerpo totalmente humano que reconoce el

5 mismo epítopo. (Jespers et al. (1994) Biotechnology 12: 899-903). Los anticuerpos humanos tales se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la materia, que incluyen bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991); Quan, M. P. y Carter, P. 2002. The rise of monoclonal antibodies as therapeutics. In Anti-IgE and Allergic Disease, Jardieu, P. M. y Fick Jr., R. B, eds., Marcel Dekker, Nueva York, NY, Capítulo 20, páginas 427-469).

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

15 15 Los anticuerpos incluyen análogos y derivados que están modificados, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula siempre y cuando dicha unión covalente permita que el anticuerpo retenga su inmunoespecificidad de unión a antígenos. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados y análogos de los anticuerpos incluyen los que se han modificado adicionalmente, *por ejemplo*, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a una unidad de anticuerpo celular u otra proteína, etc. Se puede realizar cualquiera de numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc. Además, el análogo derivado por contener uno o más aminoácidos no naturales.

20 20 25 Los anticuerpos incluyen anticuerpos que tienen modificaciones (*por ejemplo*, sustituciones, supresiones o adiciones) en restos de aminoácidos que interactúan con receptores Fc. En particular, los anticuerpos incluyen anticuerpos que tienen modificaciones en restos de aminoácidos que se identifican como implicados en la interacción entre el dominio anti-Fc y el receptor FcRn (véase, *por ejemplo*, Publicación Internacional Nº WO 97/34631). Los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa se pueden obtener en el mercado, por ejemplo, en Genentech (San Francisco, CA) o se pueden producir mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, *por ejemplo*, técnicas de síntesis química o de expresión recombinante. La secuencia de nucleótidos que codifica anticuerpos y específicos para un antígeno de célula cancerosa se puede obtener, *por ejemplo*, a partir de la base de datos de GenBank o una base de datos similar a ésta, las publicaciones de bibliografía, o mediante clonación y secuenciación de rutina.

30 30 35 40 45 50 55 60 65 Los anticuerpos incluyen anticuerpos que tienen modificaciones (*por ejemplo*, sustituciones, supresiones o adiciones) en restos de aminoácidos que interactúan con receptores Fc. En particular, los anticuerpos incluyen anticuerpos que tienen modificaciones en restos de aminoácidos que se identifican como implicados en la interacción entre el dominio anti-Fc y el receptor FcRn (véase, *por ejemplo*, Publicación Internacional Nº WO 97/34631). Los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa se pueden obtener en el mercado, por ejemplo, en Genentech (San Francisco, CA) o se pueden producir mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, *por ejemplo*, técnicas de síntesis química o de expresión recombinante. La secuencia de nucleótidos que codifica anticuerpos y específicos para un antígeno de célula cancerosa se puede obtener, *por ejemplo*, a partir de la base de datos de GenBank o una base de datos similar a ésta, las publicaciones de bibliografía, o mediante clonación y secuenciación de rutina. Ejemplos de anticuerpos disponibles para el tratamiento del cáncer incluyen, pero no se limitan a, anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado, HERCEPTIN® (trastuzumab; Genentech) para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico; RITUXAN® (rituximab; Genentech) que es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 químérico para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin; OvaRex (AltaRex Corporation, MA) que es un anticuerpo de murino para el tratamiento de cáncer de ovarios; Panorex (Glaxo Wellcome, NC) que es un anticuerpo IgG<sub>2a</sub> de murino para el tratamiento de cáncer colorrectal; Cetuximab Erbitux (Imclone Systems Inc., NY) que es un anticuerpo químérico IgG anti-EGFR para el tratamiento de cánceres positivos para el factor de crecimiento epidérmico, tales como cáncer de cabeza y cuello; Vitaxin (MedImmune, Inc., MD) que es un anticuerpo humanizado para el tratamiento de sarcoma; Campath I/H (Leukosite, MA) que es un anticuerpo IgG<sub>1</sub> humanizado para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica (CLL); Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado para el tratamiento de leucemia mieloide aguda (AML); LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ) que es un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado para el tratamiento de linfoma no Hodgkin; Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo anti-HLA-DR humanizado para el tratamiento de linfoma no Hodgkin; Oncolym (Techniclon, Inc., CA) que es un anticuerpo anti-HLA-Dr10 de murino radiomarcado para el tratamiento de linfoma no Hodgkin; Allomune (BioTransplant, CA) es un mAb anti-CD2 humanizado para el tratamiento de Enfermedad de Hodgkin o linfoma no Hodgkin; Avastin (Genentech, Inc., CA) que es un anticuerpo humanizado anti-VEGF para el tratamiento de cánceres de pulmón y colorrectales; Epratuzumab (Immunomedics, Inc., NJ and Amgen, CA) que es un anticuerpo anti-CD22 para el tratamiento de linfoma no Hodgkin; y CEAcide (Immunomedics, NJ) que es un anticuerpo anti-CEA humanizado para el tratamiento de cáncer colorrectal.

Otros anticuerpos útiles en el tratamiento del cáncer incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos frente a los siguientes antígenos: CA125 (ovarios), CA15-3 (carcinomas), CA19-9 (carcinomas), L6 (carcinomas), Lewis Y (carcinomas), Lewis X (carcinomas), alfa fetoproteína (carcinomas), CA 242 (colorrectal), fosfatasa alcalina placentaria (carcinomas), antígeno específico de próstata (próstata), fosfatasa ácida prostática (próstata), factor de crecimiento epidérmico (carcinomas), MAGE-1 (carcinomas), MAGE-2 (carcinomas), MAGE-3 (carcinomas), MAGE-4 (carcinomas), receptor de anti-transferrina (carcinomas), p97 (melanoma), MUC1-KLH (cáncer de mama), CEA

(colorrectal), gp100 (melanoma), MART1 (melanoma), PSA (próstata), IL-2 receptor (leucemia y linfomas de linfocitos T), CD20 (linfoma no Hodgkin), CD52 (leucemia), CD33 (leucemia), CD22 (linfoma), gonadotropina coriónica humana (carcinoma), CD38 (mieloma múltiple), CD40 (linfoma), mucina (carcinomas), P21 (carcinomas), MPG (melanoma), y producto oncogenético Neu (carcinomas). Algunos anticuerpos útiles, específicos incluyen, pero

- 5 no se limitan a, mAb BR96 (Trailo, P. A., Willner, D. Lasch, S. J., Henderson, A. J., Hofstead, S. J., Casazza, A. M., Firestone, R. A., Hellström, I., Hellström, K. E., "Cure of Xenografted Human Carcinomas by BR96-Doxorubicin Immunoconjugates" Science 1993, 261, 212-215), BR64 (Trailo, PA, Willner, D, Knipe, J., Henderson, A. J. Lasch, S. J., Zoekler, M. E., Trailsmith, M. D., Doyle, T. W., King, H. D., Casazza, A. M., Braslawsky, G. R., Brown, J. P., Hofstead, S. J., (Greenfield, R. S., Firestone, R. A., Mosure, K., Kadow, D. F., Yang, M. B., Hellstrom, K. E., y Hellstrom, I. "Effect of Linker Variation on the Stability, Potency, and Efficacy of Carcinoma-reactive BR64-Doxorubicin Immunoconjugates" Cancer Research 1997, 57, 100-105, mAb frente al antígeno CD40, tales como mAb S2C6 (Francisco, J. A., Donaldson, K. L., Chace, D., Siegall, C. B., y Wahl, A. F. "Agonistic properties and in vivo antitumor activity of the anti-CD-40 antibody, SGN-14" Cancer Res. 2000, 60, 3225-3231), mAb frente al antígeno CD70, tales como mAb 1F6 y mAb 2F2, y mAb frente al antígeno CD30, tales como AC10 (Bowen, M. A., Olsen, K. J., Cheng, L., Avila, D., y Podack, E. R. "Functional effects of CD30 on a large granular lymphoma cell line YT" J. Immunol., 151, 5896-5906, 1993; Wahl et al., 2002 Cancer Res. 62 (13): 3736-42). Se pueden usar otros muchos anticuerpos de internalización que se unen a antígenos asociados a tumores y se han revisado (Franke, A. E., Sievers, E. L., y Scheinberg, D. A., "Cell surface receptor-targeted therapy of acute myeloid leucemia: a review" Cancer Biother Radiopharm. 2000, 15, 459-76; Murray, J. L., "Monoclonal antibody treatment of solid tumors: a coming of age" Semin Oncol. 2000, 27, 64-70; Breitling, F., y Dubel, S., Recombinant Antibodies, John Wiley, y Sons, Nueva York, 1998).
- 10
- 15
- 20

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

- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50

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

55

60

65

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

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

- 55
- 60
- 65

En otro ejemplo específico, los Ligandos inmuunoespecíficos útiles para un antígeno viral o microbiano son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales químicos, humanizados o humanos. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "antígeno viral" incluye, pero no se limita a, cualquier péptido viral, proteína polipeptídica (*por ejemplo*, VIH gp120, VIH nef, glicoproteína RSV F, virus de la gripe neuramidasa, hemaglutinina del virus de la gripe, HTLV tax, glicoproteína del virus del herpes simplex (*por ejemplo*, gB, gC, gD, y gE) y antígeno de superficie de hepatitis B) que es capaz de provocar una respuesta inmune. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "antígeno microbiano" incluye pero no se limita a, cualquier péptido microbiano, polipéptido, proteína, sacárido, polisacárido, o molécula de lípido (*por ejemplo*, un polipéptido bacteriano, fúngico, protozoo patógeno, o levadura que incluye, *por ejemplo*, polisacárido 5/8 LPS y capsular) que es capaz de provocar una respuesta inmune.

- Los anticuerpos inmunoespecíficos para un agente viral o microbiano se pueden obtener en el mercado, por ejemplo, en BD Biosciences (San Francisco, CA), Chemicon International, Inc. (Temecula, CA), o Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA) o producir mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal y como, *por ejemplo*, técnicas de síntesis química o de expresión recombinante. La secuencia de nucleótidos que codifica anticuerpos que son inmunoespecíficos para un agente viral o microbiano se puede obtener, *por ejemplo*, a partir de la base de datos de GenBank o una base de datos similar a ésta, publicaciones de bibliografía, o mediante clonación y secuenciación de rutina.
- En un ejemplo específico, útil Ligandos son los que son útiles para el tratamiento con la prevención de una infección vírica o microbiana de acuerdo con los métodos que se desvelan en el presente documento. Ejemplos de anticuerpos disponibles útiles para el tratamiento de sección vírica o infección bacteriana incluyen, pero no se limitan a, SYNAGIS (MedImmune, Inc., MD) que es un anticuerpo monoclonal de virus sincitial anti-respiratorio humanizado (RSV) útil para el tratamiento de pacientes con infección por RSV; PRO542 (Progenics) que es un anticuerpo de fusión de CD4 útil para el tratamiento de infección por VIH; OSTAVIR (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo humano útil para el tratamiento de virus de la hepatitis B; PROTOVIR (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo IgG<sub>1</sub> humanizado útil para el tratamiento de citomegalovirus (CMV); y anticuerpos anti-LPS.
- Otros anticuerpos útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos frente a los antígenos de cepas patogénicas de bacterias (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromotis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter (Vibrio) fetus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Treponema carateum*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma spp.*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia tsutsugamushi*, *Chlamydia spp.*; hongos patógenos (*Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*); protozoa (*Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Pneumocystis pneumonia*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*); o Helmintos (*Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, y anquilostomas).
- Otros anticuerpos para el tratamiento de enfermedades víricas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos frente a antígenos del virus patógenos, que incluyen como ejemplos y no como limitación: *Poxviridae*, *Herpesviridae*, virus 1 del *Herpes Simplex*, virus 2 del *Herpes Simplex*, *Adenoviridae*, *Papovaviridae*, *Enteroviridae*, *Picornaviridae*, *Parvoviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae*, virus de la gripe, virus de parainfluenza, paperas, sarampión, virus sincitial respiratorio, rubéola, *Arboviridae*, *Rhabdoviridae*, *Arenaviridae*, virus de la Hepatitis A, virus de la Hepatitis B, virus de la Hepatitis C, virus de la Hepatitis E, virus de la Hepatitis No A/No B, *Rhinoviridae*, *Coronaviridae*, *Rotoviridae*, y *Virus de Inmunodeficiencia Humana*.
- En intentos para descubrir dianas celulares eficaces para diagnósticos y terapia de cáncer, los investigadores han buscado identificar polipéptidos transmembrana o asociados de otro modo a tumores que se expresan específicamente en la superficie de uno o más tipos de cáncer en particular en comparación con una o más células no cancerosas normales. A menudo, dichos polipéptidos asociados a tumores se expresan más abundantemente la superficie de las células cancerosas en comparación con la expresión en la superficie de las células no cancerosas. La identificación de dichos polipéptidos antigenéticos de superficie celular asociada a tumores ha dado lugar a la capacidad de dirigir específicamente células cancerosas para destrucción través de terapias basadas en anticuerpos.
- Los anticuerpos que comprenden Ab en conjugados de anticuerpo y fármaco de Fórmula Ic (ADC) y que pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos frente a antígenos asociados a tumores (TAA). Dichos antígenos asociados a tumores son conocidos en la técnica, y se pueden preparar para su uso en la generación de anticuerpos usando métodos e información que son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de TAA incluyen (1)-(35), pero no se limitan a TAA (1)-(35) que se indican a continuación. Por conveniencia, la información con respecto a estos antígenos, todos los cuales son conocidos en la técnica, se enumeran a continuación e incluye nombres, nombres alternativos, números de acceso en Genbank y referencia o referencias primarias. Los antígenos asociados a tumores dirigidos por anticuerpos incluyen todas las variantes secuencias de aminoácidos que isoformas que poseen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, o un 95 % con respecto a las secuencias identificadas en las correspondientes secuencias enumeradas (SEC ID N°: 1-35) o las secuencias identificadas en las referencias citadas. En algunos ejemplos, TAA que tiene variantes de secuencia de aminoácidos es capaz de unirse específicamente un anticuerpo que se une específicamente a los TAA con la correspondiente secuencia enumerada. Las secuencias y divulgación mencionadas específicamente en el presente documento se incorporan expresamente por referencia.

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

5 Bmpr1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB, Nº de acceso en Genbank NM\_001203, ten Dijke,P., et al. Science 264 (5155): 101-104 (1994), Oncogene 14 (11): 1377-1382 (1997)); documento WO2004063362 (Reivindicación 2); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); US2003134790-A1 (Páginas 38-39); documento WO2002102235 (Reivindicación 13; Página 296); documento WO2003055443 (Páginas 91-92); documento WO200299122 (Ejemplo 2; Páginas 528-530); documento WO2003029421 (Reivindicación 6); documento WO2003024392 (Reivindicación 2; Fig 112); documento WO200298358 (Reivindicación 1; Página 183); documento WO200254940 (Páginas 100-101); documento WO200259377 (Páginas 349-350); documento WO200230268 (Reivindicación 27; Página 376); documento WO200148204 (Ejemplo; Fig 4) receptor de proteína morfogenética ósea NP\_001194, tipo IB /pid = NP\_001194.1 – Referencias cruzadas: MIM:603248; NP\_001194.1; NM\_001203\_1  
502 aa

10 MLLRSAGKLNVGTKKEDGEASTAPTPRPKVLRKCKHHCPEDSVNNICSTDGYCFTMIEED  
DSGLPVVTSGCLGLEGSDFQCRDTPIPHQRSSIECCTERNECNKDLHPTLPPLKNRDFVD  
GPIIHRALLISVTVCSSLVLILFCYFRYKRQETPRYSIGLEQDETYIPPGESLRDLI  
EQSQSSGSGSGLPLLVQRTIAKQIQMVKQIGKGRYGEVWMGKWRGEKVAVKVFFTTEEAS  
WFRETEIYQTVLMRHENILGFIAADIKGTGWTQLYLITDYHENGSLYDYLKSTTLDAKS  
MLKLAYSSVSGLCHLHTEIFSTQGKPAIAHRLDKSKNIVKKNGTCCIADLGLAVKFISD  
TNEVDIPPNTRVGKRYMPPEVLDESLNRNHFQSYIMADMYSFGLLILWEVARRCVSGGIV  
EEYQLPYHDLVPSDPSYEDMREIVCIKKLRPSFPNRWSSDECLRQMGKLMTECWAHPAS  
15 RLTALRVKKTLAKMSESQDIKL

(SEQ ID NO: 1)

20 (2) E16 (LAT1, SLC7A5, Nº de acceso en Genbank NM\_003486); Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999), Nature 395 (6699): 288-291 (1998), Gaugitsch,H.W., et al. (1992) J. Biol. Chem. 267 (16): 11267-11273); documento WO2004048938 (Ejemplo 2); documento WO2004032842 (Ejemplo IV); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento WO2003016475 (Reivindicación 1); documento WO200278524 (Ejemplo 2); documento WO200299074 (Reivindicación 19; Páginas 127-129); documento WO200286443 (Reivindicación 27; Páginas 222,393); documento WO2003003906 (Reivindicación 10; Página 293); documento WO200264798 (Reivindicación 33; Página 93-95); documento WO200014228 (Reivindicación 5; Páginas 133-136); US2003224454 (Fig 3); documento WO2003025138 (Reivindicación 12; Página 150); familia 7 de vehículos de soluto NP\_003477 (vehículo catiónico de aminoácidos, sistema y+), miembro 5 /pid = NP\_003477.3 – Referencias cruzadas de Homo sapiens: MIM:600182; NP\_003477.3; NM\_015923; NM\_003486\_1  
507 aa

30 MAGAGPKRRALAAPAAEKEEAREKMLAAKSADGSAPAGEGEGVTLQRNITLLNGVAIIV  
GTIIGSGIFVTPTGVLKAEAGSPGLALVVAAACGVFSIVGALCYAELGTTISKSGGDYAYM  
LEVYGSPLAFLKLWIELLIIRPSSQYIVALVFATYLLKPLFPTCPVPEEAALKVACL  
LLTAVNCYSVKAATRVQDAAAKLLALALIILLGFVQIGKGVVSNLDNFNSFEGTKLDV  
GNIVLALYSGLFAYGGWNYLNFTVTEEMINPYRNPLAIIISLPIVTLVVLTNLAYFTTL  
STEQMLSSEAVAVDFGNYHLGVMSWIIPVFVGLSCFGSVNGSLFTSSRLFFVGSREGHLP  
SILSMIHPQLLTPVPSLVFTCVMTLLYAFSKDIFSVINFFSFFNWLCVALAIIGMIWLH  
RKPELERPIKVNLA LPVFFILACLFIAVSFWKTPVECGIGFTIILSGLPVYFFGVWWKN  
KPKWLLQGIFSTTVLCQKLMQVVPQET

(SEQ ID NO: 2)

35 (3) STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata, Nº de acceso en Genbank NM\_012449  
Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96 (25): 14523-14528);  
documento WO2004065577 (Reivindicación 6); documento WO2004027049 (Fig 1L); documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento WO2004016225 (Reivindicación 2);  
documento WO2003042661 (Reivindicación 12); US2003157089 (Ejemplo 5); US2003185830 (Ejemplo 5);

US2003064397 (Fig 2); documento WO200289747 (Ejemplo 5; Páginas 618-619); documento WO2003022995 (Ejemplo 9; Fig 13A, Ejemplo 53; Páginas 173, Ejemplo 2; Fig 2A); antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata NP\_036581  
Referencias cruzadas: MIM:604415; NP\_036581.1; NM\_012449\_1

5 309 aa

```
MESRKDITNQEELWKMKPRRNLEEDDYLHKDTGETSMLKRPVLLHLHQTAHAEFDCPSE
LQHTQELFPQWHLPIKIAIIASLTFLYTLREVIHPLATSHQQYFYKIPILVINKVLPM
VSITLLALVYLPGVIAAIIVQLHNGTKYKKFPHWLDKWMLTRKQFGLLSFFFAVLHAIYSL
SYPMRRSYRYKLLNWAYQQVQQNKEDAWIEHDVWRMEIYVSLGIVGLAILALLAVTSIPS
VSDSLTWREFHYIQSKLGIVSLLLGTIHALIFAWNKWIDIKQFVWYTPPTFMIAVFLPIV
VLIFKSILFLPCLRKKILKIRHGWEVTKINKTEICSQL
```

(SEQ ID NO: 3)

10 (4) 0772P (CA125, MUC16, Nº de acceso en Genbank AF361486

J. Biol. Chem. 276 (29): 27371-27375 (2001)); documento WO2004045553 (Reivindicación 14); documento WO200292836 (Reivindicación 6; Fig 12); documento WO200283866 (Reivindicación 15; Páginas 116-121); documento US2003124140 (Ejemplo 16); documento US2003091580 (Reivindicación 6); documento WO200206317 (Reivindicación 6; Páginas 400-408);

15 Referencias cruzadas: GI:34501467; AAK74120.3; AF361486\_1  
6995 aa

```
PVTSLLTPGLVITTDRMGISREPGBTTSNLSSTSHRLTTLEDTVDTEAMQPSTHTAVT
NVRTSISGHESQSSVLSDSETPKATSPMGTYYTMGETSVSISTSDFETSRQIEPTSSL
TSGLRETSSSERISSATEGSTVLSVPMSGATTEVSRTVEVISSRGTSMSGPDQFTISPDIS
TEAITRLSTSPIMTESAESAITIETGSPGATSEGTLTLDSTTFWSGTHSTASPGFSHS
EMTTLMSRTPGDVPWPSPSLPSVEASSVSSSLSSPAMTSTSFFSTLPESISSSPHPVTALL
TLGPVKTTDMLRTSSEPETSSPPNLSSTSAEILATSEVTKDREKIHPSSNTPVNVGTVI
YKHLSPSSVLAIDLVTTPKTSPMATTSTLGNTSVSTSTPAFPETMMTQPTSSLTSGLREIS
TSQETSSATERSASLSGMPGTAKVSRTEALSLGRTSTPGPAQSTISPEISTETITRIS
TPLTTGSAEMTITPKTGHSGASSQGFTLDTSSRASWPGTHSAATHRSPHSGMTTPMSR
GPEDVSWPSRSPSVEKTSPPSSLVSLSAVTSPSPLYSTPSESSHSSPLRVTSLFTPVMMMKT
TDMLDTSLEPVTTSPPSMNITSDESLATSKATMETRAIQLENTAVTQMGTIARQEFYS
SYPLGLPEPSKVTSPVVTSSSTIKDIVSTTIPASSEITRIEMESTSTLTPPRETSTSQEIK
SATKPSTVPYKALTSAIEDSMTQVMSSSRGPSPDQSTMQDISTEVITRLSTSPIKTES
TEMITTQTGSPGATSRGTLTLDSTTFMSGTHSTASQGFSHSQMTALMSRTPGEVPWLS
HPSVEEASSASFSLSSPVMTSSSPVSSTLPDSIHSSLPVTSLLTSGLVKTTELLGTSSE
PETSSPPNLSSSTSAEILATTEVTTDTEKLEMNTNVVTSGYTHESPSSVLADEVTTKATSSM
GITYPTGDTNVLTPAFSDTSRIQTKSKLSLTPGLMETSISEETSSATEKSTVLSVPT
GATTEVSRTAEISSLRTSIPGPAQSTMSSDTSMETITRISTPLTRKESTDMAITPKTGPS
GATSGQFTLDSSSTAWPGTHSATTQRFPRTSVVTPMSRGPEDVSWPSPLSVEKNSPPS
SLVSSSSVTPSPPLYSTPSGSSHSSPVPVTSLFTSIMMKATDMLDASLEPETTSAPNMNI
TSDESLAASKATTETEAIHVFENTAASHVETTSATEELYSSSPGFSEPTKVISPVVTSSS
IRDNMVSTTMPGSSGITRIEIESMSSLTPGLRETRTSQDITSSTETSTVLYKMPGATPE
VSRTEVMPSSRTSIPGPAQSTMSDLISDEVVTRLSTSPIMTESAEITITQTGYSLATSQ
VTPLPLGTSMTFLSGTHSTMSQGLSHSEMTNLMSRGPELSWTSRPFVETTRSSSSLTSLP
LTTSLSPVSSTLLDSSPSSPLPVTSLLPGLVKTTEVLDTSSEPKTSSPNLSSSTSVEIP
ATSEIMTDTEKIHPSNTAVAKVRTSSVHESHSSVLADETTITIPSMGITSAVEDTTV
```

FTSNPAPFSETRRIPTEPTFSLTPGFRETSTSEETTSITETSAVLFGVPTSATTEVSMTEI  
 MSSNRTHIPDSDQSTMSPDIITEVIRLSSSSMMSESTQMTITQKSSPGATAQSTLTIA  
 TTTAPLARTHSTVPPRFLHSEMTTMSRSPENPSWKSSPFVEKTSSSSLLSPVTTSPS  
 VSSTLPQSIPSSFSVTSSLTPGMVKTTDTSTEPGTSLSPNLSGTSVEILAASEVTTDTE  
 KIHPSSSMAVTNVGGTSSGHELYSSSVIHSPESKATYPVGTPSSMAETSISTSMMPANFET  
 TGFEAEPPSHLTSLRKTNMSLDTSSVTPNTPSSPGSTHLLQSSKTDFTSSAKTSSPDW  
 PPASQYTEIPVDIITPFNASPSIESTGITSFPESRFTMSVTESTHHLSTDLLPSAETIS  
 TGTVMPSLSEAMTSFATTGVPRAISSGSSPFSRTESGPGDATLSTIAESLPSSTPVFSS  
 STFTTTDSSTIPALHEITSSSATPYRVDTSLGTESSTTEGRVMVSTLDTSQQPGRTSSS  
 PILDTRMTESELVGTVTSAVQVPSLSTRLTRTDGIMEHITKIPNEAAHRTIRPVKGQPOT  
 STSPASPKGLHTGGTKRMETTTALKTTSRATLTTSVYTPTLGTPLNAMSQ  
 MASTIPTEMIMITPYVFPDVPETTSSLATSLGAETSTALPRTTPSVNRESETTASLVSR  
 SGAERSPVIQTLDVSSSEPDTTASWVIHPAETIPTVSKTPNFFHSELDTVSSTATSHGA  
 DVSSAIPTNISPSELDAUTPLVTISGTDSTTFPTLTSPHETETRTWLTHPAETSSTI  
 PRТИПНFSHHESDATPSIATSPGAETSSAIPIMTVSPGAEDLVTSQLTSSGTDRNMTIPT  
 LTLSGPGEPKTIASLVTHPEAQTSIAPISTISPAVSRLVTSMTSLAAKTSTNRALTNS  
 PGEPATTVSLVTHSAQTSPVWTTSFIFHSKSDTTPSMTSHGAESSSAVPTPTVSTEV  
 PGVVTPLVTSSRAVISTTIPILTSPGEPETTPSMATSHGEEASSAIPTPTVSPGVPGVV  
 TSLVTSSRAVTSTTIPILTSPGEPETTPSMATSHGTEAGSAVPTVLPEVPGMVTSLVAS  
 SRAVTSTTLPTLTLSPGEETTPSMATSHGAEASSTVPTVSPGVGVPLVTSSSGVNS  
 TSIPTLILSPGELETTPSMATSHGAEASSAVPTVSPGVGVPLVTSSRAVTSTTI  
 ILTLLSSSEETTPSMATSHGVEASSAVLTVSPGVGVPLVTSSRAVTSTTI  
 DEPETTTSLVTHSEAKMISAIPTLGVSPVQGLVTSVLTSSGSETSAFSNLTVASSQPET  
 IDSWVAHPGEASSVVPTLTVSTGEPTNISLVTHPAESSSTLPRTSRFHSELDTMPS  
 TVTSPAEAASSAISTTISPGIPGVLTSLVTSSGRDISATFPTVPEPHSEATASWVTHP  
 AVTSTTVPRTPNYSHEPDTPSIATSPGAEATSDFPTITVSPDVPDMVTSQVTSQD  
 TSITIPTLTSSGEPETTTSFITYSETHSSAIPTLPVSPDASKMLTSLVISSGTDSTTT  
 FPTLTETPYEPETTAIQLIHPAETNTMVPRTTPKFHSKSDTLPVIAITSPGPEASSAVS  
 TTIISPDMSDLVTSVLPSSGTDSTTFPTLSETPYEPETTATWLTHPAETSTTVSGTIPN  
 FSHRGSDTAPSMVTSPGVDTSGVPTTIPPSIPGVVTSQVTSATDTSTAIPTLTPSPG  
 EPETTASSATHPGQTGFTVPIRTVPSSEPTMASWVTHPPQTSTPVSRSSFSHSSPD  
 ATPVMATSРТЕASSAVLTTISPGAPEMVTSQITSSGAATSTVPTLTHSPGMETTALL  
 STHPRTETSKTFPASTVFPQVSETTASLTIRPGAETSTALPTQTTSSLFTLLVTGTSRV  
 LSPTASPGVSAKTAPlSTHPGTETSTMIPTSTLIGLLETTGLLATSSAETSTSTLTLT  
 VSPAVSGLSSASITTDKPKQTVTSWNTETSPSVTSGVPPFESRTVTGTTMLIPSEMPPTP  
 KTSHGEGVSPPTILRTTMVEATNLATTGSSPTVAKTTTFNTLAGSLFTPPLTPGMSTLA  
 SESVTSRTSYNHRSWISTTSSYNRRYWTPATSTFVSPGISTSSIPSSTAATVPMFV  
 PFTLNFTITNLQYEDMRHPGSRKFNATERELQGLLKPLFRNNSLEYLYSGCRLASLRPE  
 KDSSATAVDAICTHRPDPEDLGDRERLYWELSNTNGIQELGPYTLDRNSLYVNGFTHR  
 SSMPTTSTPGTSTVDVGTSSPSPTTAGPLLMPFTLNFTITNLQYEDMRRTGSRK  
 FNTMESVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGLN  
 REQLYWELSKLTNDIEELGPYTLDRNSLYVNGFTHQSSVTTSTPGTSTVDLRTSGTPSS  
 LSSPTIMAAGPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMGHPGSRKFNTTERVLQGLLGPIFKNTSVG  
 PLYSGCRLTSRSEKDGAATGVDAICCIHLDPKSPGLNRERLYWELSQLTNGIKELGPY  
 LDRNSLYVNGFTHRSTVPTSTPGTSTVDLGTSGTPFSLPSATAGPLLVLFTLNFTITN

LKYEEDMHRPGSRKFNTTERVLQTLVGPMPFKNTSVGLLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDA  
 ICTHRLDPKSPGVDRQLYWELSSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHWIPVPTSSTPG  
 TSTVDLGSGTPSSLPSPTSATAGPLLVPFTLNFTITNLKYEEDMHCPGSRKFNTTERVLQ  
 SLLGPMFKNTSVGPLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGVDRQLYWELS  
 QLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHQTSAAPTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTSAGP  
 LLVPFTLNFTITNLQYEEDMHHPGSRKFNTTERVLQGLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLL  
 RPEKNGAATGMADAICSHRLDPKSPGLNREQLYWELSSQLTHGIKELGPYTLDRNSLYVNGF  
 THRSSVAPSTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTTAVPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMRHPG  
 SRKFNTTERVLQGLLGPLFKNSVGPLYSGCRLISLRSEKDGAATGVDAICTHHLNPQSP  
 GLDREQLYWQLSQMTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSGLTTSTPWTSTVDLGTSGT  
 PSPVPSPTTAGPLLVPFTLNFTITNLQYEEDMHHRPGSRKFNAATERVLQGLLSPIFKNSSV  
 GPLYSGCRLTSLRPEKDGAATGMADAVCLYHPNPKRPGLDREQLYWELSSQLTHNITELGPy  
 SLDRDSLYVNGFTHQNSVPTTSTPGTSTVWATTGTPSSFPGHTEPGPLLIPTFNFTIT  
 NLHYEENMQHPGSRKFNTTERVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKQEAATGV  
 TICTHRVDPIGPGLDRERLYWELSSQLTNSITELGPyTLDRDSLYVNGFNPWSSVPTTSTP  
 GTSTVHLATSGTPSSLPGHTAPVPLIPTLNFTITNLHYEENMQHPGSRKFNTTERVLQ  
 GLLKPLFKSTSVDGPLYSGCRLTLLRPEKDGAATGVDAICTLRLDPTGPGLDRERLYWELS  
 QLTNSVTELGPYTLDRDSLYVNGFTHRSSVPTTSIPGTSAVHLETSGTPASLPGHTAPGP  
 LLVPFTLNFTITNLQYEEDMRHPGSRKFNTTERVLQGLLKPLFKSTSVDGPLYSGCRLTLL  
 RPEKRGAAATGVDTICTHRLDPLNPGLDREQLYWELSKLTRGIIELGPYLLDRGSLYVNGF  
 THRNFVPITSTPGTSTVHLGTSETPSSLPRPIVPGPLLVPFTLNFTITNLQYEEAMRHPG  
 SRKFNTTERVLQGLLRLPFKNTSIGPLYSSCRLLRPEKDKAATRVDAICTHHPDPQSP  
 GLNREQLYWELSSQLTHGITELGPyTLDRDSLYVDGFTHWSPIPPTSTPGTSIVNLGTSGI  
 PPSLPETTATGPOLLVPFTLNFTITNLQYEENMGHPGSRKFNTESVLQGLLKPLFKSTS  
 GPLYSGCRLTLLRPEKDGVATRVAICTHRPDKIPGLDRQQLYWELSSQLTHSITELGPy  
 TLDRDSLYVNGFQRSSVPTTSTPGTFTVQPETSETPSSLPGPTATGPVLLPFTLNFTII  
 NLQYEEDMHRPGSRKFNTTERVLQGLLMPFKNTSVSSLYSGCRLTLLRPEKDGAATRVD  
 AVCTHRPDPKSPGLDRERLYWKLSQLTHGITELGPyTLDRHSLYVNGFTHQSSMTTRTP  
 DTSTMHLATSRTPASLSGPTTASPLLVLFITINFTITNLRYEENMHHPGSRKFNTTERVLQ  
 GLLRPVFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPKKDGAATKVDAAICTYRPDPKSPGLDREQLYWELS  
 QLTHSITELGPyTLDRDSLYVNGFQRSSVPTTSIPGPTVLDGTSVSKPGPSAASP  
 LLVLFITLNFTITNLRYEENMQHPGSRKFNTTERVLQGLLRSILFKSTSVDGPLYSGCRLTLL  
 RPEKDGTATGVDAICTHHPDPKSPRLDREQLYWELSSQLTHNITELGPyALDNDSLFWNGF  
 THRSSVTTSTPGTPTVYLGASKTPASIIFGPAASHLLILFTLNFTITNLRYEENMWPGS  
 RKFNTTERVLQGLLRLPFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGEATGVDAICTHRPDPGPG  
 LDREQLYLELSQLTHSITELGPyTLDRDSLYVNGFTHRSSVPTTSTGVVSEEPFTLNFTI  
 NNLRYMADMGQPGSLKFNTDNVMQHLLSPLFQRSSLGARYTGRVIALRSVKNGAETRV  
 DLLCTYLQPLSGPGPLPIKQVFHELSQQTHGIRLGPYSLDKDSLWNGYNEPGPDEPPTT  
 PKPATTFLPPLSEATTAMGYHLKTLTLNFTISNLQYSPDMGKGSATFNSTEGVLQHLLRP  
 LFQKSSMGPFYLGCQLISLRPEKDGAATGVDTCTYHPDPVPGPLDIQQLYWELSSQLTHG  
 VTQLGFYVLDRLDSLFINGYAPQNLISRGEYQINFHIVNWNLSPDPTSSEYITLLRDIQD  
 KVTTLYKGSQLHDTFRFCLVTNLTMDSVLTVKALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLNASFW  
 LGSTYQLVDIHVTMESSVYQPTSSSSTQHFYLNFTITNLQYSPQDKAQPGTTNYQRNKRN  
 IEDALNQLFRNSSIKSYFSDCQVSTFRSVPNRHHTGVDSLNFSPARRVDRVAIYEEFL  
 RMTRNGTQLQNFTLDRSSVLDGYSPNRNEPLTGNSDLPFWAVILIGLAGLLGLITCLIC

**GVLVTTRRKKEGEYNVQQQCPGYYQSHLDLEDLQ**

(SEQ ID NO: 4)

5 (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor de potenciación de megacariocitos, mesotelina, Nº de acceso en Genbank NM\_005823 Yamaguchi,N., et al. Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96 (20): 11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 (1): 136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37): 21984-21990 (1995)); documento WO2003101283 (Reivindicación 14); (documento WO2002102235 (Reivindicación 13; Páginas 287-288); documento WO2002101075 (Reivindicación 4; Páginas 308-309); documento WO200271928 (Páginas 320-321); documento WO9410312 (Páginas 52-57); Referencias cruzadas: MIM:601051; NP\_005814.2; NM\_005823\_1  
622 aa

MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGVWQPSRTLGETGQEAAPLDGVLANPPNISS  
LSPRQLLGPCAEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPL  
DLLLFLNPDADFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLLPAALACWGVRGSSLSEA  
DVRALGGIACDLPGRFVAESAEVLLPRLVSCPGLDQDQQAARAALQGGGPPYGPSTW  
SVSTM DALRGLLPVLGQPI IRSIPQGIVAAWRQRSSRDPWRQPERTILRPRFRREVEKT  
ACPSGKKAREIDESLI FYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAI PFTYEQLDVLKHKLDELY  
PQGYPE SVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLETLKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFVK  
GRGQLDKDTLDTLTAFY PGYLCSLSPEELSSVPPSSIWA VR PQD LDTCD PRQ LDV LYPKA  
RLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSM DLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQ  
KLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGT  
PCLLGPGPVLTVLALLLASTLA

(SEQ ID NO: 5)

15 (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, familia de vehículos de soluto 34 (fosfato sódico), miembro 2, vehículo de fosfato dependiente de sodio de tipo II 3b, Nº de acceso en Genbank NM\_006424, J. Biol. Chem. 277 (22): 19665-19672 (2002), Genomics 62 (2): 281-284 (1999), Feild, J.A., et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3): 578-582); documento WO2004022778 (Reivindicación 2); documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento WO2002102235 (Reivindicación 13; Página 326); documento EP875569 (Reivindicación 1; Páginas 17-19); documento WO200157188 (Reivindicación 20; Página 329); documento WO2004032842 (Ejemplo IV); documento WO200175177 (Reivindicación 24; Páginas 139-140); Referencias cruzadas: MIM:604217; NP\_006415.1; NM\_006424\_1  
690 aa

MAPWPELGDAQPNDPKYLEGAAGQQPTAPDKSKETNKTDNTEAPVTKIELLPSTATLI  
DEPTEVDDPNLPTLQDSGIKW SERDTKGKILCFFQGIGRLILLLGFLYFFVCSDLILSS  
AFQLVGGKMAQOFFSNSSIMS NPLGLVI GVLVTVLQSSSTSTSIVVSMVSSLLTVRA  
AIPIIIMGANIGTSITNTIVALMQVGDRSEFRRAFAGATVHDFFNWLSV L VLLPVEVATHY  
LEI ITQLIVESFHFKNGEDAP DLLKVITKPFTKLIV QLDKKVISQIA MNDEAKKNKSLVK  
IWCKTFTNKTQINVTVPSTANC TPSLCWT DGIQNWTMKNV TYKENIAKCQHIFVN FHL P  
DLAVGTILLI LSLLVLCGCLIMIVKILGSVLKGQVATVI KKTINTDFPFPAWL TG YLAI  
L VGAGMTFIVQSSSVFTSALTPLIGIGVITIERAYPLT LGSNIGTT TAILA ALAS PGNA  
LRSSLQIALCHFFF NIISGILLWYPIPFT RLPIRM A KGLGNISAKYRWF AVFY LI IFFF LI  
PLTVFGLSLAGWRV LVGVGV PVVF III LVLCLRLI QSRC PRV LPKKLQWNFLPLWM RSL  
KPWDAVVSKFTGCFQMRCYC CCRVCCACCLLCGCPKCCRCSKCCEDLEEAQEGQDVPVK  
APETFDNITISREAQGEVPASDSKTECTAL

(SEQ ID NO: 6)

30 (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (de tipo 1 y similar al tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B, Nº de acceso en Genbank AB040878,

Nagase T., et al. (2000) DNA Res. 7 (2): 143-150; documento WO2004000997 (Reivindicación 1); documento WO2003003984 (Reivindicación 1); documento WO200206339 (Reivindicación 1; Página 50); documento WO200188133 (Reivindicación 1; Páginas 41-43, 48-58); documento WO2003054152 (Reivindicación 20); documento WO2003101400 (Reivindicación 11); Accession: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC:10737;  
5 1093 aa

```
MVLAGPLAVSLLLPSLTLLVSHLSSQDVSEPSSEQQLCALSKHPTVAFEDLQPWVSNF
TYPGARDFSQLALDPSGNQLIVGARNYLFRSLANVSLQATEWASSEDTRRSCQSKGKT
EEECQNYVRVLIVAGRKVFMCGTNAFSPMCTSQRVGNLRSRTTEKINGVARCPYDPRHNST
AVISSQGELYAATVIDFSGRDPAIYRSLGSGPPLRTAQYNSKWLNEPNFVAAYDIGLFAY
FFLRENAVEHDCGRTVYSRVARVCKNDVGGFLLEDTWTFMKARLNCSRPGEVPFYYNE
LQSAFHLP EQDLIYGVFTTNVNSIAASAVCAFNLSAISQAFNGPFRYQENPRAAWLPIAN
PIPWFQCGTLPETGPNENLTERSLQDAQRFLMSEAVQPVTPEPCVTQDSVRFSHLVVDL
VQAKDTLYHVLYIGTESGTILKALSTASRSLHGCYLEELHVLPPGRREPLRSLRILHSAR
ALFVGLRDGVLRVPLERCAAYRSQGACLGARDPYCGWDGKQQRCSTLEDSSNMSLWTQNI
TACPVRNVTRDGFGPWSPWQPCEHLDGDNSGSCLCRARSCDSPRPRCGGLDCLGPAIHI
ANCSRNGAWTPWSSWALCSTSCGIGFQVRQRSCSNPAPRHGGRICVGKSREERFCNENTP
CPVPIFWASWGSWSKCSSNCGGGMQSRRRACENGNSCLGCGVEFKTCNPEGCPEVRRNTP
WTPWLPVNVTQGGARQEQRFRFTCRAPIADPHGLQFGRRRTETRTCPADGSGSCDTDALV
EDLLRSGSTSPHTVSGWAAWGPWSSCSRDCELGFRVRKRTCTNPEPRNGGLPCVGDAAE
YQDCNPQACPVRGAWSCTSWSPCSASCAGGHYQRTRSCTS PAPSPGEDICLGLHTEEAL
CATQACPEGWSPWSEWSKCTDDGAQSRSRHCEELLPGSSACAGNSSQSRPCPYSEIPVIL
PASSMEEATGCAGFNLIHLVATGISCFLGSLLTLAVYLSCQHCQRQSQUESTLVHPATPN
HLHYKGGGTPKNEKYTPMEFKTLNKNNLIPDDRANFYPLQQTNVYTTTYPSPLNKHSFR
PEASPGQRCFPNS
```

10 (SEQ ID NO: 7)

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, gen RIKEN cADN2700050C12, Nº de acceso en Genbank AY358628); US2003129192 (Reivindicación 2); US2004044180 (Reivindicación 12); US2004044179 (Reivindicación 11); US2003096961 (Reivindicación 11); US2003232056 (Ejemplo 5); documento WO2003105758 (Reivindicación 12); US2003206918 (Ejemplo 5); EP1347046 (Reivindicación 1); documento WO2003025148 (Reivindicación 20); Referencias cruzadas: GI:37182378; AAQ88991.1; AY358628\_1  
141 aa

20 MWVLGIAATFCGLFLLPGFALQIQCYQC EEFQQLNNDCSSPEFIVNCTVNVQDMCQKEVME
QSAGIMYRKSCASSAACLIASAGYQSFCSPGKLNSVCISCCNTPLCNGPRPKRGSSASA
LRPGLRTTILFLKLALFSAHC

(SEQ ID NO: 8)

25 (9) ETBR (Receptor de endotelina de tipo B, Nº de acceso en Genbank AY275463); Nakamuta M., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 248-255, 1991; Arai H., et al. Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992; Arai H., et al. J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656-663, 1991; Elshourbagy N.A., et al. J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., et al. J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., et al. Gene 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C., et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., et al. Biol. Chem. 272, 21589-21596, 1997; Verheij J.B., et al. Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002; Hofstra R.M. documento W., et al. Eur. J. Hum. Genet. 5, 180-185, 1997; Puffenberger E.G., et al. Cell 79, 1257-1266, 1994; Attie T., et al. Hum. Mol. Genet. 4, 2407-2409, 1995; Auricchio A., et al. Hum. Mol. Genet. 5:351-354, 1996; Amiel J., et al. Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M. documento W., et al. Nat. Genet. 12, 445-447, 1996; Svensson P.J., et al. Hum. Genet. 103, 145-148, 1998; Fuchs S., et al. Mol. Med. 7, 115-124, 2001; Pingault V., et al. (2002) Hum. Genet. 111, 198-206; documento WO2004045516 (Reivindicación 1); documento WO2004048938 (Ejemplo 2);  
30  
35

documento WO2004040000 (Reivindicación 151); documento WO2003087768 (Reivindicación 1); documento WO2003016475 (Reivindicación 1); documento WO2003016475 (Reivindicación 1); documento WO200261087 (Fig 1); documento WO2003016494 (Fig 6); documento WO2003025138 (Reivindicación 12; Página 144); documento WO200198351 (Reivindicación 1; Páginas 124-125); EP522868 (Reivindicación 8; Fig 2); documento WO200177172 (Reivindicación 1; Páginas 297-299); documento US2003109676; documento US6518404 (Fig 3); documento US5773223 (Reivindicación 1a; Col 31-34); documento WO2004001004; 422 aa

MQPPPSLCRALVALVLACGLSRIWGEERGFPPDRATPLLQTAEIMTPPTKTLWPKGNSA  
 SLARSLAPAEVPKGDRTAGSPRTISPPPCQGPIEIKETFKYINTVVSCLVFVLGIIGNS  
 TLLRIIYKNKCMRNGPNILIASLALGDLLHIVIDIPINVYKLLAEDWPFGAEMCKLVPFI  
 QKASVGITVLSLCALSIDRYRAVASWSRIKGIGVPKWTAVEIVLIWVVSVVLAVPEAIGF  
 DIITMDYKGSYLRICLLHPVQKTAFMQFYKTAKDWLFSFYFCLPLAITAFFYTLMTCEM  
 LRKKSGMQIALNDHLKQRREVAKTVFCLVLVFALCWPLHLSRILKLTLYNQNPNRCEL  
 LSFLLVLDYIGINMASLNCSINPIALYLVSKRFKNCFKSCLCCWCQSFEEKQSLEEKQSC  
 LKFKANDHGYDNFRSSNKYSSS

(SEQ ID NO: 9)

(10)MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, Nº de acceso en Genbank NM\_017763); documento WO2003104275 (Reivindicación 1); documento WO2004046342 (Ejemplo 2); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento WO2003083074 (Reivindicación 14; Página 61); documento WO2003018621 (Reivindicación 1); documento WO2003024392 (Reivindicación 2; Fig 93); documento WO200166689 (Ejemplo 6); Referencias cruzadas: ID de Locus:54894; NP\_060233.2; NM\_017763\_1 783 aa

MSGGHQLQLAALWPWLLMATLQAGFGRTGLVIAAAVESERSAEQKAIIRVIPLKMDPTGK  
 LNLTLEGVPAGVAEITPAEGKLMQSHPLYLCNASDDNLEPGFISIVKLESPRRAPRPCL  
 SLASKARMAGERGASAVALFDITEDRAAAEQLQQPLGLTWPVVLIWGNDAEKLMFVYKNQ  
 KAHVRIELKEPPAWPDYDVWILMTVVGTTIFVIIASVLRIRCRPRHSRPDPLQQRTAWAI  
 SQLATRRYQASCRQARGEWPDSGSSCSSAPVCAICLEEFSEGQELRVISCLHEFHRNCVD  
 PWLHQHRTCPLCVFNITEGDSFSQSLGPSRSYQEPGRRLHLIRQHPGHAHYHLPAAAYLLG  
 PSRSAVARPPRPGPFLPSQEPMGPRHHRFPRAAHPRAPGEBQQLAGAQHPYAQGWGMSh  
 LQSTSQHPAACPVPLRRARPPDSSGSGESYCTERSGYLADGPASDSSSGPCHGSSSDSVV  
 NCTDISLQGVHGSSSTFCSSLSSDFDPLVYCSPKGDPQRVDMQPSVTSRPRSLDSVVPTG  
 ETQVSSHVHYHRHRHHYKKRFQWHGRKPGPETGPQSRPPIPRTQPQPEPPSPDQQVTG  
 SNSAAPSGRLSNPQCPRALPEPAPGPVDASSICPSTSSLFNLQKSSLSARHPQRKRRGGP  
 SEPTPGSRPQDATVHPACQIFPHYTPSVAYPWSPEAHPLICGPPGLDKRLLPETPGPCYS  
 NSQPVWLCLTPRQPLEPHPPGEGPSEWSSDTAEGRPCPYPHCQVLSAQPGSEEELCE  
 QAV

(11) STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata 2, proteína de próstata de seis dominios transmembrana, Nº de acceso en Genbank AF455138, Lab. Invest. 82 (11): 1573-1582 (2002)); documento WO2003087306; documento US2003064397 (Reivindicación 1; Fig 1); documento WO200272596 (Reivindicación 13; Páginas 54-55); documento WO200172962 (Reivindicación 1; Fig 4B); documento WO2003104270 (Reivindicación 11); documento WO2003104270 (Reivindicación 16); documento US2004005598 (Reivindicación 22); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento US2003060612 (Reivindicación 12; Fig 10); documento WO200226822 (Reivindicación 23; Fig 2); documento WO200216429 (Reivindicación 12; Fig 10); Referencias cruzadas: GI:22655488; AAN04080.1; AF455138\_1 490 aa

MESISMMGSPKSLSETVLPNGINGIKDARKVTVGIGSGDFAKSLTIRLIRCGYHVVIGS  
 RNPKFASEFFPHVVDVTHEDALTKTNIIFVAIHREHYTSIWDLRHLVGKILIDVSNNM  
 RINQYPESNAEYLASLFPDSLIVKGFNVVSAWALQLGPKDASRQVYICSNNIQARQQVIE  
 LARQLNFIPIDLGSLSSAREIENLPLRLFTLWRGPVVVAISLATFFFYLSFVRDVIHPYA  
 RNQSDFYKIPIEBVKTLPIAVITLLSLVYLAGLLAAAYQLYYGTKYRRFPPWLETWLQ  
 CRKQLGLLSFFFAMVHVAYSLCLPMRRSERYLFLNMAYQQVHANIENSWNNEEVWRIEMY  
 ISFGIMSLGLSLLAVTSIPSVSNALNWREFSFIQSTLGYVALLISTFHVLIVGKRAFE  
 EEEYYRFYTPPNFVLALVLPISIVILGKIIILFLPCISQKLKRIKKGWEKSQFLEEGIGGTIP  
 HVSPERVTVM

(SEQ ID NO: 11)

- 5 (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial de receptores transitorios, subfamilia M, miembro 4, Nº de acceso en Genbank NM\_017636  
 Xu,X.Z., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98 (19): 10692-10697 (2001), Cell 109 (3): 397-407 (2002), J. Biol. Chem. 278 (33): 30813-30820 (2003); documento US2003143557 (Reivindicación 4); documento WO200040614 (Reivindicación 14; Páginas 100-103); documento WO200210382 (Reivindicación 1; Fig 9A); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento WO200230268 (Reivindicación 27; Página 391); documento US2003219806 (Reivindicación 4); documento WO200162794 (Reivindicación 14; Fig 1A-D); Referencias cruzadas: MIM:606936; NP\_060106.2; N\_017636\_1  
 10 1214 aa

MVVPEKEQSIPKIFKKKTCTTFIVDSTDGGTLCQCGRPRTAHPAVAMEDAFGAAVVTW  
 WDSDAHTTEKPTDAYGELDFTGAGRKHNSFLRLSDRTDPAAVYSLVTRTWGFRAPNLVVS  
 VLGGSGGPVLTQWLQDLLRRGLVRAAQSTGAIVTGGLHTGIGRHGVAVRDHQMASTGG  
 TKVVAMGVAPWGVRNRDTLINPKGSFPARYRWRGDPEDGVQFPLDYNYSAFFLVDDGTH  
 GCLGGGENRFLRLRESYISQQKTGVGGTGIDIPVLLLLTDGDEKMLTRIENATQAQLPCLL  
 VAGSGGAADCLAETLEDTLAPGSGGARQGEARDIRRFFPKGDLEVIQAQVERIMTRKEL  
 LTVYSSEDGSEEFETIVLKALVKACGSSEASAYLDELRLAVAWNVDIAQSELFRGDIQW  
 RSFHLEASLMMDALLNDRPEFVRLLISHGLSLGHFLTPMRLAQLYSAAPSNSLIRNLLDQA  
 SHSAGTKAPALKGGAAELRPPDVGHVLRMLLGKMCAPRYPSGGAWDPHPGQGFGESMYLL  
 SDKATSPLSLDAGLGQAPWSDLLLWALLLNRAQMAMYFWEMGSNAVSSALGACLLLRLVMA  
 RLEPDAEEAARRKDLAFKFEGMGVDLFGECKRSSEVRAARLLLRRCPILWGDATCQLAMQ  
 ADARAFFAQDGVQSLLTQKWWDGMASTTPIWAFLVLAFFCPPLIYTRLITPRKSEEETRE  
 ELEFDMDSVINGEGPVGTADPAEKTPLGVPRQSGRPGCCGRCGRRCLRRWFHFVGAPV  
 TIFPMGNVSYLLFLLLFSRVLLVDFQPAPPGLLELLLYFWAFTLLCEELRQGLSGGGSL  
 ASGGPGPGHASLSQRRLRLYLADSWNQCDLVALTCFLLGVGCRTPGLYHLGRTVLCIDFM  
 VFTVRLLHIFTVNQQLGPKIVIVSKMMKDVFVFLFFLGWVWLVAYGVATEGLLRPRDSDFP  
 SILRRVFYRPYLQIFGQIPQEDMDVALMEHSNCSEPGFWAHPPGAQAGTCVSQYANWLV  
 VLLLVIFLLVANILLVNLLIAMFSYTFGKVQGNSDLYWKAQRYRLIREFHSPALAPPFI  
 VISHLRLLLRQLCRRPRSPQPSSPALEHFRVYLSKEAERKLLTWESVHKENFLLARARDK  
 RESDSERLKRTSQKVVDLALKQLGHIREYEQRLKVLEREVQQCSRVLGWVAEALSRSALLP  
 PGGPPPPDLPGSKD

(SEQ ID NO: 12)

- 15 (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, Nº de acceso en Genbank NP\_003203 o NM\_003212,  
 Ciccodicola, A., et al. EMBO J. 8 (7): 1987-1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3): 555-565 (1991)); documento US2003224411 (Reivindicación 1); documento WO2003083041 (Ejemplo 1); documento WO2003034984 (Reivindicación 12); documento WO200288170 (Reivindicación 2; Páginas 52-53); documento WO2003024392 (Reivindicación 2; Fig 58); documento WO200216413 (Reivindicación 1; Páginas 94-95, 105); documento

WO200222808 (Reivindicación 2; Fig 1); documento US5854399 (Ejemplo 2; Col 17-18); documento US5792616 (Fig 2); Referencias cruzadas: MIM:187395; NP\_003203.1; NM\_003212\_1  
188 aa

5

MDCRKMARFSYSVIWIMAISKVPELGLVAGLGHQEFAFARPSRGYLAFRDDSIWPQEEPAIR  
PRSSQRVPPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPSFYGRNCEHDVRKENCGSVPH  
DTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCDGLVMDEHLVASRTPELPPSARTTFMLVGI  
CLSIQSYY

(SEQ ID NO: 13)

10 (14) CD21 (CR2 (Receptor de complemento2) o C3DR (receptor de C3d/virus de Epstein Barr) o Hs.73792 Nº de acceso en Genbank M26004,  
Fujisaku et al. (1989) J. Biol. Chem. 264 (4): 2118-2125); Weis J.J., et al. J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988;  
Moore M., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 9194-9198, 1987; Barel M., et al. Mol. Immunol. 35, 1025-1031,  
1998; Weis J.J., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., et al. (1993) J. Immunol.  
150,5311-5320; documento WO2004045520 (Ejemplo 4); documento US2004005538 (Ejemplo 1); documento  
WO2003062401 (Reivindicación 9); documento WO2004045520 (Ejemplo 4); documento WO9102536 (Fig 9.1-  
9.9); documento WO2004020595 (Reivindicación 1); Acceso: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004;  
AAA35786.1.  
1033 aa

20

MGAAGLLGVFLALVAPGVLGISCGSPPPILNGRISYYSTPIAVGTVIRYSCSGTFRLIGE  
KSLLCITKDKVDGTWDKPAPKCEYFNKYSSCPEPIVPGGYKIRGSTPYRHGDSVTFACT  
NFSMNGNKSVCQANNMWGPTRLPTCVSVFPLECPALPMIHNGHHTSENVGSIAPGLSVT  
YSCESGYLLVGEKIINCLSSGKWSAVPPTCEEARCKSLGRFPNGKVKEPPILRVGVGTANF  
FCDEGYRLQGPPSSRCVIAGQGVAWTKMPVCEEIFCPSPPPILNGRHIGNSLANVSYGSI  
VTYTCDPDPEEGVNFILESTLRCTVDSQKTGTWSGPAPRCELSTS A VQC PHP QILRGR  
MVSGQKDRYTNTVIFACMFGFTLKGSKQIRCNAQGTWEPSAPVCEKECQAPPN ILNGQ  
KEDRHMRVRFDPGTSIKYSCNPGYVLVGEESIQCTSEGVWTPVPQCKVAACEATGRQLLT  
KPQHQFVRPDVNSSCGEGYKLGSVYQECQGTIPWFMEIRLCKEITC PPPV IYNGAHTG  
SSLEDFPYGTTVYTCNP GPERGVEFSLIGESTIRCTSNDQERGTWSGPAPLCKLSLLAV  
QCSHVHIANGYKISGKEAPYFYNDT VTFKCYS GFTLKGSSQIRCKADNTWDPEIPVCEKE  
TCQHVRQSLQELPAGSRVELVNTSCQDG YQLTGAYQMCQDAENGIWFKKIPLCKVIHCH  
PPP VIVNGKHTGMMAENFLYGN EVSYECDQGFYLLGEKKLQCRSDSKGHGSWSGP SPQCL  
RSPPVTRCPNPEVKHGYKLNKTH SAYSHNDIVYVDCNPGFIMNGSRVIRCHTDNTWPGV  
PTCIKKAFIGCPPPKTPNGNHTGGNIARFSPGMSILYSCDQGYLLVGEALLLC THEGTW  
SQPAPHCKEVNCSSPADMDGIQKGLEPRKMYQYGA VVTLECEDGYMLEGSPQSQCQSDHQ  
WNPPLAVCRSRSLAPVLCGIAAGLILLTFLIVITLYVISKHRERNYYTDTSQKEAFHLEA  
REVYSVDPYNPAS

(SEQ ID NO: 14)

25 (15) CD79b (CD79B, CD79 $\beta$ , IgB (asociado a inmunoglobulina beta), B29, Nº de acceso en Genbank  
NM\_000626 o 11038674, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2003) 100 (7): 4126-4131, Blood (2002) 100 (9): 3068-  
3076, Muller et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22 (6): 1621-1625); documento WO2004016225 (reivindicación 2, Fig  
140); documento WO2003087768, documento US2004101874 (reivindicación 1, página 102); documento  
WO2003062401 (reivindicación 9); documento WO200278524 (Ejemplo 2); documento US2002150573  
30 (reivindicación 5, página 15); US5644033; documento WO2003048202 (reivindicación 1, páginas 306 y 309);  
documento WO 99/558658, documento US6534482 (reivindicación 13, Fig 17A/B); documento WO200055351  
(reivindicación 11, páginas 1145-1146);  
Referencias cruzadas: MIM:147245; NP\_000617.1; NM\_000626\_1

299 aa

**MARLALSPVPSHWMVALLLLSAEPVPAARSEDRYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT  
 VKMHCYMNSASGNVSWLKQEMDENPQQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIY  
 FCQQKCNNTSEVYQGCGETLRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIMIQTLIILFIIVPIFL  
 LDKDDSKAGMEEDHTYEGLIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE**

5 (SEQ ID NO: 15)

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína de anclaje 1a de fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C, Nº de acceso en Genbank NM\_030764, Genome Res. 13 (10): 2265-2270 (2003), Immunogenetics 54 (2): 87-95 (2002), Blood 99 (8): 2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98 (17): 9772-9777 (2001), Xu,M.J., et al. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3): 768-775; documento WO2004016225 (Reivindicación 2); documento WO2003077836; documento WO200138490 (Reivindicación 5; Fig 18D-1-18D-2); documento WO2003097803 (Reivindicación 12); documento WO2003089624 (Reivindicación 25); Referencias cruzadas: MIM:606509; NP\_110391.2; NM\_030764\_1

15 508 aa

**MLLWSLLVIFDAVTEQADSLTIVAPSSVFEGDSIVLKCQGEQNWKIQKMAYHKDNKELSV  
 FKKFSDFLIQSAVLSDSGNYFCSTKGQLFLWDKTSNIVKIKVQELFQRPVLTASSFQPIE  
 GGPVSLKCETRLSPQRLDVQLQFCFFRENQVLGSGWSSSPELQISAVWSEDTGSYWCKAE  
 TVTHRIRKQSLQSQIHVQRIPISNVSLEIRAPGGQVTLEGQKLILLCSVAGGTGNVTFSWY  
 REATGTSMGKKTQRSLSAELEIPAVKESDAGKYYCRADNGHVPIQSKVVNI PVRIPVSRP  
 VLTLRSPGAQAAVGDLLELHCEALRGSPPILYQFYHEDVTLGNSSAPSGGGASFNLSLTA  
 EHSGNYSCEANGLGAQCSEAVPVSISGPDGYRRDLMTAGVLWGLFGVLGFTGVALLLYA  
 LFHKISGESSATNEPRGASRPNPQEFTYSSPTPDMEELQPVYVNVGSDVDVVYSQVWSM  
 QQPESSANIRTLENKDSQVIYSSVKKS**

20 (SEQ ID NO: 16)

(16) HER2 (ErbB2, Nº de acceso en Genbank M11730, Coussens L., et al. Science (1985) 230 (4730): 1132-1139); Yamamoto T., et al. Nature 319, 230-234, 1986; Semba K., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M., et al. J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004; Kuhns J.J., et al. J. Biol. Chem. 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., et al. Nature 421, 756-760, 2003; Ehsani A., et al. (1993) Genomics 15, 426-429; documento WO2004048938 (Ejemplo 2); documento WO2004027049 (Fig 1I); documento WO2004009622; documento WO2003081210; documento WO2003089904 (Reivindicación 9); documento WO2003016475 (Reivindicación 1); documento US2003118592; documento WO2003008537 (Reivindicación 1); documento WO2003055439 (Reivindicación 29; Fig 1A-B); documento WO2003025228 (Reivindicación 37; Fig 5C); documento WO200222636 (Ejemplo 13; Páginas 95-107); documento WO200212341 (Reivindicación 68; Fig 7); documento WO200213847 (Páginas 71-74); documento WO200214503 (Páginas 114-117); documento WO200153463 (Reivindicación 2; Páginas 41-46); documento WO200141787 (Páginas 15); documento WO200044899 (Reivindicación 52; Fig 7); documento WO200020579 (Reivindicación 3; Fig 2); documento US5869445 (Reivindicación 3; Col 31-38); documento WO9630514 (Reivindicación 2; Páginas 56-61); EP1439393 (Reivindicación 7); documento WO2004043361 (Reivindicación 7); documento WO2004022709; documento WO200100244 (Ejemplo 3; Fig 4); Acceso: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1.

35 1255 aa

MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMLRHLYQGCQVVQGNL  
 ELTYLPTNASLSFLQDIQEYQGYVLIAHNQVRQPLQLRLIRVRGQLFEDNYALAVLDNG  
 DPLNNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTIILWKDIFHKNNQLA  
 LTLIDTNRSRACHPCSPMCKSRCWGESEDQSLTRTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQC  
 AAGCTGPKHSDCLACLFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACP  
 YNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDEGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSAN  
 IQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSL  
 DLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSRELGSGLALIHHTHLCFVHTV  
 PWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWPGPQTQCVNCSEQFLRGQEC  
 VEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARC  
 PSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIIISAVVG  
 ILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRLKETEL  
 RKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSP  
 YVSRLLGICLTSTVQLTQLMPYGCLLDHVRENRGRLGSQDLLNWCMQIAKGMSYLEDVR  
 LVHRDLAARNVLVKS PNHVKITDFGLARLLDIDEDETEYADGGKVPIKWMALESILRRRFT  
 HQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICIDVYMIMVKCWM  
 IDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNEDLGPASPLDSTFYRSLLLEDMMGDLVDA  
 EYLVPPQQFFCPDPAPGAGGMVHRHRSSTRSGGGDLTLGLEPSEEAPRSP LAPSEG  
 AGSDVFDGDLGMGAAKGLQSLPTHDPSPQLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLT CSPQPEYV  
 NQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLS PGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPQ  
 GGAAAPQPHPPPAFSPA FDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV

(SEQ ID NO: 17)

- 5 (18) NCA (CEACAM6, Nº de acceso en Genbank M18728);  
 Barnett T., et al. Genomics 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988;  
 Strausberg R.L., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 16899-16903, 2002; documento WO2004063709;  
 documento EP1439393 (Reivindicación 7); documento WO2004044178 (Ejemplo 4); documento  
 10 WO2004031238; documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento WO200278524 (Ejemplo 2);  
 documento WO200286443 (Reivindicación 27; Página 427); documento WO200260317 (Reivindicación 2);  
 Acceso: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728;  
 344 aa

MGPPSAPP CRLHVPKEVLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESPFNVAEGKEVLLL AHNLPQ  
 NRIGYSWYKGERVDGNSLIVGYVIGTQQATPGPAYSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFY  
 TLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSI SSNNSNPVEDKDAVAFTEPEVQNTTYLWWV  
 NGQLPVSPRLQLSNGNMTLTL SVKRNDAGSYECEIQNPASANRSDPVTLNVL YGP DVP  
 TISPSKANYRPGENLNLSCHAASNPPAQYSWFINGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQ  
 AHNSATGLNRTT VTMITVSGSAPVLSAVATVGITIGV LARVALI

(SEQ ID NO: 18)

- 15 (19) MDP (DPEP1, Nº de acceso en Genbank BC017023,  
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99 (26): 16899-16903 (2002)); documento WO2003016475 (Reivindicación 1);  
 documento WO200264798 (Reivindicación 33; Páginas 85-87); documento JP05003790 (Fig 6-8); documento  
 20 WO9946284 (Fig 9);  
 Referencias cruzadas: MIM:179780; AAH17023.1; BC017023\_1  
 411 aa

MWSGGWWLWPLVAVCTADFFRDEAERIMRDSPVIDGHNDLPWQLLDMFNNRLQDERANLT  
LAGTHTNIPKLRAGFVGGQFWSYTPCDTQNDAVRRTLEQMDVVHRMCRMYPETFLYVT  
SSAGIRQAFREGKVASLIGVEGGHSIDSSLGVLRALYQLGMRYLTLTHSCNTPWADNWLV  
DTGDSEEPQSQGLSPFGQRVVKELNRLGVLIIDLAVSVATMKATLQLSRAPVIFSHSSAYS  
VCASRRNVPPDVRLVKQTDSLVMVNFYNNYISCTNKANLSQVADHLDHIKEVAGARAVG  
FGGDFDGVPRVPEGLEDVSKYPDLIAELLRRNWTEAEVKGALADNLLRVFEAVEQASNLT  
QAPEEEPIPLDQLGGSCRTHGYSSGASSLHRHWGLLLASIAPLVLCLSLL

(SEQ ID NO: 19)

5 (20) IL20R $\alpha$  (IL20Ra, ZCYTOR7, Nº de acceso en Genbank AF184971);

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

Acceso: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

15 553 aa

MRAPGRPALRPLPLPPLLLLLAAPWGRAVPCVSGGLPKPANITFLSINMKNVLQWTPPE  
GLQGVKVTVQYFIYQGQKKWLNKSECRNINRRTYCDLSAETSDYEHQYYAKVKAIWGTKC  
SKWAESGRFYPFLETQIGPPEVALTTDEKSISVVLTAPEKWKRNPEDLPVSMQIQYSNLK  
YNVSVLNTKSNRTWSQCVTNHTLVLWLEPNLTLYCVHVESFVPGPPRRAQPSEKQCARTL  
KDQSSEFKAKIIFWYVLPISITVFLFSVMGYSIYRYIHVGKEKHPANLILIYGNEFDKRF  
FVPAEKIVINFITLNISDDSKISHQDMSLLGKSSDVSSLNDPQPSGNLRPPQEEEVKHL  
GYASHLMEIFCDSEENTEGTSFTQQESLSRTIPPDKTVIEYEYDVRTTDICAGPPEEQELS  
LQEEVSTQGTLLAESQAALAVLGPTQLQSYTPQLQDLDPLAQEHTDSEEGPEEEPSTTLV  
DWDPQTGRLCIPSLSFDQDSEGCEPSEGDGLGEEGLLSRLYEEPAPDRPPGENETYLMQ  
FMEEWGLYVQMN

(SEQ ID NO: 20)

20 (21) Brevican (BCAN, BEHAB, Nº de acceso en Genbank AF229053)

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

30 911 aa

MAQLFLPLLAALVLAQAPAALADVLEGDSSEDRAFRVRVIAGDAPLQGVLLGGALTI PCHVH  
YLRPPPSRRAVLGSPRVKWTFLSRGREAELVARGVRVKVNEAYRFRVALPAYPASLTDV  
SLALSELPNDSGIYRCEVQHGIDDSSDAVEVKVKGVVFLYREGSARYAFSFGAQEACA  
RIGAHIAITPEQLYAAYLGGYEQCDAGWLSDQTVRYPQTREACYGDMDGFPGVNYGVV  
DPDDLYDVYCYAEDNLNGELFLGDPPEKLTLEEAEARAYCQERGAEIATTGQLYAAWDGGLDH  
CSPGWLADGSVRYPIVTPSQRCGGGLPGVKTLFLFPNQTGFPNKHSRFNVYCFRDSAQPS  
AIPEASNPASNPNPASDGLEAIVTVTETLEELQLPQEATESESRGAIYISIPIMEDGGGSST  
PEDPAEAPRTLLEFETQSMVPPTGSEEEGKALEEEEKYEDEEEKEEEEEEEVEDEALW  
AWPSELSSPGPEASLPTEPAAQEKSLSQAPARAVLQPGASPLPDGESEASRPPRVHPPT  
ETLPTPRERNLASPSPSTLVEAREVGEGATGGPELSGVPRGESEETGSSEGAPSLLPATRA  
PEGTRELEAPSEDNSGRTAPAGTSVQAQPVLPTDSASRGGVAVVPASGDCVPSPCHNGGT  
CLEEEEGVRCLCLPGYGGDLCVGLRFCNPGWDAFQGACYKHFSTRRSWEEAETQCRMIG  
AHLASISTPEEQDFINNRYREYQWIGLNDRTIEGDFLWSDGVPLLYENWNPGQPD SYFLS  
GENCVVMVWHDQGQWSDVPVCNYHLSYTCKMGLVSCGPPPPLAQVFGRPRLRYEVDTVL  
RYRCREGLAQRNPLIRCQENGRWEAPQISCVPRRPARALHPEEDPEGRQGRILLGRWKAL

(SEQ ID NO: 21)

- 5 (22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, Nº de acceso en Genbank NM\_004442) Chan, J. y Watt,V.M.,  
Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991) Oncogene 10 (5): 897-905 (1995), Annu. Rev. Neurosci. 21: 309-345 (1998),  
Int. Rev. Cytol. 196: 177-244 (2000); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento  
10 WO200053216 (Reivindicación 1; Página 41); documento WO2004065576 (Reivindicación 1); documento  
WO2004020583 (Reivindicación 9); documento WO2003004529 (Páginas 128-132); documento WO200053216  
(Reivindicación 1; Página 42);  
Referencias cruzadas: MIM:600997; NP\_004433.2; NM\_004442\_1  
987 aa

MALRRLGAALELLPLLAAVEETLMDSTTATAELGWMVHPPSGWEEVSGYDENMNTIRTYQ  
VCNFESSQNNWLRTKFIERRGAHRIHVEMKFSVRDCSSI P VPGSCKETFNLYYYEADF  
DSATKTFPNWMENPWVKVDTIAADESFQSVDLGGRVMKINTEVRSFGPVSRSGFYLAQD  
YGGCMSLIAVRVYRKCPRIIQNGAIFQETLSGAESTSLVAARGSCI ANAEEDVPIKLY  
CNGDGEWLVPIGRCMCKAGFEAVENGTCRGCPSTFKANQGDEACTHCPINSRTTSEGA  
TNVCVRNGYYRADLDPLDMPCTTIPSAPQAVISSVNETSLM LEWTPPRDSGGREDLVNI  
ICKSCGSGRGACTRCDNVQYAPRQLGLTEPRIYISDLAHTQYT FEIQAVNGVTDQSPF  
SPQFASVNITTNQAAPS AVSIMHQVSRTVDSITLWSQPDQPNGVILDYELQYYEKE  
YNATAIKSPTNTVTVQGLKAGAIYVFQVRARTVAGYGRYSGKMYF QTMTAEYQTSIQEK  
LPLII GSSAAGLVFLIAVVVIAIVCNRRGFERADSEYTDKLQHYTSGHMTPGMKIYIDP  
FTYEDPNEAVREFAKEIDISCVKIEQVIGAGEFGEVCSGHLKLPKGKREIFVAIKTLKSGY  
TEKQRRDFLSEASIMGQFDHPNVIHLEGVVTKSTPVMII TEFMENGSLDSFLRQNDQFT  
VIQLVGMRLGIAAGMKYLADMNVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFGLSRFLEDDTS DPT  
YTSALGGKIPIRWTAPEAIQYRKFTSASDVWSYGI VMWEVMSYGERPYWDMTNQDVINAI  
EQDYRLPPPMDCPSALHQLMLDCWQKDRNHRPKFGQIVNTLDKMIRNPNSLKAMAPLSSG  
INPLLLDRTIPDYTSFNTVDEWLEAIKGQYKESFANAGFTSF D VVSQMMEDILRVGVT  
LAGHQKKILNSIQVMRAQM NQIQSVEV

15

(SEQ ID NO: 22)

- (23) ASLG659 (B7h, Nº de acceso en Genbank AX092328)  
documento US20040101899 (Reivindicación 2); documento WO2003104399 (Reivindicación 11); documento

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

10 282 aa

MASLGQILFWSIISIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEP  
DIKLSDIVIQWLKEGVGLVLHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNV  
QLTDAGTYKYIITSKGKKNNANLEYKTGAFSMPEVNVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVV  
WASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKV  
TESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMNK

(SEQ ID NO: 23)

15 (24) PSCA (Percusor antigénico de células madre prostáticas, Nº de acceso en Genbank AJ297436) Reiter R.E., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., et al. Oncogene 19, 1288-1296, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3): 783-788; documento WO2004022709; documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento US2004018553 (Reivindicación 17); documento WO2003008537 (Reivindicación 1); documento WO200281646 (Reivindicación 1; Página 164); documento WO2003003906 (Reivindicación 10; Página 288); documento WO200140309 (Ejemplo 1; Fig 17); documento US2001055751 (Ejemplo 1; Fig 1b); documento WO200032752 (Reivindicación 18; Fig 1); documento WO9851805 (Reivindicación 17; Página 97); documento WO9851824 (Reivindicación 10; Página 94); documento WO9840403 (Reivindicación 2; Fig 1B); Acceso: 043653; EMBL; AF043498; AAC39607.1.

25 123 aa

MKAVLLALLMAGLALQPGTALLCYSCQAQVSNECLQVENCTQLGEQCWTARIRAVGLLT  
VISKGCSLNVCDDSQDYYVGKKNITCCDTDLCNASGAHALQPAAAILALLPALGLLLWGP  
GQL

(SEQ ID NO: 24)

30 (25) GEDA (Nº de acceso en Genbank AY260763);  
AAP14954 proteína de tipo pareja de fusión de lipoma de hmgic /pid = AAP14954.1 - Homo sapiens  
Especie: Homo sapiens (humano)  
documento WO2003054152 (Reivindicación 20); documento WO2003000842 (Reivindicación 1); documento WO2003023013 (Ejemplo 3, Reivindicación 20); documento US2003194704  
(Reivindicación 45);  
Referencias cruzadas: GI:30102449; AAP14954.1; AY260763\_1  
236 aa

MPGAAAAAAAAAAMLPAQEAKLYHTNYVRNSRAIGVLWAIFTICFAIVNVVCFIQPYW  
IGDGVDTPQAGYFGLFHYCIGNGSRELTCRGSFTDFSTLPSGAFKAASFFIGLSMMLII  
ACIICFTLFFFNTATVYKICAWMQLTSAACLVLGCMIFPDGWDSDEVKRMCGEKTDKYT  
LGACSVRWAYILAIIGILDALILSFLAFVLGNRQDSLMAEELKAENKVLLSQYSLE

(SEQ ID NO: 25)

45 (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, receptor 3 de BLyS, BR3, Nº de acceso en Genbank NP\_443177.1); NP\_443177 BAFF receptor /pid=NP\_443177.1 - Homo sapiens Thompson,J.S., et al. Science 293 (5537), 2108-2111 (2001); documento WO2004058309; documento WO2004011611; documento WO2003045422 (Ejemplo; Páginas 32-33); documento WO2003014294 (Reivindicación 35; Fig 6B); documento WO2003035846 (Reivindicación 70; Páginas 615-616); documento WO200294852 (Col 136-137); documento WO200238766 (Reivindicación 3; Página 133); documento WO200224909 (Ejemplo 3; Fig 3); Referencias cruzadas: MIM:606269; NP\_443177.1; NM\_052945\_1

184 aa

MRRGPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQ  
 ESVGAGAGEAALPLPGPLLFGAPALLGLALVLVGLVSWRRRQRRRLRGASSAEAPDGD  
 KDAPEPLDKVIILSPGISDATAPAWPPPGEDEPGTTPPGHSVPVPATELGSTELVTTKTAG  
 PEQQ

5 (SEQ ID NO: 26)

(27) CD22 (isoforma CD22-B de receptores de linfocitos B, Nº de acceso en Genbank NP-001762.1); Stamenkovic,I. y Seed, B., Nature 345 (6270), 74-77 (1990); documento US2003157113; documento US2003118592; documento WO2003062401 (Reivindicación 9); documento WO2003072036 (Reivindicación 1; Fig 1); documento WO200278524 (Ejemplo 2); Referencias cruzadas: MIM:107266; NP\_001762.1; NM\_001771\_1

847 aa

MHLLGPWLLLLVLEYLAFLSDSSKWVFEHPETLYAWEGACVWIPTYRALDGDLESFILFH  
 NPEYNKNNTSKFDGTRIYESTKDGKVPSEQKRVQFLGDKNKNCTLSSIHPVHLNDSGQLGLR  
 MESKTEKWMERIHLNVSERPFPFFPHIQLPPIQESQEVTLTCLLNFSGYGYPIQLQWLLEG  
 VPMRQAATSTSLSITKSVFTRSELKFSPQWSHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKH  
 TPKLEIKVTPSDAIVREGDSVTMTCEVSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNLREVT  
 KDQSGKYCCQVSNDVGPGRSEEVFLQVQYAPEPSTVQILHSPAVERGSQVEFLCMSLANPL  
 PTNYTWYHNGKEMQGRTEEKVHIPKILPWHAGTYSCVAENILGTGQRGPGAEVDVQYPPK  
 KVTTVIQNPMPIREGDTVTLSNCYNNSNPSVTRYEWKPHGAWEEPSLGVLKIQNVGWDNT  
 TIACARCNSWCWSASPVALNVQYAPRDVVRKIKPLSEIHSGNSVSLQCDFSSHPKEVQ  
 FFWEKNGRLLGKESQLNFDISIPEDAGSYSCWVNNSIGQTASKAWTLEVLVYAPRRLRVSM  
 SPGDQVMEGKSATLTCESDANPPVSHYTWFDWNNQSLPHHSQKLRIEPVKVQHSGAYWCQ  
 GTNSVKGRSPLSTLTIVYSPETIGRRAVGLGCLAILILAICGLKLQRRWKRTQSQQG  
 LQENSSGOSFFVRNKKVRRAPLSEGPHSLGCYNPMMEDGISYTLRFPEMNI PRTGDAES  
 SEMQRPPRTCDDTVTYSALHKKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENV  
 DYVILKH

15 (SEQ ID NO: 27)

(28) CD79a (CD79A, CD79 $\alpha$ , asociado a inmunoglobulina alfa, una proteína específica de linfocitos B que interactúa covalentemente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie de moléculas de IgM, transduce una señal implicada en la diferenciación de linfocitos B) SECUENCIA DE PROTEÍNA Total mpggpgv...dvqlekp (1..226; 226 aa), pl: 4.84, PM: 25028 TM: 2 [P] Gen Cromosoma: 19q13.2, Nº de acceso en Genbank NP\_001774.1; documento WO2003088808, documento US20030228319; documento WO2003062401 (reivindicación 9); documento US2002150573 (reivindicación 4, páginas 13-14); documento WO9958658 (reivindicación 13, Fig 16); documento WO9207574 (Fig 1); documento US5644033; Ha et al. (1992) J. Immunol. 148 (5): 1526-1531; Mueller et al (1992) Eur. J. Biochem. 22: 1621-1625; Hashimoto et al. (1994) Immunogenetics 40( 4): 287-295; Preud'homme e al. (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1):141-146; Yu et al. (1992) J. Immunol. 148 (2) 633-637; Sakaguchi et al. (1988) EMBO J. 7 (11): 3457-3464; 226 aa

30 MPGGPGVILQALPATIFLLFLSAVYLGPQCOALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSN  
 NANVTWWRVLHGNYTWPPEFLPGPGEDPNGTLIIQNVNKSHGGIYVCRVQEGNESYQQSCG  
 TYLRVRQPPPRPFLDMGEGTKRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGD  
 EYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP

(SEQ ID NO: 28)

35 (29) CXCR5 (receptor del linfoma de Burkitt 1, un receptor acoplado a la proteína G que se activa con la quimioquina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y en la defensa humoral, desempeña un papel en la

infección por VIH-2 y quizá en el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma, y leucemia) SECUENCIA DE PROTEÍNA Total mnypytl...atslutf (1..372; 372 aa), pl: 8.54 PM: 41959 TM: 7 [P] Gen Cromosoma: 11q23.3, Nº de acceso en Genbank NP\_001707.1;

5 documento WO2004040000; documento WO2004015426; documento US2003105292 (Ejemplo 2); documento US6555339 (Ejemplo 2); documento WO200261087 (Fig 1); documento WO200157188 (Reivindicación 20, páginas 269); documento WO200172830 (página 12-13); documento WO200022129 (Ejemplo 1, páginas 152-153, Ejemplo 2, páginas 254-256); documento WO9928468 (reivindicación 1, página 38); documento US5440021 (Ejemplo 2, col 49-52); documento WO9428931 (páginas 56-58); documento WO9217497 (reivindicación 7, Fig 5); Dobner et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22: 2795-2799; Barella et al. (1995) Biochem. J. 309:773-779;

10 372 aa

```
MNYPLTLEMDLENLEDLFWELDRLDNYNDTSLVENHLCPATGPLMASFKAVFVPVAYSL
IFLLGVIGNVLVLVILERHRQTRSSTETFLFHIALADLLLVLFILPFAVAEGSGVGWVLGTF
LCKTVIALHKVNFYCSSLLLACIAVDRYLAIVHAVHAYRHRRLLSIHTCGTIWLVGPLL
ALPEILFAKVSQGHNNNSLPRCTFSQENQAETHAWFTSRFLYHVAGFLLPMVMGWCYVG
VVHRLRQAQRRPQRQKAVRVAILVTSIFFLCWSPYHIVIFLDTLARLKAVDNTCKLNGL
PVAITMCEFLGLAHCCCLNPMLYTFAGVKFRSDLSSRLTKLGCTGPASLCQLFPSWRSSL
SESENATSLTF
```

(SEQ ID NO: 29)

15 (30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula MHC de clase II (antígeno Ia) que se une a péptidos y los presenta a linfocitos T CD4+) SECUENCIA DE PROTEÍNA Total mgsgwvp...vllpqsc (1..273; 273 aa, pl: 6.56 PM: 30820 TM: 1 [P] Gen Cromosoma: 6p21.3, Nº de acceso en Genbank NP\_002111.1;

20 Tonnelle et al. (1985) EMBO J. 4 (11): 2839-2847; Jonsson et al. (1989) Immunogenetics 29 (6): 411-413; Beck et al. (1992) J. Mol. Biol. 228: 433-441; Strausberg et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99: 16899-16903; Servenius et al. (1987) J. Biol. Chem. 262: 8759-8766; Beck et al. (1996) J. Mol. Biol. 255: 1-13; Naruse et al. (2002) Tissue Antigens 59: 512-519; documento WO9958658 (reivindicación 13, Fig 15); documento US6153408 (Col 35-38); documento US5976551 (col 168-170); documento US6011146 (col 145-146); Kasahara et al. (1989) Immunogenetics 30 (1): 66-68; Larhammar et al. (1985) J. Biol. Chem. 260 (26): 14111-14119;

25 273 aa

```
MGSGWVPWWVALLVNLTRLDSSMTQGTDSPEDFVIQAKADCYFTNGTEKVQFVVRIFNLL
EEYVRFDSDVGMFVALTKLGQPDAEQWNSRLLERSRQAVDGCRHNYRLGAPFTVGRK
VQPEVTVYPERTPLIHQNLLHCSVITGFYPGDIKIKWFNGQEERAGVMSTGPIRNGDWT
FQTVVMLEMTPELGHVYTCLVDHSSLLSPVSVEWRAQSEYSWRKMLSGIAAFLGLIPLL
VGIVIQLRAQKGYVRTQMSGNEVSRAVLLPQSC
```

(SEQ ID NO: 30)

30 (31) P2X5 (Canal iónico 5 abierto por el ligando receptor purinérgico P2X, un canal aniónico abierto por ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión y en la neurogénesis sináptica, la deficiencia puede contribuir a la patofisiología de inestabilidad) SECUENCIA DE PROTEÍNA Total mgqagck...lephrst (1..422; 422 aa), pl: 7.63, PM: 47206 TM: 1 [P] Gen Cromosoma: 17p13.3, Nº de acceso en Genbank NP\_002552.2;

35 Le et al. (1997) FEBS Lett. 418 (1-2): 195-199; documento WO2004047749; documento WO2003072035 (reivindicación 10); Touchman et al. (2000) Genome Res. 10: 165-173; documento WO200222660 (reivindicación 20); documento WO2003093444 (reivindicación 1); documento WO2003087768 (reivindicación 1); documento WO2003029277 (página 82);

422 aa

MGQAGCKGLCLSLFDYKTEKYVIAKNKKVGLLYRLLQASILAYLWWWVFLIKKGYQDVDT  
 SLQSAVITKVKGVAFTNTSDLGQRIWDVADYVIAPAQGENVFFVVTNLIVTPNQRQNVAE  
 NEGI PDGACSKDSDCHAGEAVTAGNGVKTGRCLRRENLAGTCEI FAWCPLETSSRPEEP  
 FLKEAEDFTIFIKNHIRFPKFNFSDKSNSVMDVKDRSFLKSCHFGPKNHYCPIFRLGSVIRW  
 AGSDFQDIALEGGVIGINIEWNCDDLKAASECHPHYSFSRLDNKL SKSVSSGYNFRPARY  
 YRDAAGVEFRTLMKAYGIRFDVMVNGKGAFFCDLVLIYLTKREFYRDKKYEEVRGLEDS  
 SQEAEDEASGLGLSEQLTSGPGLLGMPEQQELQEPPEAKRGSSSQKGNGSVCQPLLEPHR  
 ST

(SEQ ID NO: 31)

5 (33) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de linfocitos B , Lyb-2) SECUENCIA DE PROTEÍNA Total  
 maeaity...tafrfpd (1..359; 359 aa), pl: 8.66, PM: 40225 TM: 1 [P] Gen Cromosoma: 9p13.3, Nº de acceso en  
 Genbank NP\_001773.1;  
 documento WO2004042346 (reivindicación 65); documento WO2003026493 (páginas 51-52, 57-58); documento  
 10 WO200075655 (páginas 105-106); Von Hoegen et al. (1990) J. Immunol. 144 (12): 4870-4877; Strausberg et al.  
 (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99: 16899-16903;  
 359 aa

MAEAITYADLRFVKAPLKKSISRLGQDPGADDGEITYENVQVPAVLGVPSSLASSVLG  
 DKAAVKSEQPTASWRAVTSPAVGRILPCRTTCLRYLLLGLLLCLLGVTAICLGVRYLQ  
 VSQQLQQTNRVLEVNTSSLRQQLRLKITQLGQSAEDLQGSRRELAQSQEALQVEQRAHQA  
 AEGQLQACQADRQTKETLQSEEQQRRALEQKLSNMENRLKPFFTGSADTCPSGWIMH  
 QKSCFYISLTSKNWQESQKCETLSSKLATFSEIYPQSHSYYFLNSLLPNGGSGNSYWTG  
 LSSNKDWKL TDDTQRTRTYAQSSKCNKVKHTWSWTLESES CRSSL PYICEMTAFRFPD

(SEQ ID NO: 32)

15 (33) LY64 (Antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repetición rica en  
 leucina (LRR), regula la activación y apoptosis de linfocitos B, la pérdida de función está asociada con mayor  
 actividad de la enfermedad en pacientes con lupus sistémico eritematoso) SECUENCIA DE PROTEÍNA Total  
 20 mafdvsc...rwkyhi (1..661; 661 aa), pl: 6.20, PM: 74147 TM: 1 [P] Gen Cromosoma: 5q12, Nº de acceso en  
 Genbank NP\_005573.1; documento US2002193567; documento WO9707198 (reivindicación 11, páginas 39-42);  
 Miura et al. (1996) Genomics 3 (3): 299-304; Miura et al. (1998) Blood 92: 2815-2822; documento  
 25 WO2003083047; documento WO9744452 (reivindicación 8, páginas 57-61); documento WO200012130 (páginas  
 24-26);  
 661 aa

MAFDVSCFFWVVLFSAGCKVITSWDQMCIEKEANKTYNCENGLSEIPDTLPNTTEFLEF  
 SFNFLPTIHNRTPSRLMNLTFPLDLTRCQINWIHEDTFQSHHQLSTLVTGNPLIFMAETS  
 LNGPKSLKHLFLIQTGISNLEFIPVHNLENLESLYLGSNHISSIKFPKDFPARNLKVLD  
 QNNAIHYISREDMRSLEQAINLSLNFNGNNVKGIELGAFDSTVFQSLNFGGTPNLSVIFN  
 GLQNSTTQSLWLGTFEDIDDEDISSAMLKGLCEMSVESNLQEHRFSDISSTTFQCFTQL  
 QELDLTATHLKGLPSGMKGLNLLKKLVLSVNHFQLCQISAANFPSLTHLYIRGNVKKLH  
 LGVGCLEKLGNLQTLDLSHNDIEASDCCSLQLKNLSHLQTLNLSHNEPLGLQSQAFKECP  
 QLELLDLAFTRLHINAPQSPFQNLHFLQVLNLTYCFLDTSNQHLLAGLPVLRHNLKGHN  
 FQDGTTKTNLLQTVGSLEVLILSSCGLLSIDQQQAFHSLGKMSHVDLSHNSLTCDSIDSL  
 SHLKGIIYLNLAANSINIISPRLLPILSQSTINLSHNPLDCTCSNIHFLTWTYKENLHKLE  
 GSEETTCANPPSLRGVKLSDVKLSCGITAIGIFPLIVFLLLAILLFAVKYLLRWKYQH  
 I

(SEQ ID NO: 33)

(34) FCRH1 (proteína 1 de tipo receptor de Fc, 1 supuesto receptor para el dominio Fc de la inmunoglobulina que contiene los dominios similar a Ig de tipo C2 e ITAM, puede tener un papel en la diferenciación de linfocitos B) SECUENCIA DE PROTEÍNA Total mlprll...vdye-dam (1..429; 429 aa), pl: 5.28, PM: 46925 TM: 1 [P] Gen Cromosoma: 1q21-1q22, Nº de acceso en Genbank NP\_443170.1; documento WO2003077836; documento WO200138490 (reivindicación 6, Fig 18E-1-18-E-2); Davis et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98 (17): 9772-9777; documento WO2003089624 (reivindicación 8); documento EP1347046 (reivindicación 1); documento WO2003089624 (reivindicación 7); 429 aa

```

MLPRLLLLICAPLCEPAELFLIASPSHPTEGSPVTLTCKMPFLQSSDAQFQFCFFRDTRA
LGPGWSSSPKLQIAAMWKEDTGSYWCEAQTMASKVLRSSRSQINVHRVPADVSLETQPP
GGQVMEGDRLVLICSVAMGTGDTIFLWYKGAVGLNLQSKTQRSLTAEYEIPSVRESDAEQ
YYCVAENGYGPSPSGLVSITVRIPVSRPILMLRAPRAQAAVEDVLELHEALRGSPPILY
WFYHEDITLGSRSAPSGGGASFNLSTEEHSGNSCEANNGLGAQRSEAVTLNFTVPTGA
RSNHLTSGVIEGLLSTLGPATVALLFCYGLKRKIGRRSARDPLRSLPSPLPQEFTYLNSP
TPGQLQPIYENVNVVSGDEVYSLAYNQPEQESVAAETLGTHMEDKVSLDIYSRLRKANI
TDVDYEDAM

```

(SEQ ID NO: 34)

(35) IRTA2 (Translocación asociada al receptor 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas, un supuesto inmunoreceptor con posibles papeles en el desarrollo y la linfomagénesis de linfocitos B; la desregulación de los genes por translocación se produce en algunas neoplasias de linfocitos B) SECUENCIA DE PROTEÍNA Total mlwvil...assaphr (1..977; 977 aa), pl: 6.88 PM: 106468 TM: 1 [P] Gen Cromosoma: 1q21, Nº de acceso en Genbank NP\_112571.1; documento WO2003024392 (reivindicación 2, Fig 97); Nakayama et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277 (1): 124-127; documento WO2003077836; documento WO200138490 (reivindicación 3, Fig 18B-1-18B-2); 977 aa

```

MLLWVILLVLAPVSGQFARTPRPIIFLQPPWTTVFQGERVTLTCKGFRFYSPQKTKWYHR
YLGKEILRETPDNILEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVHLDFFSSASLILQAPLSVFEQDSVV
LRCRAKAEVTLNNTIYKNDNVLAFLNKRTDFHIPHAACLKDNGAYRCTGYKESCCPVSSNT
VKIQVQEPFTRPVLRASSFQPISGNPVTLTCETQLSLERSDVPLRFRFFRDDQTLGLGWS
LSPNFQITAMWSKDSGFYWCKAATMPHSVISDSPRSWIQVQIPASHPVLTLSPEKALNFE
GTKVTLHCETQEDSLRTLRYRFYHEGVPLRHKSVCERGASISFSLTTENSGNYCTADNG
LGAKPSKAVSLSVTVPVSHPVNLSSPEDLIFEAGAKVTLHCEAQRGSLPILYQFHEDAA
LERRSANSAGGVAISFSLTAEHSGNYCTADNGFGPQRSKAVSLSITVPVSHPVTLSSA
EALTPEGATVTLHCEVQRGSPQILYQFYHEDMPLWSSSTPSVGRVSFSFSLTEGHSGNY
CTADNGFGPQRSEVVSLFVTVPVSRPILTLRVPRQAQAVVGDLLELHCEAPRGSPPILYWF
YHEDVTLGSSSAPSGGEASFNLSLTAEHSGNSCEANNGLVAQHSDTISLSVIVPVSRI
LTFRAPRAQAVVGDLLELHCEALRGSSPILYWFYHEDVTLGKISAPSGGGASFNLSLTE
HSGIYSCEADNGPEAQRSEMVTLKVAVPVSRPVTLRAPGTHAAVGDLLELHCEALRGSP
LILYRFFHEDVTLGNRSSPSGGASNLNLTAEHSGNSCEADNGLGAQRSETVTLYITGL
TANRSGPFATGVAGGLLSIAGLAAGALLLYCWLSRKAGRKPASDPARSPPDSDSQEPYH
NVPAAEELQPVYTNAAPRGENVYSEVRIIQEKKKHAVASDPRHLRNKGSPPIYSEVKVA
STPVSGSLFLASSAPHR

```

(SEQ ID NO: 35)

30

Véase también: documento WO04/045516 (03 Jun 2004); documento WO03/000113 (03 Ene 2003); documento WO02/016429 (28 Feb 2002); documento WO02/16581 (28 Feb 2002); documento WO03/024392 (27 Mar 2003); documento WO04/016225 (26 Feb 2004); documento WO01/40309 (07 Jun 2001), y solicitud de patente Provisional de Estados Unidos con Nº de Serie 60/520842 "COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF TUMOR OF HEMATOPOIETIC ORIGIN", presentada el 17 Nov 2003.

En un ejemplo, el Conjugado de Ligando-Conector-Fármaco tiene la Fórmula IIIa, en la que el Ligando es un anticuerpo Ab que incluye uno que se une a al menos un antígeno de CD30, CD40, CD70, Lewis Y, w = 0, y = 0, y D tiene la Fórmula Ib. Conjugados a Modo de ejemplo de Fórmula IIIa incluyen aquéllos en los que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-.

Además, se incluyen dichos Conjugados de Fórmula IIIa en la que D tiene la estructura del Compuesto 2 en el Ejemplo 3 y ésteres del mismo. Además, se incluyen dichos Conjugados de Fórmula IIIa que contienen de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, en un aspecto, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 restos de Fármaco D, es decir, los Conjugados de Fórmula la en la que p es un valor en el intervalo de aproximadamente 3-8, por ejemplo aproximadamente 3-5. También se describen conjugados que contienen combinaciones de las características estructurales que se indican en este párrafo.

En otro ejemplo, el Conjugado de Ligando-Conector-Fármaco tiene la Fórmula IIIa, en la que el Ligando es un Anticuerpo Ab que se une a un antígeno de CD30, CD40, CD70, Lewis Y, w = 1, y = 0, y D tiene la Fórmula Ib. Se incluyen dichos Conjugados de Fórmula IIIa en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-.

Además, se incluyen dichos Conjugados de Fórmula IIIa en la que W es -Val-Cit-, y/o en la que D tiene la estructura del Compuesto 2 en el Ejemplo 3 y ésteres del mismo. Además, se incluyen dichos Conjugados de Fórmula IIIa que contienen de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, preferentemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 restos de Fármaco D, es decir, Conjugados de Fórmula la en la que p es un valor en el intervalo de aproximadamente 3-8, preferentemente de aproximadamente 3-5. Los Conjugados que contienen combinaciones de las características estructurales que se indican en este párrafo también son a modo de ejemplo.

En un ejemplo, el Conjugado de Ligando-Conector-Fármaco tiene la Fórmula IIIa, en la que el Ligando es un Anticuerpo Ab que se une a un antígeno de CD30, CD40, CD70, Lewis Y, w = 1, y = 1, y D tiene la Fórmula Ib. Se incluyen los Conjugados de Fórmula IIIa en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-.

Además, se incluyen dichos Conjugados de Fórmula IIIa en la que: W es -Val-Cit-; Y has Fórmula X; D tiene la estructura del Compuesto 2 en el Ejemplo 3 y ésteres del mismo; p es de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, preferentemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 restos de Fármaco D. También se contemplan los Conjugados que contienen combinaciones de las características estructurales que se indican en este párrafo.

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

Un ejemplo es el Compuesto TAA o sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo que está en forma aislada y purificada. También se describe un método para eliminar o inhibir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa que comprende administrar a un paciente, por ejemplo un ser humano con un trastorno hiperproliferativo, una cantidad del Compuesto TAA o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, siendo dicha cantidad eficaz para eliminar o inhibir la multiplicación de una célula tumoral o una célula cancerosa.

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

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

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

#### **4.5.1 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES**

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

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

oligonucleótidos de solapamiento que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, hibridación y ligadura de esos oligonucleótidos, y a continuación amplificación de los oligonucleótidos ligados, *por ejemplo*, por PCR.

- 5 Como alternativa, una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo se puede generar a partir de una fuente adecuada. Si un clon que contiene el ácido nucleico que codifica el anticuerpo en particular no está disponible, pero se conoce la secuencia del anticuerpo, se puede obtener un ácido nucleico que codifica el anticuerpo a partir de una fuente adecuada (*por ejemplo*, una biblioteca de cADN de anticuerpos, o una biblioteca de cADN generada a partir de cualquier tejido o células que expresan la inmunoglobulina) mediante, *por ejemplo*, amplificación por PCR usando 10 cebadores sintéticos que se pueden hibridar en los extremos 3' y 5' de la secuencia mediante clonación usando una secuencia de oligonucleótidos específica para la secuencia genética en particular.

Si un anticuerpo que reconoce específicamente un antígeno en particular no está disponible en el mercado (o una fuente para una biblioteca de cADN para clonar un ácido nucleico que codifica dicha inmunoglobulina), los anticuerpos específicos para un antígeno en particular se pueden generar mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por inmunización de un paciente, o modelo animal adecuado tal como conejo o ratón, para generar anticuerpos policlonales o, más preferentemente, mediante generación de anticuerpos monoclonales, *por ejemplo*, tal como se describe en Kohler y Milstein (1975, Nature 256: 495-497) o, tal como se describe en Kozbor et al. (1983, Immunology Today 4:72) o Cole et al. (1985 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96). Como alternativa, se puede obtener un clon que codifica al menos la porción Fab del anticuerpo por identificación sistemática de bibliotecas de expresión de Fab (por ejemplo, tal como se describe en Huse et al., 20 1989, Science 246: 1275-1281) para clones de fragmentos de Fab que se unen al antígeno específico o mediante identificación sistemática de bibliotecas de anticuerpos (Véase, *por ejemplo*, Clackson et al., 1991, Nature 352: 624; Hane et al., 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4937).

25 Una vez que se obtiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifican al menos el dominio variable del anticuerpo, se puede introducir en un vector que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica las regiones constantes del anticuerpo (véase, *por ejemplo*, Publicación Internacional N° WO 86/05807; documento WO 89/01036; y Patente de Estados Unidos N° 5122464). Están disponibles vectores que contienen la cadena ligera o pesada completa que permite la expresión de una molécula completa de anticuerpo. A continuación, se puede usar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo para introducir las sustituciones o supresiones de nucleótidos necesarias para sustituir (o suprimir) el uno o más restos de cisteína de la región variable que participan en una unión disulfuro intracadena con un resto de aminoácido que no contiene un grupo sulfhidrilo. Dichas modificaciones se pueden realizar mediante cualquier método conocido en la técnica para la introducción de mutaciones o supresiones 30 específicas en una secuencia de nucleótidos, *por ejemplo*, pero no se limitan a, mutagénesis química y mutagénesis dirigida al sitio *in vitro* (Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem. 253: 6551).

35 Además, se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos químéricos" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312: 604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314: 452-454) mediante empalme de genes a partir de la molécula de anticuerpos de ratón de una especificidad a 40 antígenos apropiada junto con genes a partir de una molécula de anticuerpo humano y actividad biológica apropiada. Un anticuerpo químérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal de murino y una región constante de inmunoglobulina humana, *por ejemplo*, anticuerpos humanizados.

45 Como alternativa, técnicas que se describen para la producción de anticuerpos de una sola cadena (Patente de Estados Unidos N° 4.694.778; Bird, 1988, Science 242: 423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; y Ward et al., 1989, Nature 334: 544-54) se pueden adaptar para producir anticuerpos de una sola cadena. Los anticuerpos de una sola cadena se forman por unión de los fragmentos de cadena pesada y ligera de la 50 región Fv a través de un puente de aminoácido, dando como resultado un polipéptido de una sola cadena. Además, se pueden usar técnicas para el ensamblaje de fragmentos funcionales de Fv en *E. coli* (Skerra et al., 1988, Science 242: 1038-1041).

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

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

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

Las células huésped usadas para expresar el anticuerpo recombinante pueden ser células bacterianas tales como *Escherichia coli*, o, preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de toda la molécula de inmunoglobulina recombinante. En particular, células de mamíferos tales como células de ovario de hámster chino (CHO), en conjunto con un vector tal como el elemento promotor genético primitivo intermedio principal de citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para inmunoglobulinas (Foecking et al., 1988, Gene 45:101; Cockett et al., 1990, BioTechnology 8:2).

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

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

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

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

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

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

Se puede usar un número de sistemas de selección, que incluyen pero no se limitan a la timidina quinasa del virus del herpes simplex (Wigler et al., 1977, Cell 11: 223), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., 1980, Cell 22: 817), se pueden usar genes en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Además, se puede usar resistencia antimetabolitos como la base de selección para los siguientes genes: DHFR, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofénólico (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Clinical Pharmacy 12: 488-505; Wu y Wu, 1991, Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596; Mulligan, 1993, Science 260: 926-932; y Morgan y Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; mayo de 1993, TIB TECH 11 (5): 155-215) e higro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre et al., 1984, Gene 30: 147). Los métodos conocidos normalmente en la técnica de tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel et al. (eds., 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (eds.), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1).

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

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

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

En un ejemplo particular, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En cualquier caso, los anticuerpos híbridos tienen una especificidad doble, preferentemente con uno o más sitios de unión específicos para el hapteno de elección o uno o más sitios de unión específicos para un o antígeno diana, por ejemplo, un antígeno asociado con un tumor, una enfermedad autoinmune, un organismo infeccioso, u otro estado de enfermedad.

5

#### 4.5.2 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

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

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

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

##### **(i) Anticuerpos Polyclonales**

Los anticuerpos polyclonales aumentan preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que es immunogénica en las especies a inmunizar, *por ejemplo*, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o de derivatización, *por ejemplo*, éster de maleimidobenzoíl sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl<sub>2</sub>, o R<sup>1</sup>N=C=NR, en el que R y R<sup>1</sup> son grupos alquilo diferentes.

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

##### **(ii) Anticuerpos Monoclonales**

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

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando el método del hibridoma que se describió primero en y Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975), o se puede preparar mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos Nº 4816567).

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

65

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma precursoras, sin fundir. Por ejemplo, si las células de mieloma precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá por lo general hipoxantina, aminopterina, y timidinla (medio de HAT), cuyas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

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

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

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

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

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

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

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

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

### (iii) Anticuerpos Humanizados

Un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácido no humano a menudo se denominan restos "de importación", que

5 por lo general se toman de un dominio variable "de importación". La humanización se puede realizar básicamente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., Science 239: 1534-1536 (1988)), mediante sustitución de secuencias de la 10 región hipervariable las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos químicos (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567) en los que básicamente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son por lo general anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algún resto de FR están sustituidos con restos de sitios 15 análogos en anticuerpos de roedor.

15 La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a usar en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se identifica sistemáticamente frente a toda la biblioteca de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana es la más cercana a la del roedor se acepta a continuación como la región marco humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., J. 20 Immunol., 151: 2296 (1993); Chotia et al., J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Otro método usa una región marco en particular obtenida a partir de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de cadenas ligera o pesada. El mismo marco se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151: 2623 (1993)).

25 Los anticuerpos se pueden humanizar con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Los anticuerpos humanizados se pueden preparar mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursora y humanizada. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están disponibles habitualmente son familiares para los expertos en la materia. Están disponibles programas de ordenador que ilustran y presentan 30 estructuras conformacionales en tres dimensiones probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias, receptora y de importación, de modo que se consigue la característica deseada 35 del anticuerpo, tal como mayor afinidad por el antígeno o antígenos diana. En general, los restos de la región hipervariable están directamente y más básicamente implicados en la influenciación de la unión a antígenos.

Se contemplan diversas formas del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un 40 fragmento de anticuerpo, tal como un Fab. Como alternativa, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo de IgG1 intacto.

Los Ejemplos describen la producción de un anticuerpo anti-ErbB2 humanizado a modo de ejemplo. El anticuerpo humanizado puede comprender, por ejemplo, restos de la región hipervariable no humana incorporados en un dominio pesado variable humano y puede comprender adicionalmente una sustitución de la región marco (FR) en 45 una posición seleccionada entre el grupo que consiste en 69H, 71H y 73H usando el sistema de numeración del dominio variable se establece en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>a</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una realización, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones de FR endosó todas las posiciones de 69H, 71H y 73H. Otro Ejemplo describe la 50 preparación de anticuerpo de trastuzumab unificado a partir de la formulación de HERCEPTIN®.

### (iv) Anticuerpos Humanos

Como una alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, en la actualidad es 55 posible producir animales transgénicos (*por ejemplo*, ratones) que son capaces, después de inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógenas. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigoto del gen de la región de unión de cadena pesada del anticuerpo (J<sub>H</sub>) en ratones mutantes químicos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de 60 producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz del gen de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos después de la estimulación con antígenos. Véase, *por ejemplo*, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993); Brugermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); y Patentes de Estados Unidos Nº 5.591.669, Nº 5.589.369 y Nº 5.545.807.

Como alternativa, se puede usar tecnología de presentación de fagos (McCafferty et al., Nature 348: 552-553 (1990)) 65 para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos *in vitro*, a partir de repertorios genéticos dominio variable (V) de inmunoglobulina a partir de donantes sin inmunizar. De acuerdo con esta técnica, genes de dominio

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

#### (v) Fragmentos de anticuerpos

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían a través de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); y Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir en la actualidad directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar a partir de las fagotecas de anticuerpos que se han analizado anteriormente. Como alternativa, fragmentos de Fab'-SH pueden recuperar directamente de E. coli y acoplar químicamente para formar fragmentos de F(ab')<sub>2</sub> (Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, se pueden usar fragmentos de F(ab')<sub>2</sub> directamente de cultivos de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento de Fv de una sola cadena (scFv). Véanse el documento WO 93/16185; Patente de Estados Unidos Nº 5.571.894; y Patente de Estados Unidos Nº 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.641.870 por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o específicos.

#### (vi) Anticuerpos biespecíficos

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

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

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

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

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

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

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

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

#### (vii) Otras modificaciones en la secuencia de aminoácidos

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

anticuerpo, tales como el cambio del número o la posición de sitios de glicosilación.

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

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

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

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

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

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

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

Puede ser deseable modificar el anticuerpo con respecto a la función efectora, *por ejemplo*, con el fin de mejorar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígenos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, resto o restos de cisteína se pueden introducir en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro entre cadenas de esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o mayor muerte celular mediada por complementos y citotoxicidad celular dependientes de anticuerpos (ADCC). Véase Caron et al.

J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). También se pueden preparar anticuerpos homodiméricos con mayor actividad antitumoral usando agentes de reticulación heterobifuncionales tal como se describe en Wolff et al. Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, un anticuerpo se puede modificar genéticamente para que tenga regiones Fc dobles y de ese modo pueda tener mejor lisis de complemento y capacidades de ADCC. Véase Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

Para aumentar la vida media en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítopo de unión a receptores de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5739277, por ejemplo. Tal como se usa en el presente documento, el término "epítopo de unión a receptores de rescate" se refiere a un epítopo de la región Fc de una molécula de IgG (*por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, o IgG<sub>4</sub>*) que es responsable del aumento de la vida media en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

(viii) Variantes de Glicosilación

Los anticuerpos en el ADC de la invención pueden estar glicosilados en posiciones conservadas de sus regiones constantes (Jefferis y Lund, (1997) Chem. Immunol. 65: 111-128; Wright y Morrison, (1997) TibTECH 15: 26-32). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan a la función de la proteína (Boyd et al., (1996) Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe y Howard, (1990) Biochem. 29: 4175-4180), y la interacción intramolecular entre porciones de la glicoproteína que puede afectar a la conformación y presentar superficie tridimensional de la proteína (Hefferis y Lund, *mencionado anteriormente*; Wyss y Wagner, (1996) Current Opin. Biotech. 7: 409-416). Los oligosacáridos también pueden servir para dirigir una glicoproteína dada a determinadas moléculas sobre la base de estructuras específicas de reconocimiento. Por ejemplo, se ha informado que en IgG agalactosilada, el resto de oligosacárido 'se volteó' fuera del espacio entre -CH<sub>2</sub> y restos de N-acetilglucosamina se hacen disponibles para unirse a la proteína de unión a manosa (Malhotra et al., (1995) Nature Med. 1: 237-243). La retirada mediante glicopeptidasa de los oligosacáridos de CAMPATH-1H (un anticuerpo IgG1 monoclonal de murino humanizado recombinante que reconoce el antígeno CDw52 de linfocitos humanos) producido en Células de Ovario de Hámster Chino (CHO) que como resultado una reducción completa en la lisis mediada por complementos (CMCL) (Boyd et al., (1996) Mol. Immunol. 32: 1311-1318), mientras que la retirada selectiva de restos de ácido siálico usando neuraminidasa dio como resultado ninguna pérdida de DMCL. También se ha informado glicosilación de anticuerpos que afecta a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, se informó que células CHO con expresión regulada por tetraciclina de β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glicosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc de bisección, tienen mejor actividad de ADCC (Umana et al. (1999) Mature Biotech. 17: 176-180).

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

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

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

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

La glicosilación (incluyendo patrón de glicosilación) de los anticuerpos también se puede alterar sin alterar la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende en gran medida de la célula huésped usada para expresar el anticuerpo. Dado que el tipo celular usado para la expresión de glicoproteínas recombinantes, por ejemplo, anticuerpos, como agentes terapéuticos potenciales es en raras ocasiones la célula nativa, se pueden esperar variaciones significativas en el patrón de glicosilación de los

anticuerpos. Véase, por ejemplo, Hse et al., (1997) J. Biol. Chem. 272: 9062-9070. Además de la elección de células huésped, factores que afectan a la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen modo de crecimiento, formulación de medios, densidad de cultivos, oxigenación, pH, esquemas de purificación y similares.

5 Se han propuesto diversos métodos para alterar el patrón de glicosilación conseguido en un organismo huésped en particular que incluyen la introducción o sobreexpresión de determinadas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (Patentes de Estados Unidos Nº 5047335; Nº 5510261; Nº 5278299). La glicosilación, o determinados tipos de glicosilación, se pueden eliminar enzimáticamente de la glicoproteína, por ejemplo usando endoglicosidasa H (Endo H). Además, la célula huésped recombinante se puede modificar genéticamente, por ejemplo, hacerla defectuosa en el procesamiento de determinados tipos de polisacáridos. Estas técnicas y similares son bien conocidas en la técnica.

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

#### 20 4.5.2a IDENTIFICACIÓN SISTEMÁTICA PARA CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO (ADC)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

35 Por ejemplo, la inhibición de heregulina (HRG) que se une a líneas celulares de tumores de mama, que sobreexpresa HER2 y que se establece a partir de los mamíferos no humanos transgénicos (por ejemplo, ratones) en el presente documento, con el candidato de ADC se puede realizar usando cultivos en monocapa sobre hielo en un formato de placa de 24 pocillos. Se pueden añadir anticuerpos monoclonales Anti-ErbB2 a cada pocillo e incubar durante 30 minutos. A continuación se puede añadir rHRG $\beta$ 1<sub>177-224</sub> marcado con <sup>125</sup>I (25.000 cpm), y se puede continuar con la incubación durante 4 a 16 horas. Se pueden preparar las curvas de respuesta a la dosis y se puede calcular un valor de CI<sub>50</sub> (actividad citotóxica) para el compuesto interés.

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

45 En un ejemplo, se puede identificar sistemáticamente el ADC que inhibe la estimulación de HRG de la fosforilación de p180 tirosina en células MCF7 básicamente tal como se describe a continuación. Por ejemplo, una línea celular establecida a partir del animal transgénico para HER2 se puede sembrar en placas de 24 pocillos y compuestos se

- puede añadir a cada pocillo e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente; a continuación, se puede añadir rHRG $\beta_{1177-244}$  a cada pocillo hasta una concentración final de 0,2 nM, y se puede continuar con la incubación durante aproximadamente 8 minutos. Los medios se pueden aspirar de cada pocillo, y las relaciones se pueden detener mediante la adición de 100  $\mu$ l de tampón de muestra de SDS (SDS al 5 %, DTT 25 mM, y Tris-HCl 25 mM, pH 6.8).
- 5 Cada muestra (25  $\mu$ l) se puede someter a electroforesis en un gel con un gradiente de un 4-12 % de Novex) y a continuación transferir de forma electroforética a una membrana de difluoruro de polivinilideno. Se pueden desarrollar inmunotransferencias de antifosfotirosina (a 1  $\mu$ g/ml), y la intensidad de la banda reactiva predominante a la  $M_r$  -180.000 se puede cuantificar mediante densitometría de reflectancia. Un método alternativo para evaluar la inhibición de la fosforilación del receptor es el ensayo KIRA (activación del receptor de quinasas) de Sadick et al.
- 10 (1998) Jour. of Pharm. and Biomed. Anal. Algunos de los anticuerpos monoclonales bien establecidos frente a HER2 que se sabe que inhiben la estimulación de HRG de fosforilación de p180 tirosina se pueden usar como control positivo en este ensayo. Se puede preparar una curva de dosis-respuesta para la inhibición de la estimulación de HRG de fosforilación de p180 tirosina tal como se determina con densitometría de reflectancia y se puede calcular una  $IC_{50}$  para el compuesto interés.
- 15 Además, se puede evaluar los efectos inhibidores del crecimiento de un ADC de ensayo en líneas celulares obtenidas a partir de un animal transgénico para HER2, por ejemplo, básicamente tal como se describe en Schaefer et al. (1997) Oncogene 15: 1385-1394. De acuerdo con este ensayo, las células se pueden tratar con un compuesto de ensayo a diversas concentraciones durante 4 días y teñir con violeta de cristal o con el tinte redox Azul de Alamar. La incubación con el compuesto puede presentar un efecto inhibidor del crecimiento sobre esta línea celular similar al que se presenta con anticuerpo monoclonal 2C4 en células MDA-MB-175 (Schaefer et al., mencionado anteriormente). En una realización más, HRG exógeno no invertirá significativamente esta inhibición.
- 20 Para identificar los compuestos inhibidores de crecimiento que se dirigen específicamente a un antígeno de interés, se pueden identificar sistemáticamente compuestos que inhiben el crecimiento de células cancerosas que sobreexpresan antígenos de interés obtenidos a partir de animales transgénicos, y se puede realizar el ensayo que se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5677171. De acuerdo con este ensayo, células cancerosas que sobreexpresan el antígeno de interés se cultivan en una mezcla 1:1 de F12 y medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10 %, glutamina y penicilina estreptomicina. Las células se siembran a 20.000 células en un disco de cultivo celular de 35 mm (2 ml/35 mm de disco) y el compuesto de ensayo se añade a diversas concentraciones. Después de seis días, se hace recuento del número de células, en comparación con células sin tratar usando un contador celular electrónico COULTER™. Los compuestos que inhiben el crecimiento celular en aproximadamente un 20-100 % o aproximadamente un 50-100 % se pueden seleccionar como compuestos inhibidores del crecimiento.
- 25 Para seleccionar compuestos que inducen la muerte celular, la pérdida de la integridad de la membrana tal como se indica, *por ejemplo*, con PI, azul de tripano o absorción de 7AAD se puede evaluar con respecto al control. El ensayo de absorción de PI usa células aisladas a partir del tejido tumoral de interés de un animal transgénico. De acuerdo con este ensayo, las células se cultivan en Medio de Eagle Modificado con Dulbecco (D-MEM):F-12 de Ham (50:50) complementado con FBS inactivado con calor al 10 % (Hyclone) y L-glutamina 2 mM. Por lo tanto, el ensayo se realiza en ausencia de células de complemento y efectoras inmunes. Las células se siembran con una densidad de  $3 \times 10^6$  por disco en discos de 100 x 20 mm y se permite que se unan durante una noche. A continuación el medio se retira y se reemplaza con medio recién preparado solo o con medio que contiene diversas concentraciones del compuesto. Las células se incubaron durante un periodo de tiempo de 3 días. Después de cada tratamiento, las monocapas se lavan con PBS y se separan mediante tripsinización. Las células se centrifugan a continuación a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C, el sedimento se vuelve a suspender en 3 ml de tampón de unión de Ca<sup>2+</sup> frío (Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM) y se toman alícuotas en tubos de 12 x 75 mm cerrados con tamiz de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para retirada de grupos de células. Los tubos reciben a continuación PI (10  $\mu$ g/ml). Las muestras se pueden analizar usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y el software de CellQuest FACSCONVERT™ (Becton Dickinson). Los compuestos que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular tal como se determina mediante absorción de PI se pueden seleccionar como compuestos que inducen la muerte celular.
- 30 Para seleccionar compuestos que inducen la apoptosis, se realiza un ensayo de unión de anexina que usa células establecidas a partir del tejido tumoral de interés del animal transgénico. Las células se cultivan y se siembran en discos tal como se ha analizado en el párrafo precedente. El medio se retira a continuación y se reemplaza con medio recién preparado solo o medio que contiene 10  $\mu$ g/ml del conjugado de anticuerpo fármaco (ADC). Después de un periodo de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se separan mediante tripsinización. Las células se centrifugan a continuación, se vuelven a suspender en tampón de unión de Ca<sup>2+</sup> y se toman alícuotas en tubos tal como se ha analizado anteriormente para el ensayo de muerte celular. Los tubos reciben a continuación anexina (*por ejemplo*, anexina V-FITC) (1  $\mu$ g/ ml). Las muestras se pueden analizar usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y el software de CellQuest FACSCONVERT™ (Becton Dickinson). Los compuestos que inducen niveles estadísticamente significativos de unión a anexina con respecto al control se seleccionan como compuestos que inducen la apoptosis.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

4.5.3 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR *IN VITRO*

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

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

10 La potencia *in vitro* de conjugados de anticuerpo y fármaco se midió con un ensayo de proliferación celular (Ejemplo 18, Figuras 7-10). El Ensayo de Viabilidad Celular Luminescente CellTiter-Glo® es un método de ensayo homogéneo disponible en el mercado (Promega Corp., Madison, WI), basado en la expresión recombinante de luciferasa de Coleópteros (Patentes de Estados Unidos Nº 5583024; Nº 5674713 y Nº 5700670). Este ensayo de proliferación

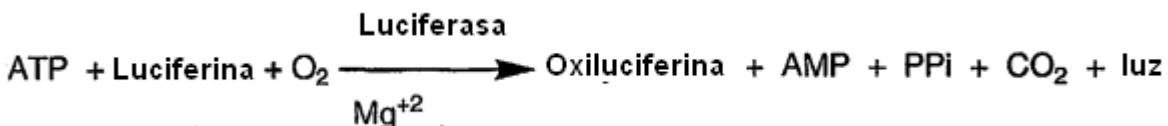
15 celular determina el número de células viables en cultivo sobre la base de la cuantificación del ATP presente, un indicador de células metabólicamente activas (Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160: 81-88, Patente de Estados Unidos Nº 6602677). El Ensayo CellTiter-Glo® se realizó en formato de 96 pocillos, lo que lo hace susceptible la identificación sistemática de alto rendimiento automatizada (HTS) (Cree et al. (1995) AntiCancer Drugs

20 6: 398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica la adición del reactivo individual (Reactivo CellTiter-Glo®) directamente a las células cultivadas en medio complementado con suero. No son necesarios lavado celular, retirada del medio y etapas múltiples de pipeteo. El sistema detecta una cantidad tan pequeña como 15 células/pocillo en un formato de 384 pocillos a los 10 minutos después de la dicción del reactivo y mezcla. Las células se pueden tratar continuamente con ADC, o se pueden tratar y separar de ADC. Generalmente, las células tratadas brevemente, es decir 3 horas, mostraron los mismos efectos de potencia que las células tratadas continuamente.

25 El formato homogéneo de "añadir-mezclar-medir" da como resultado lisis celular y generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. La cantidad de ATP es directamente proporcional al número de células presentes en el cultivo. El Ensayo CellTiter-Glo® genera una señal luminiscente "de tipo brillo", producida por la reacción de la luciferasa, que tiene una vida media generalmente mayor que cinco horas, dependiendo del tipo de célula y medio usados. Las células viables se reflejan en unidades de luminiscencia relativa

30 (RLU). El sustrato, Luciferina de Escarabajo, se descarboxilasa oxida activamente mediante luciferasa de luciérnaga recombinante con conversión simultánea de ATP en AMP y generación de fotones. La vida media extendida elimina la necesidad del uso de inyectores de reactivo y proporciona flexibilidad para procesamiento en modo continuo o discontinuo de múltiples placas. Este ensayo de proliferación celular se puede usar con diversos formatos de

35 múltiples pocillos, por ejemplo, formato de 96 o 384 pocillos. Los datos se pueden registrar con luminómetro o un dispositivo de formación de imágenes con cámara CCD. La producción de luminiscencia se presenta como unidades de luz relativa (RLU), medidas en el tiempo.



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

45 Conjugados de anticuerpo y fármaco: Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3.8 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3.9 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-MMAF, 4.1 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 4.1 MMAE/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 3.3 MMAE/Ab; y Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3.7 MMAF/Ab no inhibieron la proliferación de células MCF-7 (Figura 9).

50 Conjugados de anticuerpos y fármaco: Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 4.1 MMAE/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 3.3 MMAE/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3.7 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3.8 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3.9 MMAF/Ab; y Trastuzumab-MC-MMAF, 4.1 MMAF/Ab no inhibieron la proliferación de células MDA-MB-468 (Figura 10).

55 Las células MCF-7 y MDA-MB-468 no sobreexpresa en la proteína receptora HER2. Los conjugados de anticuerpo y fármaco anti-HER2 descritos en el presente documento muestran por lo tanto selectividad para la inhibición de células que expresan HER2.

Tabla 2a células SK-BR-3

Conjugado de Anticuerpo Fármaco H = trastuzumab unido a través de una cisteína [cys] excepto cuando se indica	Cl <sub>50</sub> (μg de ADC/ml)
H-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab	0,008
H-MC-MMAF, 4,8 MMAF/Ab	0,002
H-MC-vc-PAB-MMAE	0,007
H-MC-vc-PAB-MMAE	0,015
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab	0,0035 - 0,01
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4,4 MMAF/Ab	0,006 - 0,007
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4,8 MMAF/Ab	0,006
H-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3,9 MMAF/Ab	0,0035
H-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab	0,0035
H-MC-vc-PAB-MMAE, 4,1 MMAE/Ab	0,010
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab	0,007
H-MC-vc-PAB-MMAE 4,1 MMAE/Ab	0,015
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3,7 MMAF/Ab.	0,010
H-MC-vc-PAB-MMAE, 7,5 MMAE/Ab	0,0025
H-MC-MMAE, 8,8 MMAE/Ab	0,018
H-MC- MMAE, 4,6 MMAE/Ab	0,05
H-MC-(L)val-(L)cit-PAB-MMAE, 8,7 MMAE/Ab	0,0003
H-MC-(D)val-(D)cit-PAB-MMAE, 8,2 MMAE/Ab	0,02
H-MC-(D)val-(L)cit-PAB-MMAE, 8,4 MMAE/Ab	0,0015
H-MC-(D)val-(L)cit-PAB-MMAE, 3,2 MMAE/Ab	0,003
H-Trastuzumab	0,083
H-vc-MMAE, unido a través de una lisina [lys]	0,002
H-phe-lys-MMAE, unido a través de una lisina [lys]	0,0015
4D5-Fc8-MC-vc-PAB-MMAF, 4,4 MMAF/Ab	0,004
Hg-MC-vc-PAB-MMAF, 4,1 MMAF/Ab	0,01
7C2-MC-vc-PAB-MMAF, 4,0 MMAF/Ab	0,01
4D5 Fab-MC-vc-PAB-MMAF, 1,5 MMAF/Ab	0,02
Anti-TF Fab-MC-vc-PAB-MMAE*	-

Tabla 2b células BT474

Conjugado de Anticuerpo Fármaco H = trastuzumab unido a través de una cisteína [cys]	Cl <sub>50</sub> (μg de ADC/ml)
H-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab	0,008
H-MC-MMAF, 4,8 MMAF/Ab	0,002
H-MC-vc-PAB-MMAE, 4,1 MMAE/Ab	0,015
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab	0,02 - 0,05
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4,4 MMAF/Ab	0,01
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4,8 MMAF/Ab	0,01
H-MC-vc-PAB-MMAE 3,3 MMAE/Ab	0,02

H-MC-vc-PAB-MMAF, 3.7 MMAF/Ab,	0,02
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab	0,015
H-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3.9 MMAF/Ab	0,010
H-MC-MMAF, 4.1 MMAF/Ab	0,00015
H-MC-vc-PAB-MMAE, 7,5 MMAE/Ab	0,0025
H-MC-MMAE, 8.8 MMAE/Ab	0,04
H-MC- MMAE, 4.6 MMAE/Ab	0,07
4D5-Fc8-MC-vc-PAB-MMAF, 4.4 MMAF/Ab	0,008
Hg-MC-vc-PAB-MMAF, 4.1 MMAF/Ab	0,01
7C2-MC-vc-PAB-MMAF, 4.0 MMAF/Ab	0,015
4D5 Fab-MC-vc-PAB-MMAF, 1.5 MMAF/Ab	0,04
Anti-TF Fab-MC-vc-PAB-MMAE*	-
H = trastuzumab 7C2 = anticuerpo de murino anti-HER2 que se unen a un epítopo diferente que el trastuzumab. Fc8 = mutante que no se une a FcRn Hg = 4D5 humanizado de longitud total "sin bisagra", con cisteínas bisagra de cadena pesada mutadas a serinas. Expresado en <i>E. coli</i> (por lo tanto no glicosilado). Anti-TF Fab = fragmento de anticuerpo de factor anti-tejido * actividad frente a células MDA-MB-468	

En un descubrimiento sorprendente e inesperado, los resultados de la actividad de proliferación celular *in vitro* del ADC en las Tablas 2a y 2b muestran por lo general que ADC con un número medio bajo de restos de fármaco por anticuerpo mostró eficacia, *por ejemplo*,  $Cl_{50} < 0,1 \mu\text{g}$  de ADC/ml. Los resultados sugieren que al menos para ADC de trastuzumab, la relación óptima de restos de fármaco por anticuerpo puede ser menor que 8, y puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 5.

5

#### 4.5.4 ACLARAMIENTO Y ESTABILIDAD DE PLASMA *IN VIVO*

- 10 El aclaramiento y la estabilidad de plasma farmacocinético de ADC se investigaron en ratas y monos cynomolgus. La concentración de plasma se midió con el tiempo. La Tabla 2c muestra datos farmacocinéticos de conjugados de anticuerpo y fármaco y otras muestras dosificadas en ratas. Las ratas son un modelo no específico para anticuerpos receptores de ErbB, debido a que, no se sabe que la rata exprese proteínas receptoras de HER2.
- 15 Tabla 2c Farmacocinética en Ratas H = trastuzumab unido a través de una cisteína [cys] excepto cuando se indica 2 mg/kg de dosis excepto cuando se indica

Dosis de la muestra en mg/kg	AUCinf día* μg/ml	CL ml/día/kg	Cmáx μg/ml	T½ Term. días	% Conj.
H-MC-vc-PAB-MMAE (Ab Total)	78,6	26,3	39,5	5,80	40,6
H-MC-vc-PAB-MMAE (Conj.)	31,1	64,4	33,2	3,00	
H-MC-vc-PAB-MMAF (Total Ab)	170	12,0	47,9	8,4	50,0
H-MC-vc-PAB-MMAF (Conj.)	83,9	24,0	44,7	4,01	
H-MC-MMAE (Total Ab)	279	18,9	79,6	7,65	33
H-MC-MMAE (Conj.) 5 mg/kg	90,6	62,9	62,9	4,46	
H-MC-MMAF (Total Ab)	299	6,74	49,1	11,6	37
H-MC-MMAF (Conj.)	110	18,26	50,2	4,54	
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (Total Ab)	306	6,6	78,7	11,9	19,6
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (Conj.)	59,9	33,4	82,8	2,1	

H-Me-vc-PAB-MMAF (Total Ab)	186	10,8	46,9	8,3	45,3
H-Me-vc-PAB-MMAF (Conj.)	84,0	23,8	49,6	4,3	
H-Me-vc-PAB-MMAE (Total Ab)	135	15,0	44,9	11,2	23,8
H-Me-vc-PAB-MMAE (Conj.)	31,9	63,8	45,2	3,0	
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (Total Ab)	306	6,6	78,7	11,9	19,6
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (Conj.)	59,9	33,4	82,8	2,1	
H-MC-(D)val-(L)cit-PAB- MMAE (Total Ab)	107	19,2	30,6	9,6	38,1
H-MC-(D)val-(L)cit-PAB- MMAE (Conj.)	40	50,4	33,7	3,98	
H-MC-(Me)-vc-PAB- MMAE, Total Ab	135,1	15,0	44,9	11,2	23,8
H-MC-(Me)-vc-PAB- MMAE, Conj.	31,9	63,8	45,2	2,96	
H-MC-(D)val-(D)cit-PAB- MMAE, Total Ab	88,2	22,8	33,8	10,5	38,3
H-MC-(D)val-(D)cit-PAB- MMAE, Conj.	33,6	59,8	36,0	4,43	
H-MC-vc-PAB-MMAE, Total Ab	78,6	26,3	39,5	5,8	40,6
H-MC-vc-PAB-MMAE, Conj. H unido a MC mediante lisina [lys]	31,1	64,4	33,2	3,00	
MMAF 200 µg/kg	0,99	204	280	0,224	-
MMAE 206 µg/kg	3,71	62,6	649	0,743	-
HER F(ab') <sub>2</sub> -MC-vc-MMAE, Total Ab	9,3	217	34,4	0,35	95
HER F(ab') <sub>2</sub> -MC-vc-MMAE, Conj.	8,8	227	36,9	0,29	
4D5-H-Fab-MC-vc-MMAF, Total Ab	43,8	46,2	38,5	1,49	68
4D5-H-Fab-MC-vc-MMAF, Conj.,	29,9	68,1	34,1	1,12	
4D5-H-Fab-MC-vc- MMAE,	71,5	70,3	108	1,18	59
Total Ab 4D5-H-Fab-MC-vc- MMAE, Conj.	42,2	118,9	114	0,74	
4D5-H-Fab	93,4	53,9	133	1,08	-
H-MC-vc-PAB-MMAF, Total Ab	170	12,03	47,9	8,44	49,5
H-MC-vc-PAB-MMAF, Conj.	83,9	23,96	44,7	4,01	
H-MC-vc-PAB-MMAF-DMAEA, Total Ab	211	9,8	39,8	8,53	34,3
H-MC-vc-PAB-MMAF-DMAEA, Conj.	71,5	28,2	38,8	3,64	
H-MC-vc-PAB-MMAF-TEG, Total Ab	209	9,75	53,2	8,32	29,7
H-MC-vc-PAB-MMAF-TEG, Conj.	63,4	31,8	34,9	4,36	

El AUC inf es el área bajo la curva de concentración de plasma-tiempo desde el momento de la dosificación hasta el infinito y es una medida de la exposición total a la entidad medida (fármaco, ADC). CL se define como el volumen de plasma aclaramado de la entidad medida en unidades de tiempo y se expresa mediante normalización a peso corporal.

El término T<sub>1/2</sub> es la mitad del fármaco en el organismo medido durante su fase de eliminación. La expresión % Conj. es la cantidad relativa de ADC en comparación con el anticuerpo total detectado, mediante ensayos separados de inmunoafinidad de ELISA ("Analytical Methods for Biotechnology Products", Ferraiolo et al, páginas 85-98 en Pharmacokinetics of Drugs (1994) P.G. Welling y L.P. Balant, Eds., Handbook of Experimental Pharmacology, Vol.

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

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

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

#### EFICACIA IN VIVO

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

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

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

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

Una sola dosis el día 1 (T = 0) excepto cuando se indica H = trastuzumab unido a través de una cisteína [cys] excepto cuando se indica						
Fármacos de Muestra por anticuerpo	Dosis	Ti	PR	CR	Tiempo de duplicación tumoral (días)	log medio de muerte celular
Vehículo					2-5	0
H-MC-vc-PAB-MMAE 8.7 MMAE/Ab	1250 µg/m <sup>2</sup>	5/5	4/7	0/7	18	1,5
H-MC-vc-PAB-MMAF 3.8 MMAF/Ab	555 µg/m <sup>2</sup>	2/5	2/7	5/7	69	6,6
H-MC(Me)-vc-PAB-MMAF					> 50	6,4
H-MC-MMAF 4.8 MMAF/Ab	9.2 mg/kg Ab 550 µg/m <sup>2</sup> a 0, 7, 14 y 21 días	7/7	6/7	0/7	63	9
H-MC-MMAF 4.8 MMAF/Ab	14 mg/kg Ab 840 µg/m <sup>2</sup> a 0, 7, 14 y 21 días	5/5	5/7	2/7	> 63	
H-MC-vc-PAB-MMAF 5.9 MMAF/Ab	3,5 mg/kg Ab 300 µg/m <sup>2</sup> a 0, 21, y 42 días	5/6	1/7	3/7	> 36	

ES 2 605 443 T3

H-MC-vc-PAB-MMAF 5.9 MMAF/Ab	4,9 mg/kg Ab 425 µg/m <sup>2</sup> a 0, 21, y 42 días	4/7	2/7	5/7	> 90	
H-MC-vc-PAB-MMAF 5.9 MMAF/Ab	6,4 mg/kg Ab 550 µg/m <sup>2</sup> a 0, 21, y 42 días	3/6	1/7	6/7	> 90	
H-(L)val-(L)cit-MMAE 8.7 MMAE/Ab	10 mg/kg	7/7	1/7	0/7	15,2	1,1
H-MC-MMAE 4.6 MMAE/Ab	10 mg/kg	7/7	0/7	0/7	4	0,1
H-(D)val-(D)cit-MMAE 4.2 MMAE/Ab	10 mg/kg	7/7	0/7	0/7	3	
H-(D)val-(L)cit-MMAE 3.2 MMAE/Ab	13 mg/kg	7/7	0/7	0/7	9	0,6
H-MC(Me)-vc-MMAE 3.0 MMAE/Ab	13 mg/kg	7/7	3/7	0/7	17	1,2
H-(L)val-(D)cit-MMAE 3.5 MMAE/Ab	12 mg/kg	7/7	0/7	0/7	5	0,2
H-vc-MMAE 8.7 MMAE/Ab	10 mg/kg	7/7			17	
H-cys-vc-MMAF 3.8 MMAF/Ab	1 mg/kg	7/7			3	
H-cys-vc-MMAF 3.8 MMAF/Ab	3 mg/kg	7/7			> 17	
H-cys-vc-MMAF 3.8 MMAF/Ab	10 mg/kg	4/7	4/7	3/7	> 17	
H-MC-vc-MMAF-TEG 4 MMAF/Ab	10 mg/kg	3/6	1/7	6/7	81	7,8
H-MC-vc-MMAF-TEG 4 MMAF/Ab	10 mg/kg q3wk x 3	0/5	0/7	7/7	81	7,9
H-vc-MMAF (lote 1)	10 mg/kg	4/6	2/8	5/8		
H-vc-MMAF (lote 2)	10 mg/kg	7/8	1/8	1/8		
H-MC-MMAF	10 mg/kg 550 µg/m <sup>2</sup>	8/8	1/8	0/8	18	
H-(Me)-vc-MMAF	10 mg/kg	3/7	2/8	5/8		
H-vc-MMAE 7.5 MMAE/Ab	3,7 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	6/6	0/7	1/7	17	2,3
H-vc-MMAE 7.5 MMAE/Ab	7.5 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	5/7	3/7	3/7	69	10

ES 2 605 443 T3

anti IL8-vc-MMAE 7.5 MMAE/Ab	7.5 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	7/7	0/7	0/7	5	0,5
anti IL8-vc-MMAE 7.5 MMAE/Ab	3.7 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	6/6	0/7	0/7	3	0,2
H-fk-MMA 7.5 MMAE/Ab	7.5 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	7/7	1/7	0/7	31	4,4
H-fk-MMAE 7.5 MMAE/Ab	3.7 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	7/7	0/7	0/7	8,3	0,9
anti IL8-fk-MMAE 7.5 MMAE/Ab	7.5 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	7/7	0/7	0/7	6	0,5
anti IL8-fk-MMAE 7.5 MMAE/Ab	3.7 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	7/7	0/7	0/7	3	0,1
Trastuzumab	7,5 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	7/7	0/7	0/7	5	0,4
H-vc-MMAE 8.7 MMAE/Ab	10 mg/kg 1250 mg/m <sup>2</sup>	6/6	3/6	0/6	15	1,3
H-vc-MMAE	10 mg/kg 1250 µg/m <sup>2</sup> a 0, 7, y 14 días	7/7	5/7		> 19	
H-vc-MMAE	3 mg/kg a 0, 7, y 14 días	7/7			8	
H-vc-MMAE	1 mg/kg a 0, 7, y 14 días	7/7			7	
H-vc-MMAF	10 mg/kg	8/8	5/8		> 21	
H-vc-MMAF	10 mg/kg a 0, 7, y 14 días	4/7	4/7	3/7	> 21	
H-vc-MMAF	3 mg/kg a 0, 7, y 14 días	7/7			6	
H-vc-MMAF	1 mg/kg a 0, 7, y 14 días	8/8			4	
Trastuzumab	10 mg/kg a 0 y 7 días	8/8			3	
Hg-MC-vc-PAB-MMAF 4.1 MMAF/Ab	10 mg/kg a 0 días	6/7	3/8	5/8	56	5,1
Fc8-MC-vc-PAB-MMAF 4.4 MMAF/Ab	10 mg/kg a 0 días	7/7	6/8	0/8	25	2,1
7C2-MC-vc-PAB-MMAF	10 mg/kg a 0 días	5/6	6/8	1/8	41	3,7
4 MMAF/Ab						
H-MC-vc-PAB-MMAF 5.9 MMAF/Ab	10 mg/kg a 0 días	3/8	3/8	5/8	62	5,7

2H9-MC-vc-PAB-MMAE		9/9			> 14 días	
2H9-MC-vc-PAB-MMAF		9/9			> 14 días	
11D10-vc-PAB-MMAE		9/9			> 14 días	
11D10-vc-PAB-MMAF		9/9			11 días	

7C2 = anticuerpo de murino anti-HER2 que se une a un epítopo diferente a trastuzumab.  
Fc8 = mutante que no se une a la FcRn  
Hg = 4D5 humanizado de longitud total "sin bisagra", con cisteínas bisagra de cadena pesada mutadas a serinas. Expresado en *E. coli* (por lo tanto no glicosilado).  
2H9 = Anti-EphB2R  
11D10 = Anti-0772P

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

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

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

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

#### 4.5.5 TOXICIDAD EN ROEDORES

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

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

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

Las enzimas indicativas de lesión hepática que se estudiaron incluyen:

AST (aspartato aminotransferasa)

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

ALT (alanina aminotransferasa)

- Localización: citoplasmática; hígado, riñón, corazón, músculo esquelético
- Relación Hígado:Plasma de 3000:1

- T1/2: 42 horas; variación diurna
- GGT (g-glutamil transferasa)

- Localización: membrana plasmática de células con alta capacidad secretora o de absorción; hígado, riñón, intestino
- Mal indicador de lesión hepática; normalmente elevada en trastornos de conductos biliares.

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

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

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

Ratas Sprague Dawley Hembra también se dosificaron con niveles elevados (Ejemplo 19, estudio de Dosis Elevada: Grupos 2, 3, 4) con trastuzumab-MC-MMAF, y control de Vehículo (Grupo 1). Se observaron ligeras señales de toxicidad, incluyendo elevación de enzimas hepáticas dependientes de la dosis ALT, AST y GGT. El Día 5, animales en el grupo de dosis más elevadas mostraron un aumento de 2 veces de ALT y un aumento de 5 veces de AST; 5 GGT también está elevada (6 U/l). los niveles enzimáticos muestran una tendencia hacia la normalización el Día 12. hubo una granulocitosis moderada en todos los tres grupos de dosis el Día 5, el recuento de plaquetas permanece básicamente sin cambios en todos los animales. Los cambios morfológicos fueron los suaves; animales tratados con 10 un nivel de dosis de 4210 µg/m<sup>2</sup> (Grupo 2) mostró histología sin complicaciones de hígado, bazo, timo, intestinos y médula ósea. Se observó un leve aumento de la actividad apoptótica y mitótica en timo e hígado, respectivamente 15 en animales tratados con el nivel de dosis de 5500 µg/m<sup>2</sup> (Grupo 3). La medular ósea era normocelular, pero mostró evidencias de hiperplasia granulocítica, que es coherente con la granulocitosis absoluta observada en los recuentos de sangre periférica en estos animales. Los animales con la dosis más elevada en el grupo 4 mostraron cualitativamente las mismas características; la actividad mitótica en el hígado parece en cierto modo mayor en comparación con animales en el Grupo 3. Además, se observó hematopoyesis extramedular en bazo e hígado.

EphB2R es un receptor de tirosina quinasa TM de tipo 1 con una homología próxima entre ratón y ser humano, y se sobreexpresa en células de cáncer colorrectal. 2H9 es un anticuerpo frente a EphB2R. El anticuerpo desnudo no tiene efecto en el crecimiento tumoral, pero 2H9-val-cit-MMAE eliminó células que expresan EphB2R demostró 20 eficacia en un modelo de xenoinjerto de ratón que usa tumores de colon humano CXF1103 (Mao et al. (2004) Cancer Res. 64: 781-788). Tanto 2H9 como 7C2 son anticuerpos anti-HER2 de IgG1 de ratón. Se compararon los perfiles de toxicidad de 2H9-MC-val-cit-PAB-MMAF (3.7 MMAF/Ab), 7C2-MC-val-cit-PAB-MMAF (4 MMAF/Ab), que trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF (5.9 MMAF/Ab). Las diferencias en la estructura de cada inmunoconjungado o 25 porción de fármaco del inmunoconjungado pueden afectar a la farmacocinética y por último al perfil de seguridad. El anticuerpo de trastuzumab humanizado no se une de forma apreciable al tejido de rata, y cualquier toxicidad se consideraría no específica.

#### TOXICIDAD/SEGURIDAD EN MONO CYNOMOLGUS

Del mismo modo que el estudio de toxicidad la seguridad en ratas, monos cynomolgus se trajeron con ADC seguido 30 de medidas de enzimas hepáticas, e inspección y análisis de los efectos sobre diversos órganos. Las observaciones macroscópicas incluyeron cambios en los pesos corporales y signos de lesiones y sangrado. Se realizaron parámetros de patología clínica (química y hematología en suero), histopatología, y necropsia en animales dosificados (Ejemplo 19).

El conjugado de anticuerpo y fármaco, H-MC-vc-PAB-MMAE (H = trastuzumab unido a través de cisteína) no mostró 35 evidencia de toxicidad hepática a ninguno de los niveles de dosis sometidos a ensayo. Los granulocitos de sangre periférica mostraron reducción después de una sola dosis de 1100 mg/m<sup>2</sup> con recuperación completa 14 días después de la dosis. El conjugado de anticuerpo y fármaco H-MC-vc-PAB-MMAF mostró aumento de enzimas hepáticas a 550 (transitorio) y 880 mg/m<sup>2</sup> de nivel de dosis, ninguna evidencia de granulocitopenia, y una 40 disminución de plaquetas dependiente de la dosis, transitoria (grupos 2 y 3).

#### 4.6 SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS DESCritos EN EL PRESENTE DOCUMENTO

Los Compuestos a modo de Ejemplo y los Conjugados a modo de Ejemplo se pueden preparar usando los 45 procedimientos sintéticos que se describen a continuación en los Esquemas 5-16. Tal como se describe con más detalle a continuación, los Compuestos a modo de Ejemplo o los Conjugados a modo de Ejemplo se pueden preparar convenientemente usando un Conector que tiene un sitio reactivo para la unión al Fármaco y Ligando. En un ejemplo, un Conector tiene un sitio reactivo que tiene un grupo electrófilo que es reactivo a un grupo no nucleófilo presente en un Ligando, tal como, pero no limitado a un anticuerpo. Grupos nucleófilos útiles en un 50 anticuerpo incluyen pero no se limitan a, grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleófilo de un anticuerpo es reactivo a un grupo electrófilo de un Conector y forma un enlace covalente con una unidad Conectora. Grupos electrófilos útiles incluyen, pero no se limitan a, grupos maleimida y haloacetamida. El grupo electrófilo proporciona un sitio conveniente para unión a anticuerpos.

En otro ejemplo, un Conector tiene un sitio reactivo que tiene un grupo nucleófilo que es reactivo a un grupo electrófilo 55 presente en un anticuerpo. Grupos electrófilos útiles en un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, grupos carbonilo de aldehído y cetona. El heteroátomo de un grupo nucleófilo de un Conector puede reaccionar con un grupo electrófilo en un anticuerpo y formar un enlace, lente con una unidad de anticuerpo. Grupos nucleófilos útiles en un Conector incluyen, pero no se limitan a, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina 60 carboxilato, y arilhidrazida. El grupo electrófilo en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para unión a un Conector.

Además, grupos funcionales de ácido carboxílico y grupos funcionales de cloroformiato son sitios reactivos útiles 65 para un Conector porque pueden reaccionar con grupos amino secundario de un Fármaco para formar una unión amida. además es útil como un sitio reactivo un grupo funcional carbonato en un Conector, tal como pero no limitado a p-nitrofenil carbonato, que puede reaccionar con un grupo amino de un Fármaco, tal como pero no limitado a N-

metil valina, para formar una unión carbamato. Por lo general, los Fármacos basados en péptidos se preparan mediante la formación de un enlace peptídico entre dos o más fragmentos de aminoácido y/o péptido. Dichos enlaces peptídico se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, páginas 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos.

La síntesis de un Bastidor ilustrativo que tiene un grupo electrófilo de maleimida se ilustra continuación en los Esquemas 8-9. En el Esquema 10 se describen métodos de síntesis generales útiles para la síntesis de un Conector. El Esquema 11 muestra la construcción de una unidad Conectora que tiene un grupo val-cit, un grupo electrófilo de maleimida y un grupo Espaciador autoinmolativo PAB. El Esquema 12 representa la síntesis de un Conector que tiene un grupo phe-lys, un grupo electrófilo de maleimida, con y sin el grupo Espaciador autoinmolativo PAB. El Esquema 13 presenta una descripción general para la síntesis de un Compuesto de Fármaco-Conector, mientras que el Esquema 14 presenta una ruta alternativa para preparar un Compuesto de Fármaco-Conector. El Esquema 15 representa la síntesis de un conector ramificado que contiene un grupo BHMS. El Esquema 16 describe la unión de un anticuerpo a un Compuesto de Fármaco-Conector para formar un Conjugado de Fármaco-Conector-Anticuerpo, y el Esquema 14 ilustra la síntesis de Conjugados de Fármaco-Conector-Anticuerpo que tienen, por ejemplo pero no se limitan a, 2 o 4 fármacos por Anticuerpo.

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

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

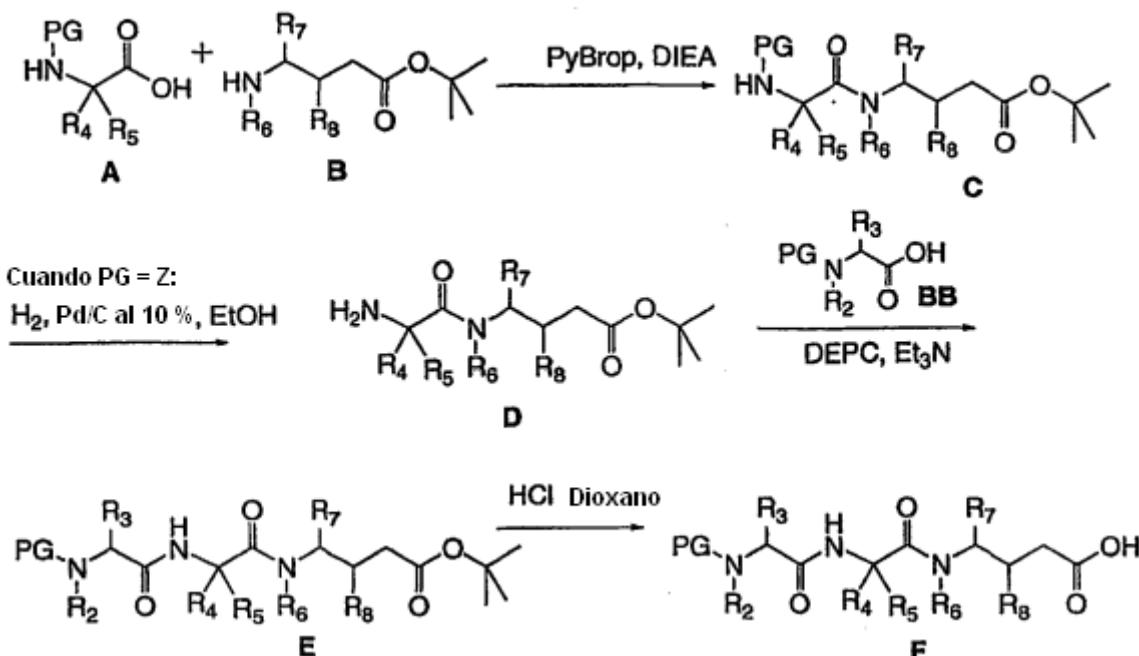
#### 4.6.1 SÍNTESIS DE RESTOS DE FÁRMACO

Por lo general, los Fármacos basados en péptido se pueden preparar formando un enlace peptídico entre dos o más fragmentos de aminoácido y/o péptido. Dichos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, páginas 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos.

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

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

El Esquema 5 ilustra la síntesis de una unidad F de tripéptido N-terminal que es un compuesto intermedio útil para la síntesis de los compuestos de fármaco de Fórmula I<sub>b</sub>.

Esquema 5

Tal como se ilustra en el Esquema 5, un aminoácido protegido A (en el que PG representa un grupo de protección de amina,  $R^4$  se selecciona entre hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, alquil-arilo, alquil-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, alquil-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>) en el que  $R^5$  se selecciona entre H y metilo; o  $R^4$  y  $R^5$  se unen, tiene la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub> en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6, y forman un anillo con el átomo de carbono al que están unidos), se acopla con el éster *t*-butílico B (en el que R<sup>6</sup> se selecciona entre -H y -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; y R<sup>7</sup> se selecciona entre hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, alquil-arilo, alquil-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)) en condiciones adecuadas de acoplamiento, por ejemplo, en presencia de PyBrop y diisopropiletilamina, o usando DCC (véase, por ejemplo, Miyazaki, K. et. al. Chem. Pharm. Bull. 1995, 43 (10), 1706-1718).

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

El dipéptido C se puede purificar, por ejemplo, usando cromatografía, y posteriormente desproteger, por ejemplo, usando  $\text{H}_2$  y Pd al 10 %-C en etanol cuando PG es bencilogcarbonilo, o usando dietilamina para la retirada de un grupo protector Fmoc. La amina D resultante forma rápidamente un enlace peptídico con un aminoácido BB (en el que R<sup>1</sup> se selecciona entre -H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>; y R<sup>2</sup> se selecciona entre -H y -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se unen, tiene la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub> en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre -H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6, y forman un anillo con el átomo de nitrógeno al que están unidos; y R<sup>3</sup> se selecciona entre hidrógeno, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, alquil-arilo, alquil-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)). N,N-Dialquil aminoácidos son aminoácidos a modo de ejemplo para BB, tal como las N,N-dimetil valina disponible en el mercado. Se pueden preparar otros N,N-dialquil aminoácidos por bis -alquilación reductora usando procedimientos conocidos (véase, por ejemplo, Bowman, R.E, Stroud, H.H J. Chem. Soc., 1950, 1342-1340). Fmoc-Me-L-Val y Fmoc-Me-L-glicina son dos aminoácidos BB a modo de ejemplo útiles para la síntesis de derivados de N-monoalquilo. La amina D y el aminoácido BB reaccionan para proporcionar el tripeptido E usando reactivo de acoplamiento DEPC con trietilamina como la base. El grupo protector de E con el extremo C se desprotege posteriormente usando HCl para proporcionar el compuesto tripeptídico de fórmula F.

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

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

**Procedimiento General A: Síntesis de péptidos usando DEPC.** El aminoácido o péptido N-protégido o N,N-disustituido D (1,0 equiv.) y una amina BB (1,1 equiv.) se diluyen con un disolvente orgánico aprótico, tal como

- 5 diclorometano (de 0,1 a 0,5 M). Una base orgánica tal como trietilamina o diisopropiletilamina (1,5 equiv.) se añade a continuación, seguido de DEPC (1,1 equiv.). La solución resultante se agita, preferentemente en atmósfera de argón, durante hasta 12 horas a la vez que se va controlando por HPLC o TLC. El disolvente se retira al vacío a temperatura ambiente, y el producto en bruto se purifica usando, por ejemplo, HPLC o cromatografía en columna ultrarrápida (columna en gel de sílice). Las fracciones relevantes se combinan y se concentran al vacío para proporcionar el tripéptido E que se seca al vacío durante una noche.

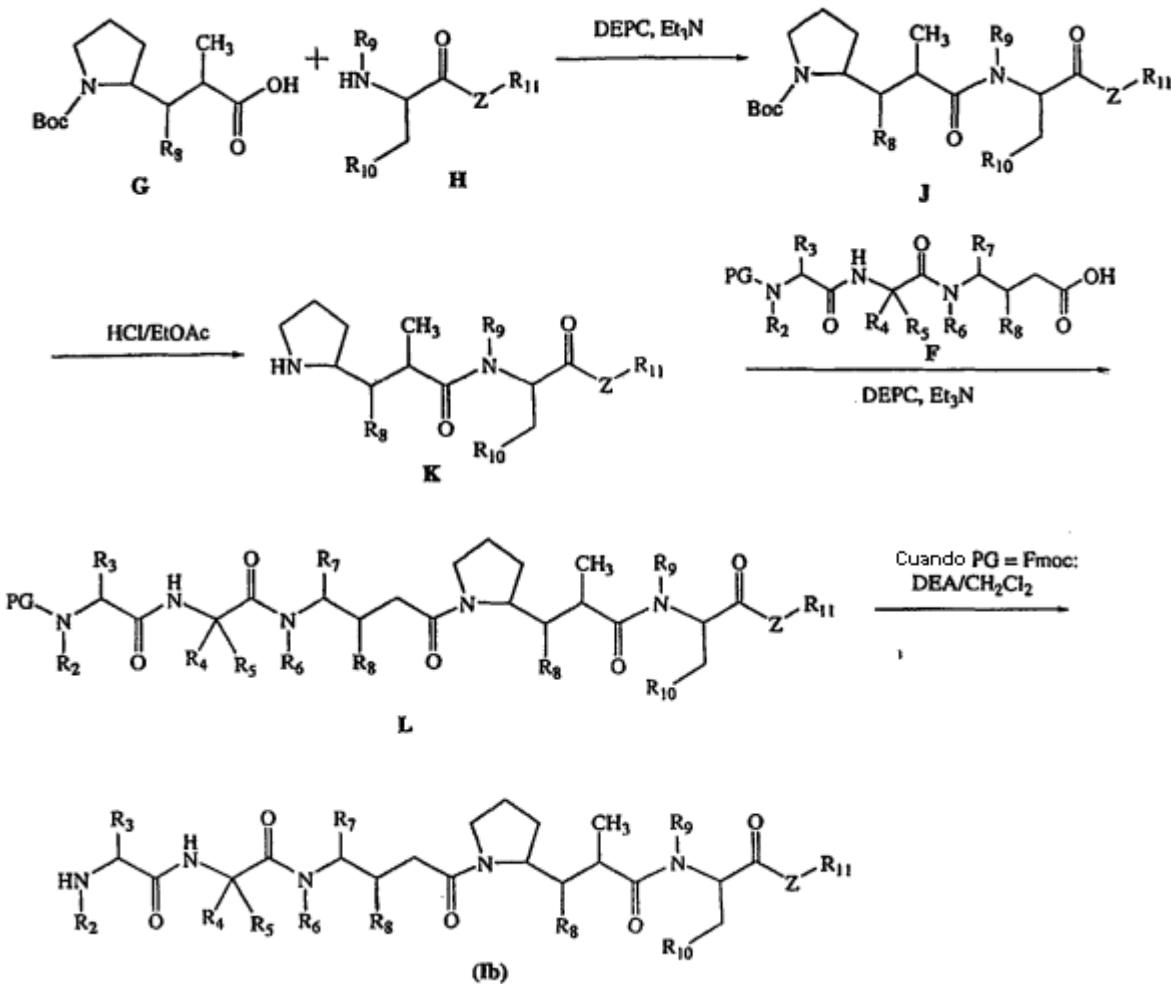
**Procedimiento general B: Síntesis de péptidos usando PyBrop.** El aminoácido B (1,0 equiv.), opcionalmente que tiene un grupo protector carboxilo, se diluye con un disolvente orgánico aprótico tal como diclorometano o DME para proporcionar una solución de una concentración entre 0,5 y 1,0 mM, a continuación se añade diisopropiletilamina (1,5 equiv.).

- 10 El aminoácido Fmoc-, o Z-protégido A (1,1 equiv.) se añade en forma de un sólido en una porción, a continuación se añade PyBrop (1,2 equiv.) a la mezcla resultante. La reacción se controla por TLC o HPLC, seguido de un procedimiento de tratamiento similar al que se ha descrito en el Procedimiento General A.

**Procedimiento general C: Retirada de Z a través de hidrogenación catalítica.** El aminoácido o péptido C Z-protégido se diluye con etanol para proporcionar una solución de una concentración entre 0,5 y 1,0 mM en un recipiente adecuado, tal como un matraz de fondo redondo de paredes gruesas. Se añade paladio al 10 % sobre carbono (5-10 % en p/p) y la mezcla de reacción se coloca en una atmósfera de hidrógeno. La evolución de la reacción se controla usando HPLC y generalmente está completa en 1-2 h. La mezcla de reacción se filtra a través

- 20 de un lecho de celite lavado previamente y el celite se lava de nuevo con un disolvente orgánico polar, tal como metanol después de filtración. La solución de eluyente se concentra al vacío para proporcionar un resto que se diluye con un disolvente orgánico, preferentemente tolueno. El disolvente orgánico se retira a continuación al vacío para proporcionar la amina C desprotegida.

- 25 30 El Esquema 6 muestra un método útil para preparar un dipéptido C-terminal de fórmula K y un método para acoplamiento del dipéptido de fórmula K con el tripéptido de fórmula F para preparar compuestos de fármaco de Fórmula Ib.

Esquema 6

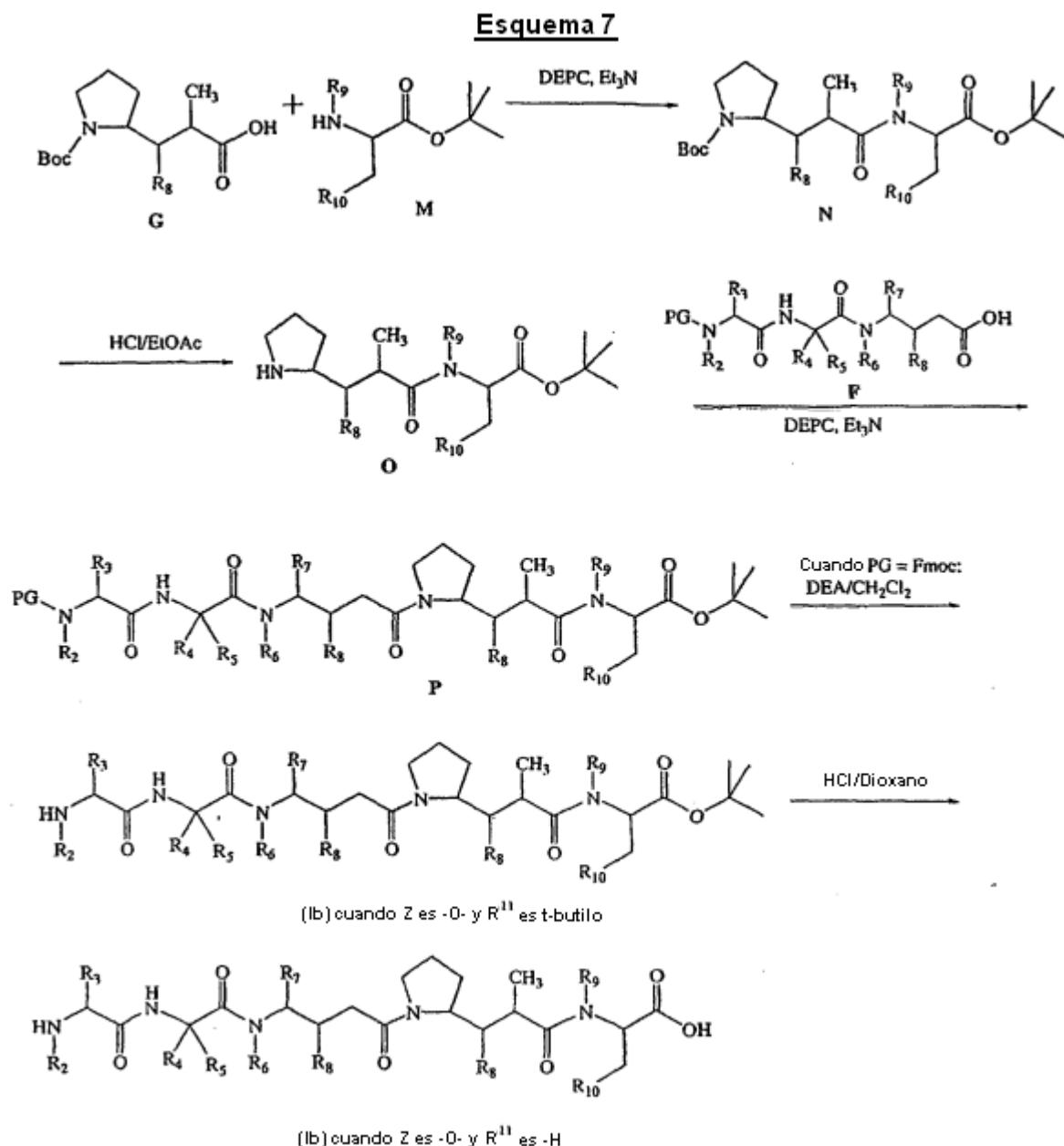
El dipéptido **K** se puede preparar fácilmente por condensación del aminoácido modificado Boc-Dolaproína **G** (véase, por ejemplo, Pettit, G.R., et al. *Synthesis*, 1996, 719-725), con una amina de fórmula **H** usando agentes de condensación bien conocidos en la química de péptidos, tales como, por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

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

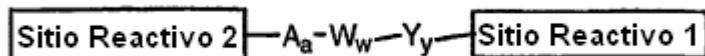
**Procedimiento general D: Síntesis de Fármacos.** Una mezcla de dipéptido **K** (1,0 equiv.) y tripéptido **F** (1 equiv.) se diluye con un disolvente orgánico aprótico, tal como diclorometano, para formar una solución 0,1 M, a continuación se añade un ácido fuerte, tal como ácido trifluoroacético (1/2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

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

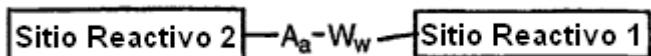
El Esquema 7 nuestro método útil para preparar derivados de MMAF de fórmula (lb).



- 5 El dipéptido **O** se puede preparar fácilmente por condensación del aminoácido modificado Boc-Dolaproína **G** (véase, por ejemplo, Pettit, G.R., et al. *Synthesis*, 1996, 719-725), con un aminoácido protegido de fórmula **M** usando agentes de condensación bien conocidos en la química de péptidos, tales como, por ejemplo, DEPC en presencia de trietilamina, tal como se muestra en los Esquemas 5 y 6.
  - 10 El dipéptido de fórmula **O** se puede acoplar a continuación con un tripéptido de fórmula **F** usando el Procedimiento General D para preparar los compuestos de MMAF protegidos con Fmoc de fórmula **P** que se pueden desproteger posteriormente usando el Procedimiento General E para proporcionar los compuestos de fármaco de MMAF de fórmula (lb).
  - 15 Por lo tanto, los métodos anteriores son útiles para preparar Fármacos tal como se describen en el presente documento.
- 4.6.2 SÍNTESIS DE CONECTOR DE FÁRMACO**
- 20 Para preparar un Compuesto de Fármaco-Conector de la presente invención, el Fármaco se hace reaccionar con un sitio reactivo en el Conector. En general, el Conector puede tener la estructura:

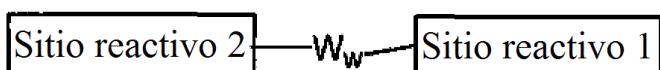


- 5 cuando están presentes tanto una unidad Espaciadora (-Y-) como una unidad Bastidor (-A-). Como alternativa, el Conector puede tener la estructura:



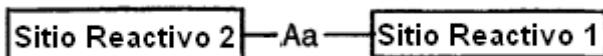
- 10 cuando está ausente la unidad Espaciadora (-Y-).

El Conector también puede tener la estructura:



- 15 cuando están ausentes tanto la unidad Bastidor (-A-) y la unidad Espaciadora (-Y-)

El Conector también puede tener la estructura:

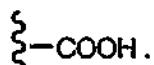


- 20 cuando están ausentes tanto la unidad Aminoácido (W) como la Unidad Espaciadora (Y).

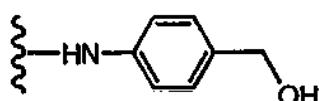
En general, un Conector adecuado tiene una unidad Aminoácido unida a una Unidad Bastidor opcional y a una Unidad Espaciadora opcional. El Sitio Reactivo 1 está presente en el extremo de la unidad Espaciadora y el sitio Reactivo 2 está presente en el extremo del Bastidor. Si no está presente una unidad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

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

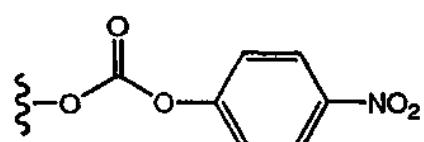
30 En un ejemplo, el Sitio Reactivo N° 1 es



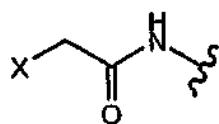
- 35 En otro ejemplo, el Sitio Reactivo N° 1 es



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

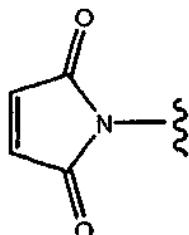


- 45 En un ejemplo, el Sitio Reactivo N° 2 es un grupo aceptor de tiol. Grupos aceptores de tiol adecuados incluyen grupos haloacetamida que tienen la fórmula



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

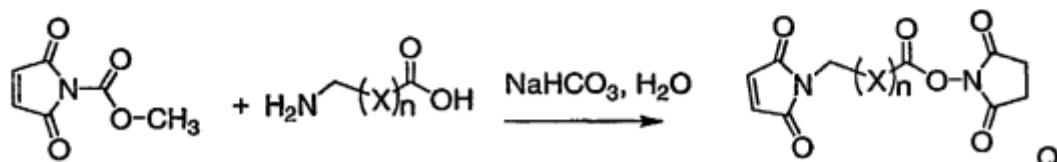
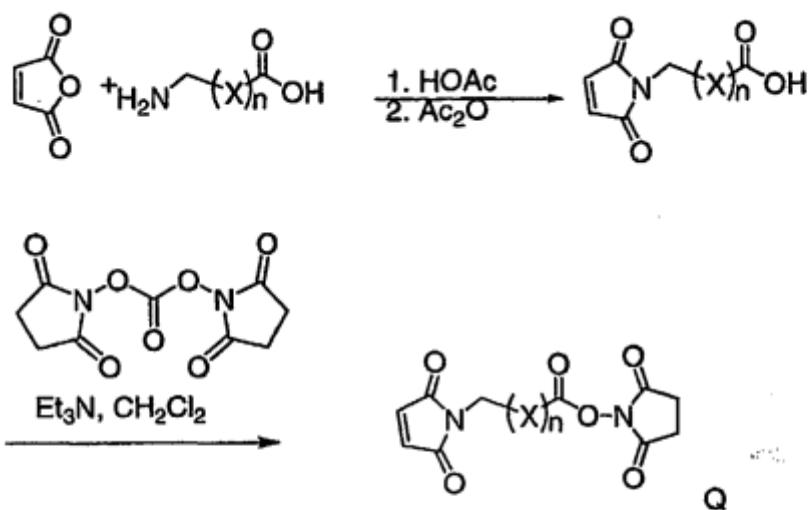
5



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

10

## Esquema 8

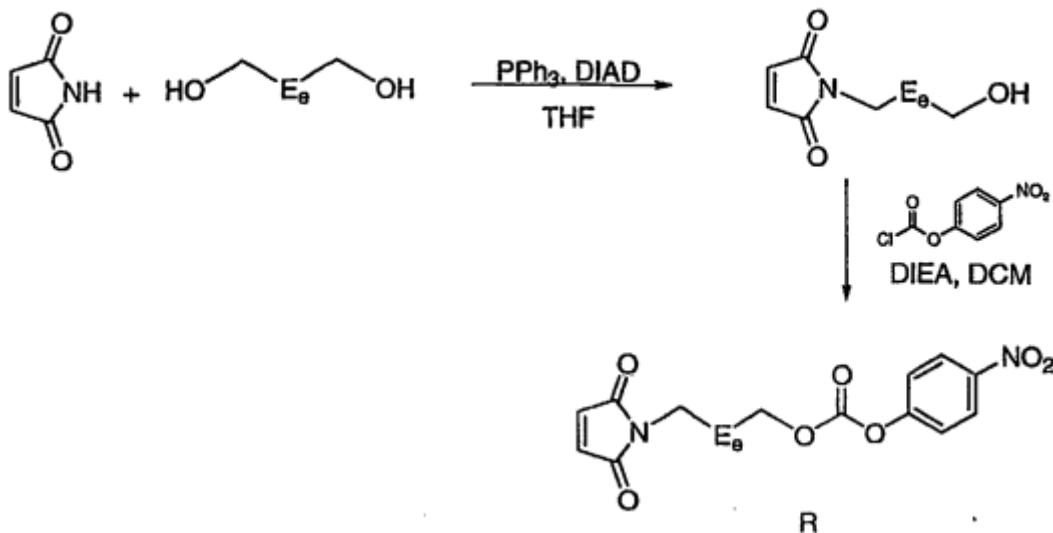


en el que X es  $-\text{CH}_2-$  o  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ ; y n es un número entero que varía de 0-10 cuando X es  $-\text{CH}_2-$  ; o 1-10 cuando X es  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ .

15

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

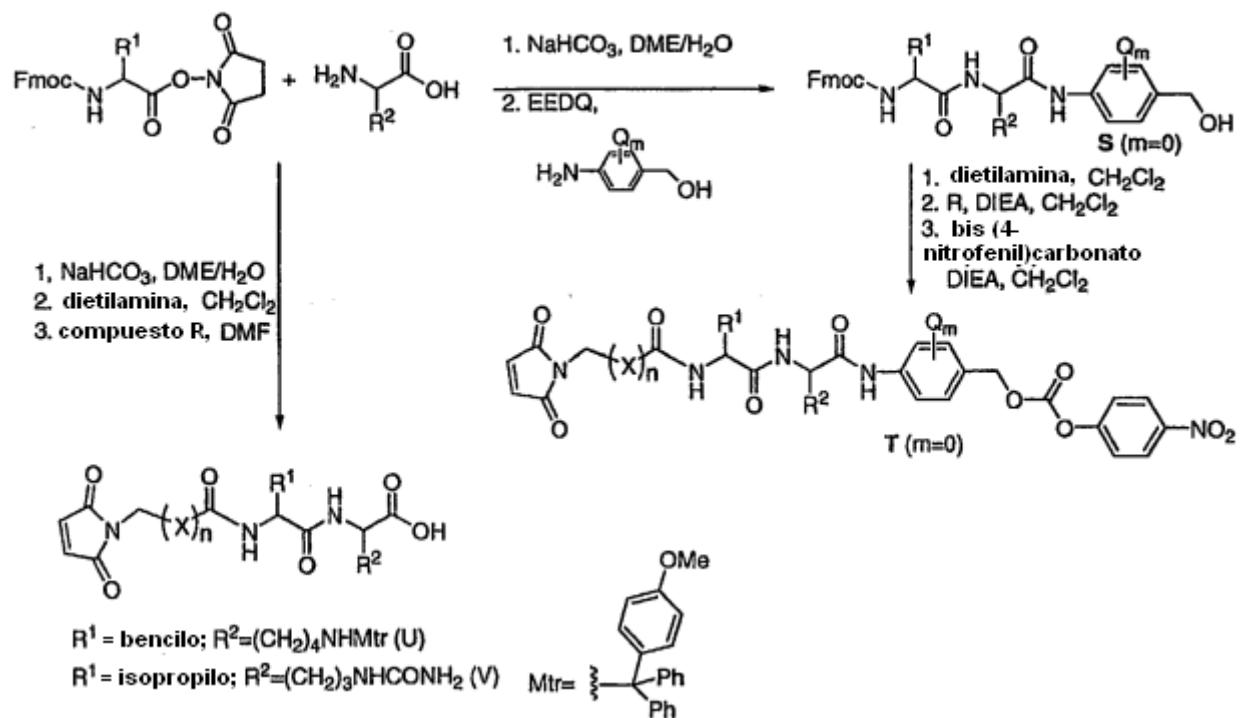
### Esquema 9



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

- 5 Como alternativa, los bastidores de PEG-maleimida y PEG-haloacetamida se pueden preparar tal como se describe en Frisch, et al., Bioconjugate Chem. 1996, 7, 180-186.  
 El Esquema 10 ilustra una síntesis general de una unidad Conectora ilustrativa que contiene un grupo Bastidor de maleimida y opcionalmente una unidad Espaciadora autoinmolativa de éter p-aminobencílico.

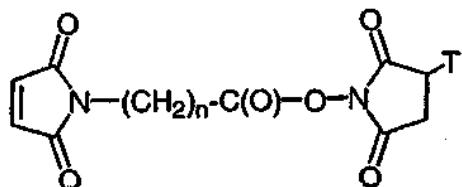
### Esquema 10



en el que Q es -alquilo 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 varía de 0-4; y n es un número entero que varía de 0-10.

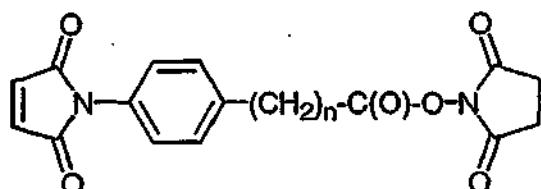
- 15 Los Bastidores útiles se pueden incorporar en un Conector usando los compuestos intermedios disponibles en el mercado en Molecular Biosciences (Boulder, CO) que se describen a continuación mediante el uso de técnicas

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



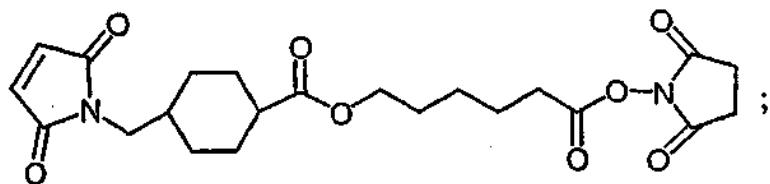
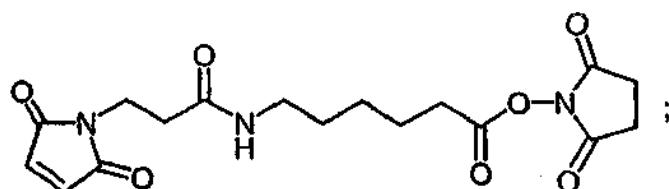
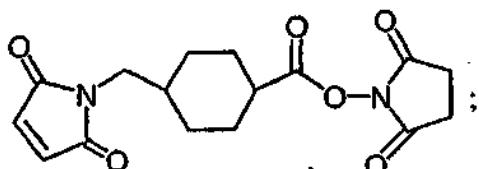
5

en el que n es un número entero que varía de 1-10 y T es -H o -SO<sub>3</sub>Na;

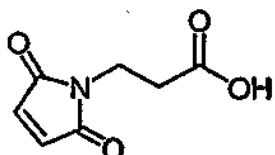


10

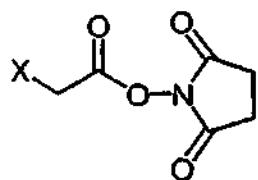
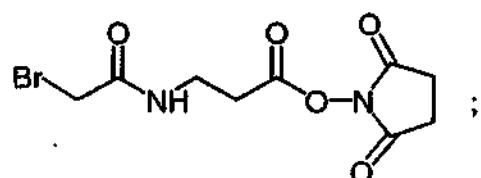
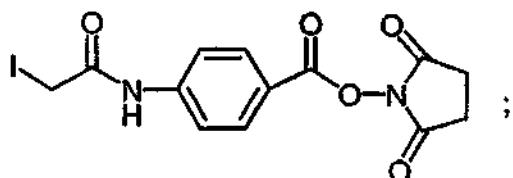
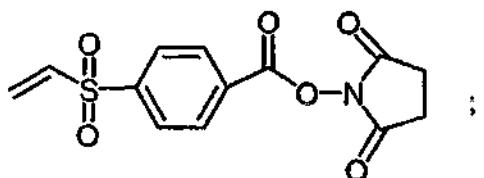
en el que n es un número entero que varía de 0-3;



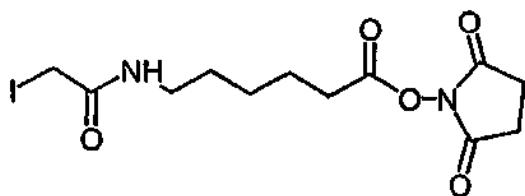
15 y



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

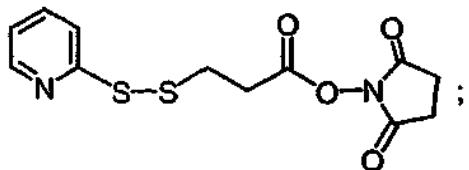


en el que X es -Br o -I; y



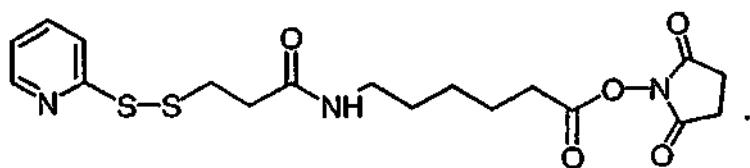
5

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



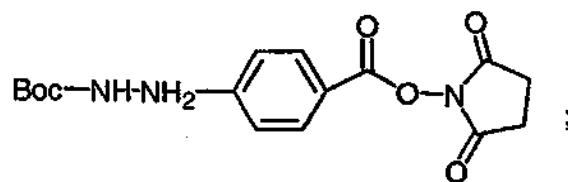
10

y

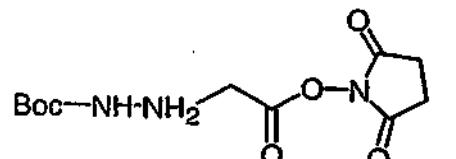


15

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



y



5

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

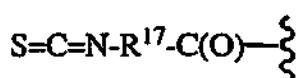
10



15 en la que  $-R^{17}-$  se selecciona entre -alquieno  $C_1-C_{10}-$ , -carbociclo  $C_3-C_8-$ , -O-(alquil  $C_1-C_8$ )-, -arileno-, -alquieno  $C_1-C_{10}$ -arileno-, -arilen-alquieno  $C_1-C_{10}-$ , -alquieno  $C_1-C_{10}$ -(carbociclo  $C_3-C_8$ )-, -(carbociclo  $C_3-C_8$ )-alquieno  $C_1-C_{10}-$ , -heterociclo  $C_3-C_8-$ , -alquieno  $C_1-C_{10}$ -(heterociclo  $C_3-C_8$ )-, -(heterociclo  $C_3-C_8$ )-alquieno  $C_1-C_{10}-$ , -( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{-CH}_2-$ ; y  $r$  es un número entero que varía de 1-10;

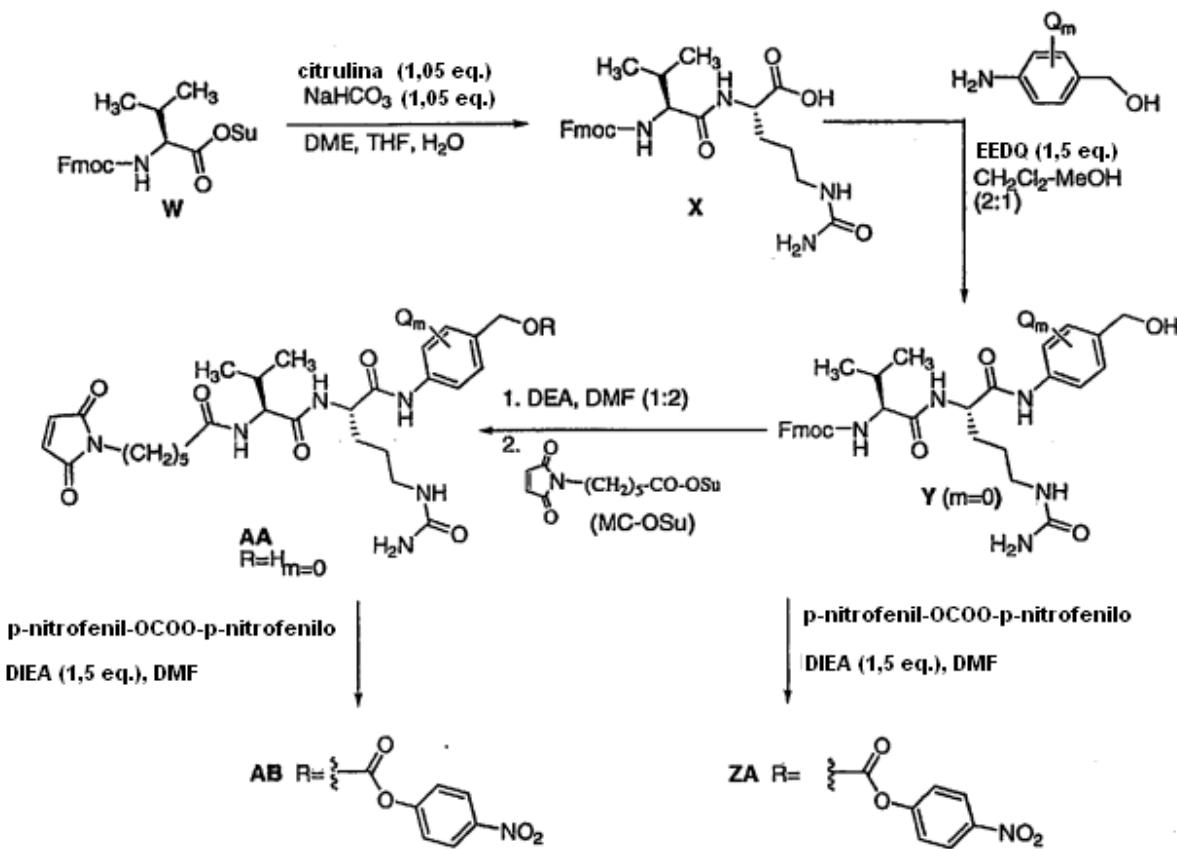
Los Bastidores de isocianato de la fórmula que se muestra a continuación se pueden preparar a partir de cloruros de ácido isocianato-carboxílico tal como se describe en Angew. Chem., 1975, 87 (14): 517.

20



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

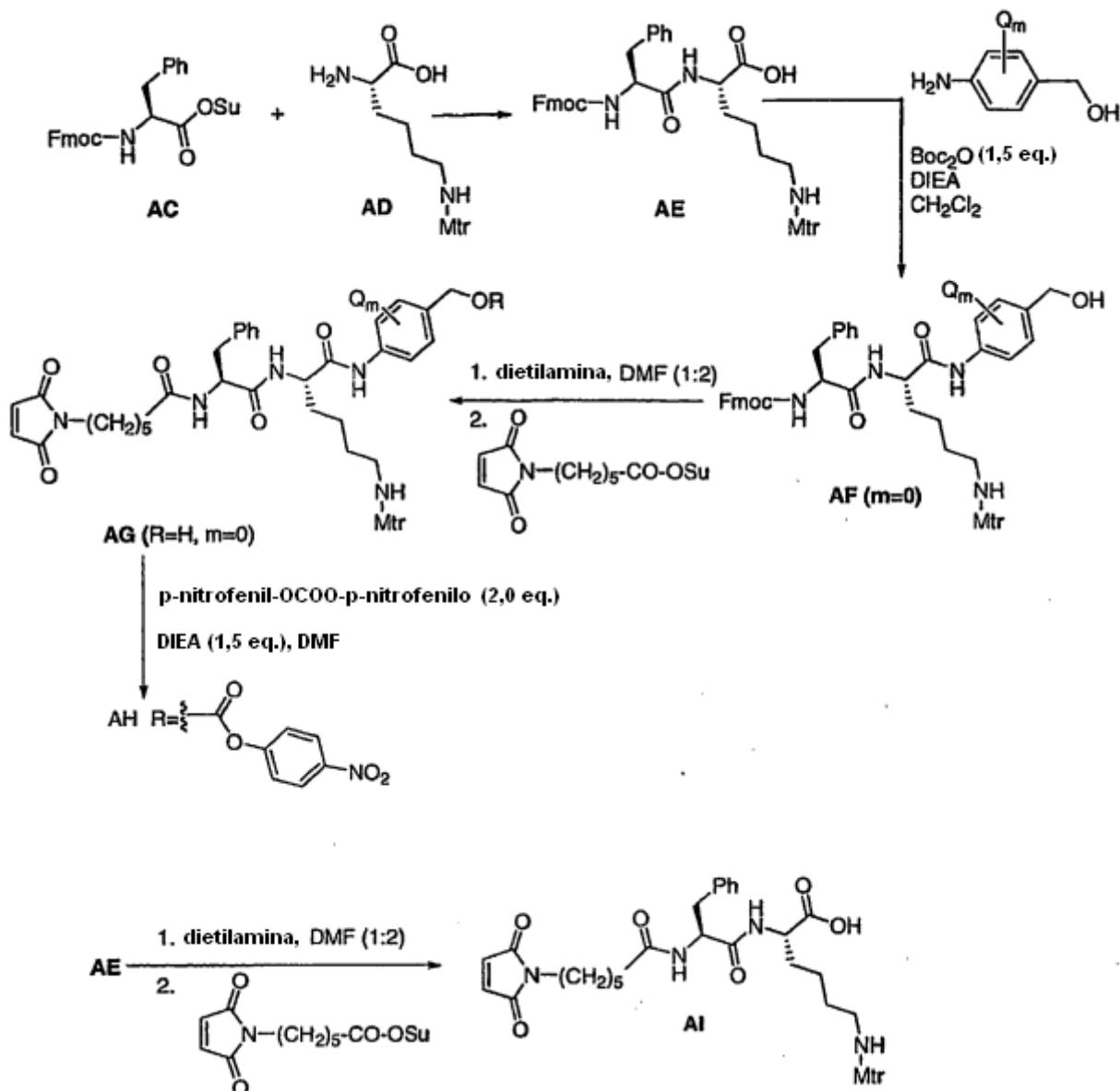
25 El Esquema 11 nuestro método para obtener un Conector dipeptídico de val-cit que tiene un Bastidor de maleimida y opcionalmente un Espaciador autoinmolativo de p-aminobencilo.

Esquema 11

en el que Q es -alquilo 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 varía de 0-4.

5

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

Esquema 12

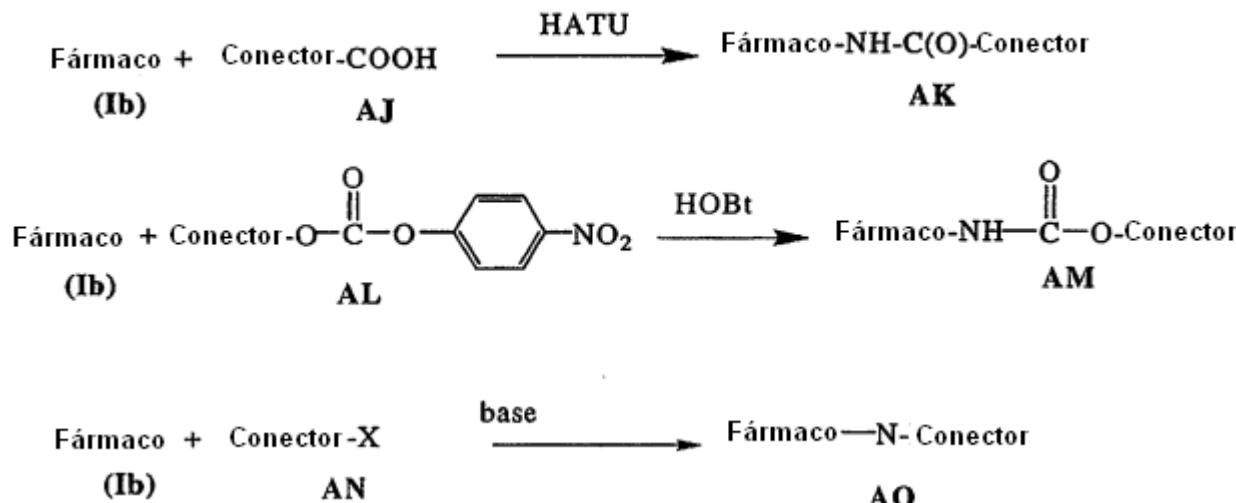
en el que Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0-4.

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

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

Los métodos ilustrativos útiles para unir un Fármaco a un Ligando para formar un Compuesto de Fármaco-Conejero se representan en el Esquema 13 y se resumen en los Procedimientos Generales G-H.

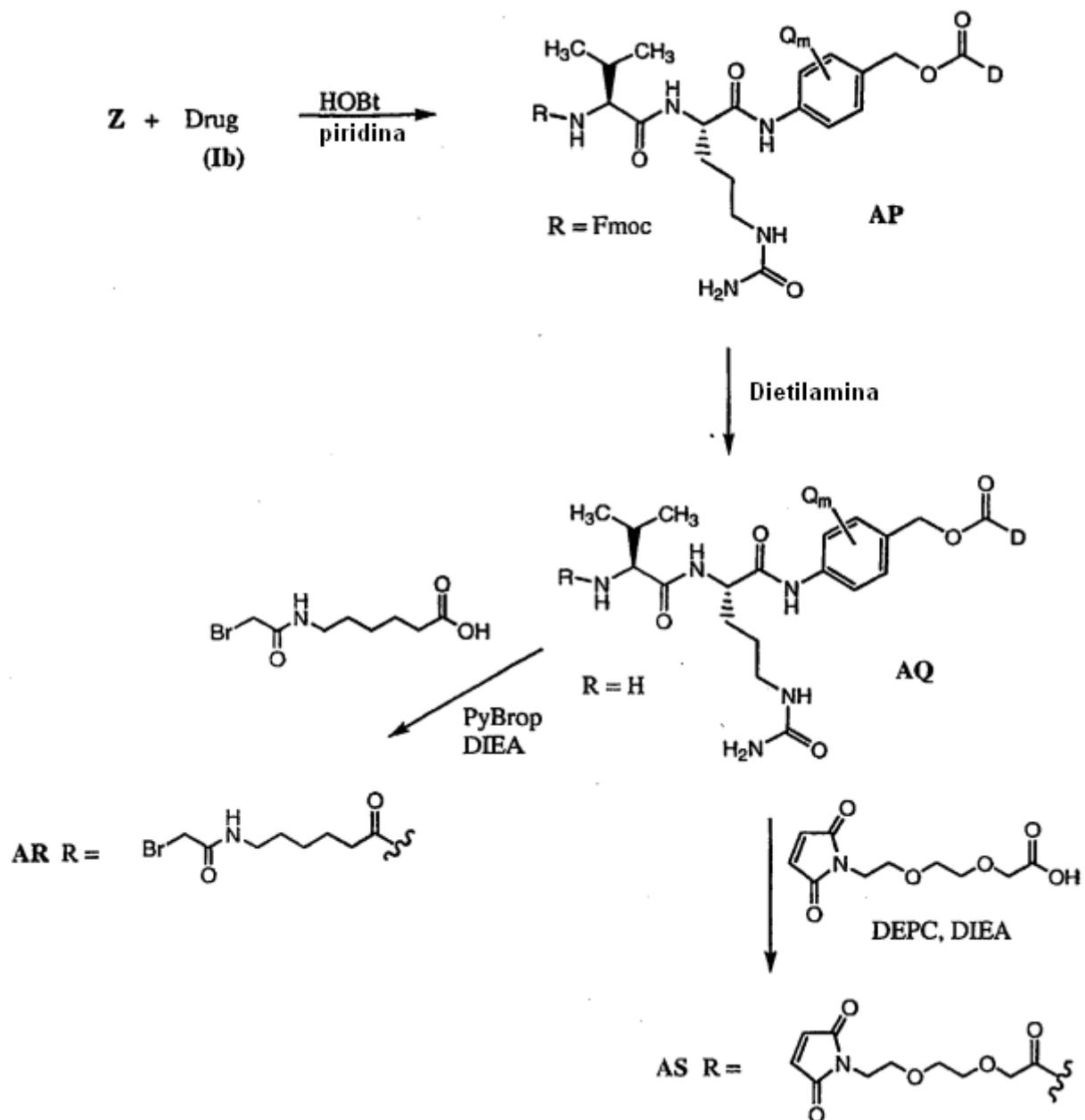
### **Esquema 13**



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

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

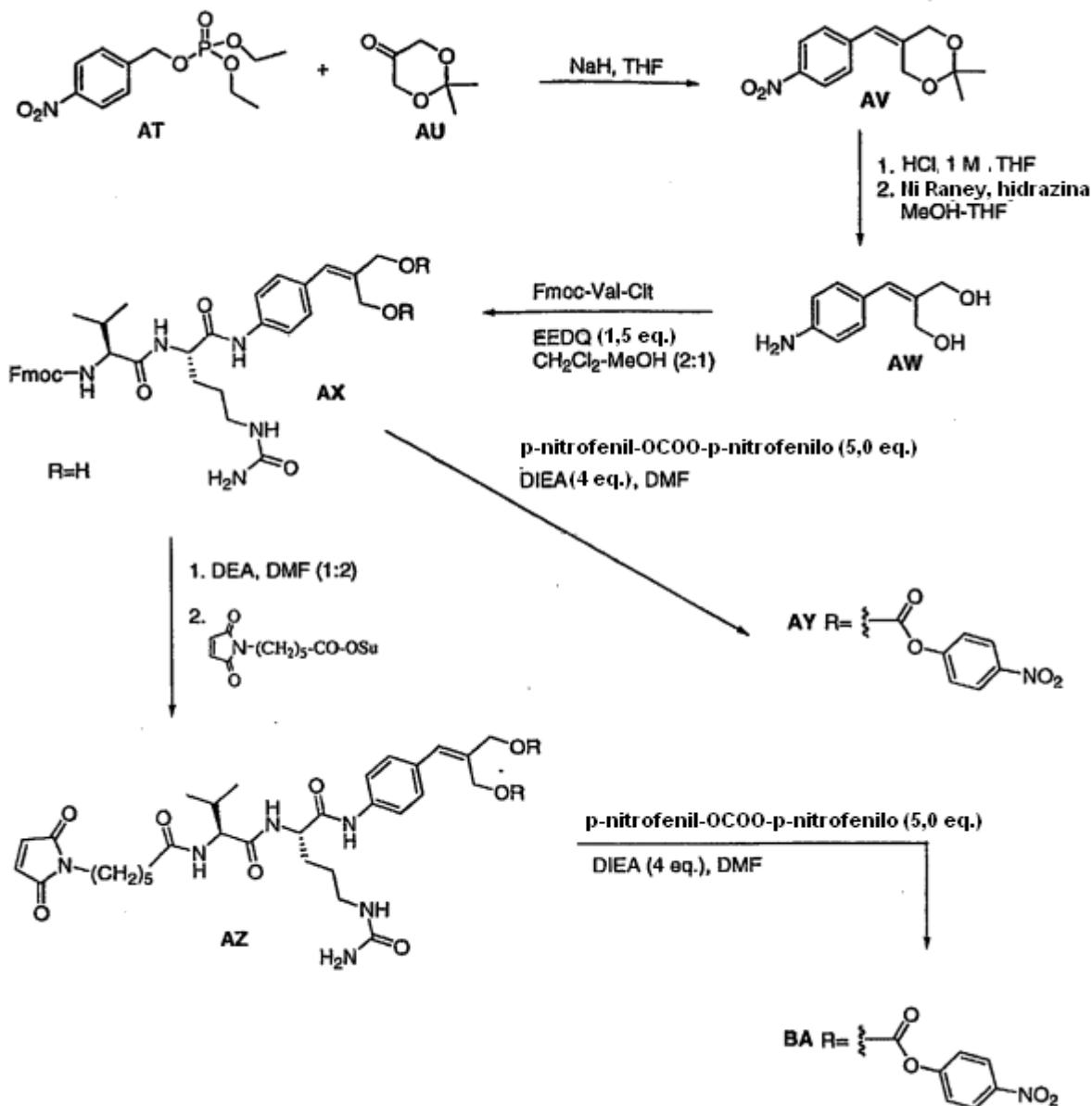
Un método alternativo para preparar Compuestos de Fármaco-Conector se resume en el Esquema 14. Usando el método del Esquema 14, el Fármaco se une a una unidad Conectora parcial (**Z****A**, por ejemplo), que no tiene una unidad Bastidor. Ésto proporciona el compuesto intermedio **AP**, que tiene una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

Esquema 14

en el que Q es -alquilo 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 varía de 0-4.

5

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

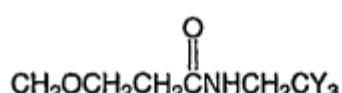
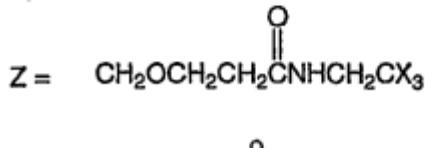
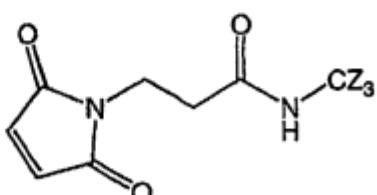
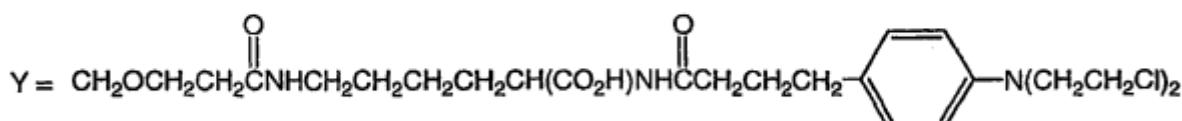
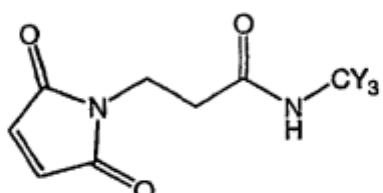
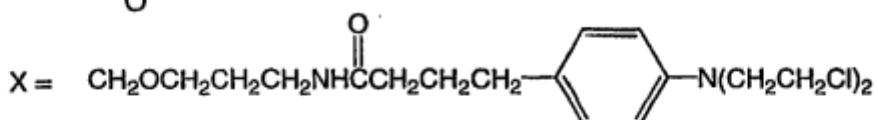
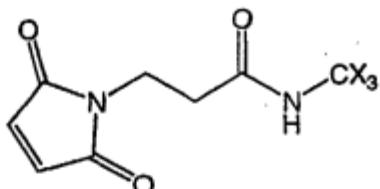
Esquema 15

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

4.6.3 CONECTORES DENDRÍTICOS

El conector puede ser un conector de tipo dendrítico para unión covalente de más de un resto de fármaco a través de un resto conector multifuncional, de ramificación con un Ligando, tal como pero no limitado a un anticuerpo (Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12: 2213-2215; Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11: 1761-1768). Los conectores dendríticos pueden aumentar la relación molar de fármaco a anticuerpo, es decir la carga, que está relacionada con la potencia del Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando. Por lo tanto, cuando un anticuerpo modificado genéticamente con cisteína lleva solamente un grupo reactivo tiol de cisteína, una multitud de restos de fármaco se pueden unir a través de un conector dendrítico.

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



5

#### 4.6.4 CONJUGACIÓN DE RESTOS DE FÁRMACOS A ANTICUERPOS

El Esquema 16 ilustra metodología útil para preparar conjugados de Fármaco-Conector-Ligando que tienen de 10 aproximadamente 2 a aproximadamente 4 fármacos por anticuerpo. Un anticuerpo se trata con un agente reductor, tal como ditiotreitol (DTT) para reducir alguno o todos los restos disulfuro de la cisteína para formar grupos tiol de cisteína nucleófilos (-CH<sub>2</sub>SH). El anticuerpo parcialmente reducido reacciona de este modo con compuestos de fármaco-conector, o reactivos de conector, con grupos funcionales electrófilos tales como maleimida o α-halo carbonilo, de acuerdo con el método de conjugación en la página 766 de Klussman, et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15 (4): 765-773.

**Esquema 16**



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

minutos, el tampón se intercambia mediante elución sobre resina Sephadex G25 y elución con PBS con DTPA 1 mM. El valor de tiol/Ab se comprueba por determinación de la concentración de anticuerpos reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol por reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido disuelto en PBS se enfria con hielo. El conector de fármaco, *por ejemplo*, MC-val-cit-PAB-MMAE en DMSO, disuelto en acetonitrilo y agua en una concentración conocida, se añade al anticuerpo reducido enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para inactivar la reacción se protege cualquier grupo tiol de anticuerpos sin reaccionar. La mezcla de reacción se concentra por ultrafiltración centrífuga y el ADC, *por ejemplo*, AC10-MC-vc-PAB-MMAE, se purifica y se desala por elución a través de resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 µm en condiciones estériles, y se congela para su almacenamiento.

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

15

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

Napi3b	10H1-vc-MMAE	4,5	4,6
Napi3b	4C9-vc-MMAE	3,0	5,4
Napi3b	10H1-vc-MMAE	4,5	4,8
Napi3b	10H1-vc-MMAF	6,5	4
NCA	3E6-MC-fk-PAB-MMAE	49,6	5,4
NCA	3E6-MC-vc-PAB-MMAE	56,2	6,4
PSCA	PSCA-fk-MMAE	51,7	8,9
PSCA	PSCA-vc-MMAE	61,1	8,6
Napi3b	10H1-MC-vc-PAB-MMAE	75	4,2
Napi3b	10H1-MC-vc-PAB-MMAF	95	4,4
Napi3b	10H1-MC-MMAF	92	4
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAE	79	5
EphB2R	2H9-MC-MMAF	92	4,9
0772P	11D10(Fc quimera)-MC-vc-PAB-MMAE	79	4,3
0772P	11D10(Fc quimera)-MC-vc-PAB-MMAF	70	4,5
0772P	11D10(Fc quimera)-MC-MMAF	23	4,5
Brevican	6D2-MC-vc-PAB-MMAF	0,3	4,5
Brevican	6D2-MC-MMAF	0,36	4,5
EphB2R	2H9(Fc quimera)-MC-vc-PAB-MMAE	1983	4,3
E16	12B9-MC-vc-PAB-MMAE	14,1	4,6
E16	12B9-MC-vc-PAB-MMAF	16,4	4,5
E16	12G12-MC-vc-PAB-MMAE	10,5	4,1
E16	12G12-MC-vc-PAB-MMAF	10,2	3,8
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAE	58,6	3,8
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAF	8	3,1
0772P	11D10(Fc quimera)-MC-vc-PAB-MMAE	340	3,9
Stear1	(Stear1-92)-MC-vc-PAB-MMAE	3,5	4
Stear1	(Stear1-92)-MC-vc-PAB-MMAF	4,7	4
Stear1	(Stear1-120)-MC-vc-PAB-MMAE	2	4
Stear1	(Stear1-120)-MC-vc-PAB-MMAF	2,3	4
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAF	52,2	4,5

#### **4.7 COMPOSICIÓN Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN**

- 5 También se describe una composición que incluye una cantidad eficaz de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Por conveniencia, las unidades de Fármacos y Compuestos de Fármaco-Conector se pueden mencionar como Compuestos a modo de Ejemplo, mientras que Conjugados Fármaco-Ligando y Conjugados Fármaco-Conector-Ligando se pueden mencionar como Conjugados a modo de Ejemplo. Las composiciones son adecuadas para administración veterinaria o en seres humanos.
- 10 Las presentes composiciones pueden estar en cualquier forma que permita que la composición se administre a un paciente. Por ejemplo, la composición puedes estar en forma de un sólido, líquido o gas (aerosol). Las vías de administración habituales incluyen, sin limitación, oral, tópica, parenteral, sublingual, rectal, vaginal, ocular, intratumoral, e intranasal. La administración parenteral incluye inyecciones subcutánea, intravenosa, intramuscular, inyección intraesternal o técnicas de infusión. Las composiciones pueden administrarse por vía parenteral. Como alternativa, los Compuestos a modo de Ejemplo y/o los Conjugados a modo de Ejemplo o composiciones pueden administrarse por vía intravenosa.
- 15

- Las composiciones farmacéuticas se pueden formular con el fin de que permitan que un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo esté biodisponible tras la administración de la composición un paciente. Las composiciones pueden tomar la forma de una o más unidades de dosificación, en las que por ejemplo, un comprimido puede ser una sola unidad de dosificación, y un envase de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo en forma de aerosol pueda contener una pluralidad de unidades de dosificación.
- Los materiales usados en la preparación de las composiciones farmacéuticas pueden ser no tóxicos en las cantidades usadas. Será evidente para los expertos en la materia que la dosificación óptima del ingrediente o ingredientes activos en la composición farmacéutica dependerá de diversos factores. Factores relevantes incluyen, sin limitación, el tipo de animal (por ejemplo, ser humano), la forma en particular del Compuesto a modo de Ejemplo o Conjugado a modo de Ejemplo, la forma de administración, y la composición usada.
- El vehículo o excipiente farmacéuticamente activo puede ser de partículas, de modo que las composiciones, por ejemplo, estén en forma de comprimido o de polvo. El vehículo o vehículos pueden ser líquidos, siendo las composiciones, por ejemplo, un jarabe oral o un líquido inyectable. Además, el vehículo o vehículos pueden ser gaseosos o con partículas, con el fin de proporcionar una composición de aerosol útil, *por ejemplo*, en administración por inhalación.
- Cuando está destinada a la administración oral, la composición está preferentemente en forma sólida o líquida, en la que las formas semisólida, semilíquida, suspensión y gel están incluidas dentro de las formas que se consideran en el presente documento como sólidas o líquidas.
- Como una composición sólida para administración oral, la composición se prevé formular en una forma de polvo, gránulo, comprimido fabricado por compresión, píldora, cápsula, goma de mascar, oblea o similares. Dicha composición sólida contiene por lo general uno o más diluyentes inertes. Además, pueden estar presentes uno o más de los siguientes: aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, etil celulosa, celulosa microcristalina, o gelatina; excipientes tales como almidón, lactosa o dextrinas, agentes disgregantes tales como ácido algínico, alginato sódico, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio o Sterotex; agentes deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina, un agente saborizante tales como menta, salicilato de metilo por sabor a naranja, y un agente colorante.
- Cuando la composición está en forma de una cápsula, *por ejemplo*, una cápsula de gelatina, ésta puede contener, además de materiales del tipo que se han mencionado anteriormente, un vehículo líquido tal como polietilenglicol, ciclodextrina o un aceite graso.
- La composición puede estar en forma de un líquido, *por ejemplo*, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser útil para administración oral o para administración por inyección. Cuando está destinado para administración oral, una composición que de comprender uno o más de un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y potenciador del sabor. En una composición para administración por inyección, también se puede incluir uno o más tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizante el agente isotónico.
- Las composiciones líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, también pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro sódico isotónico, aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como medio disolvente o de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, ciclodextrina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes de quelación tales como ácido etilendiamintetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para la justa de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. Una composición parenteral puede estar incluida en ampolla, una jeringa desecharable o un vial de dosis múltiples fabricado de vidrio, plástico u otro material. La solución salina fisiológica es un adyuvante a modo de ejemplo. Una composición inyectable es preferentemente estéril.
- La cantidad del Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo que es eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección en particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Además, se pueden usar opcionalmente ensayo *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos óptimos de dosificación. La dosis precisa a usar en las composiciones dependerá también de la vía de administración, y de la gravedad de la enfermedad o el trastorno, y se debería decidir de acuerdo con el criterio del médico en cada una de las circunstancias del paciente.
- Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo de modo que se obtendrá una dosificación adecuada. Por lo general, esta cantidad es de al menos aproximadamente un 0,01 % de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo en peso de la composición. Cuando se pretende que sea para administración oral, esta cantidad se puede variar para que oscile de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 80 % en peso de la composición. Las composiciones orales pueden comprender de aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 50 % del Compuesto a modo de Ejemplo

y/o Conjugado a modo de Ejemplo el peso de la composición. Además, las presentes composiciones pueden prepararse de modo que una unidad de dosificación parenteral contenga de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 2 % el peso del Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo.

- 5 A la administración intravenosa, la composición de comprender de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo por kg de peso corporal del animal. La composición puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo por kg de peso corporal del animal. La cantidad administrada puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal del Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo.
- 10

Generalmente, la dosificación de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo administrada a un paciente es por lo general de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 2000 mg/kg del peso corporal del animal. La dosificación administrada a un paciente puede ser entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del animal o la dosificación administrada a un paciente es entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 250 mg/kg del peso corporal del animal o la dosificación administrada a un paciente es entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del animal o la dosificación administrada es entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del animal la dosificación administrada es entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del animal.

20

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

30

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

40

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

45

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

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

55

60 El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente, con el que se administra un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, que incluyen los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos pueden ser solución salina, goma de acacia, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea, y similares. Además, se pueden usar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. En un ejemplo, cuando se administran a un paciente, el Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo o composiciones y vehículos farmacéuticamente aceptables son estériles. El agua es un vehículo a modo de ejemplo cuando los Compuestos a

65

- modo de Ejemplo y/o los Conjugados a modo de Ejemplo se administran por vía intravenosa. Las soluciones salinas y soluciones de dextrosa acuosa y glicerol solutions también se pueden usar como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, quizá, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Las presentes composiciones, si se desea, también pueden contener cantidades menores de agentes humectantes o de emulsificación, o agentes de tamponamiento del pH.
- 5 Las presentes composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, gránulos, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, supositorios, emulsiones, aerosoles, pulverizaciones, suspensiones, o cualquier otra forma adecuada para su uso. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.
- 10 Los Compuestos a modo de Ejemplo y/o los Conjugados a modo de Ejemplo pueden formularse de acuerdo con procedimientos de rutina en forma de una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa en animales, particularmente seres humanos. Por lo general, los vehículos o excipientes para la administración intravenosa son soluciones tampón acuosas isotónicas estériles. Cuando sea necesario, las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Las composiciones para administración intravenosa pueden comprender opcionalmente un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, 15 los ingredientes se suministran por separado o se mezclan en conjunto en forma de dosificación individual, por ejemplo, en forma de un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un envase cerrado herméticamente tal como una ampolla o un sobrecito que indique la cantidad del agente activo. Cuando se va a administrar un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo por infusión, se puede dosificar, por ejemplo, con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando el Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo se administra por inyección, se puede proporcionar una 20 ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración.
- 25 Las composiciones para administración oral pueden estar en forma de comprimidos, pastillas para chupar, suspensões acuosas u oleosas, gránulos, polvos, emulsiones, cápsulas, jarabes o elixires, por ejemplo. Las composiciones administradas por vía oral pueden contener uno o más agentes opcionales opcionalmente, por ejemplo, agentes edulcorantes tales como fructosa, aspartamo o sacarina; agentes saborizantes tales como menta, aceite de gaulteria, o cereza; agentes colorantes; y agentes conservantes, para proporcionar una preparación farmacéuticamente agradable al paladar. Además, cuando están en forma de comprimido o píldora, las 30 composiciones se pueden revestir para retrasar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal proporcionando una acción sostenida durante un periodo de tiempo prolongado. Las membranas selectivamente permeables que rodean un compuesto de dirección osmóticamente activo también son adecuadas para compuestos administrados por vía oral. En estas últimas plataformas, el fluido del entorno que rodea a la cápsula es embestido por el compuesto de dirección, que se hincha para desplazar el agente o composición de agente a través de una apertura. Estas plataformas de administración pueden proporcionar un perfil de liberación básicamente de orden cero en oposición a los perfiles con adiciones de formulaciones de liberación inmediata. También se puede usar un material de retardo con el tiempo tal como monoestearato de glicerol o estearato de glicerol.
- 35 Las composiciones pueden estar destinadas a la administración tópica, en cuyo caso el vehículo puede estar en forma de una solución, emulsión, pomada o base de gel. Si están destinadas a la administración transdérmica, la composición puede estar en la forma de un parche transdérmicos o un dispositivo de iontoporesis. Las formulaciones tópicas pueden comprender una concentración de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo de aproximadamente un 0,05 % a aproximadamente un 50 % en p/v (peso por volumen unitario de la composición), en otro aspecto, de un 0,1 % a un 10 % en p/v.
- 40 45 La composición puede estar destinada a la administración rectal, en la forma, *por ejemplo*, de un suppositorio que se fundirá en el recto y liberará el Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo.
- 50 La composición puede incluir diversos materiales que modifican la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que forman una cubierta de revestimiento alrededor de los principios activos. Los materiales que forman la cubierta de revestimiento por lo general son inertes, y se pueden seleccionar entre, por ejemplo, azúcar, goma laca, y otros agentes de revestimiento entérico. Como alternativa, los principios activos se pueden encerrar en una cápsula de gelatina.
- 55 60 Las composiciones pueden consistir en unidades de dosificación gaseosa, por ejemplo, pueden estar en forma de un aerosol. El término aerosol se usa para indicar diversos sistemas que varían de los de naturaleza coloidal a sistemas que consisten en envases presurizados. Administración puede ser mediante un gas licuado o comprimido o mediante un sistema de bombeo adecuado que dosifica los principios activos.
- 65 Ya sea en forma sólida, líquida o gaseosa, las presentes composiciones pueden incluir un agente farmacológico usado en el tratamiento de cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa.

#### **4.8 USOS TERAPÉUTICOS DE LOS CONJUGADOS A MODO DE EJEMPLO**

Los Compuestos a modo de Ejemplo y/o los Conjugados a modo de Ejemplo son útiles para tratar cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa en un paciente.

#### **4.8.1 TRATAMIENTO DE CÁNCER**

10 Los Compuestos a modo de Ejemplo y/o los Conjugados a modo de Ejemplo son útiles para inhibir la multiplicación de una célula tumoral o de una célula cancerosa, causando apoptosis en una célula tumoral o cancerosa, o para tratar el cáncer en un paciente. Los Compuestos a modo de Ejemplo y/o los Conjugados a modo de Ejemplo se pueden usar en consecuencia de acuerdo con diversos entornos para el tratamiento de cánceres en animales. Los Conjugados Fármaco-Conector-Ligando se pueden usar para administrar un Fármaco o unidad de Fármaco a una célula tumoral o célula cancerosa. Sin quedar ligado a teoría alguna, en una realización, la unidad Ligando de un Conjugado a modo de Ejemplo se une a o se asocia con un antígeno asociado a célula cancerosa asociado una célula tumoral, y el Conjugado a modo de Ejemplo se puede recoger dentro de una célula tumoral o célula cancerosa a través de endocitosis mediada por receptores. El antígeno se puede unir a una célula tumoral o célula cancerosa o puede ser una proteína de matriz extracelular asociada con la célula tumoral o célula cancerosa. Una vez dentro de la célula, una o más secuencias peptídicas específicas dentro de la unidad Conectora se extienden hidrolíticamente con una o más proteasas asociadas a células tumorales o a células cancerosas, dando como resultado la liberación de un Fármaco o un Compuesto de Fármaco-Conector. A continuación, el Fármaco liberado o Compuesto de Fármaco-Conector es libre paramilitar dentro de la célula e inducir actividades citotóxicas citostáticas. Como alternativa, el Fármaco o unidad de Fármaco se escinde del Conjugado a modo de Ejemplo fuera de la célula tumoral o célula cancerosa, y el Fármaco o Compuesto de Fármaco-Conector penetra posteriormente en la célula.

15

20

25 En un ejemplo, la unidad Ligando se une a la célula tumoral o célula cancerosa.

25 En un ejemplo, la unidad Ligando se une a la célula tumoral o célula cancerosa.

En otro ejemplo, la unidad Ligando se une a una célula tumoral o antígeno de célula cancerosa que está en la superficie de la célula tumoral o célula cancerosa.

30 En otro ejemplo, la unidad Ligando se une a una célula tumoral o antígeno de célula cancerosa que está en una proteína de matriz extracelular asociada con la célula tumoral o célula cancerosa.

La especificidad de la unidad Ligando para una célula tumoral o célula cancerosa en particular puede ser importante para determinar los tumores o cánceres que se tratan de forma más eficaz. Por ejemplo, los Conjugados a modo de Ejemplo que tienen una unidad Ligando BR96 pueden ser útiles para tratar carcinomas positivos a antígenos que incluyen los de pulmón, mama, colon, ovarios, y páncreas. Los Conjugados a modo de Ejemplo que tienen una unidad Ligando Anti-CD30 o una anti-CD40 pueden ser útiles para tratar neoplasias hematológicas.

Otros tipos de cánceres en particular que se pueden tratar con los Conjugados a modo de Ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los que se desvelan en la Tabla 3.

**TABLA 3**

Tumores sólidos, que incluyen pero no se limitan a:

### **fibrosarcoma**

**mixosarcoma**

### **liposarcoma**

condrosarcoma

### **sarcoma**

cordoma

**angiosarcoma**

endoteliosarcoma

linfangiosarcoma

linfangjoe

sinovioma

mesotelioma

tumor de Ewing

rabdomiosarcoma  
cáncer de colon  
cáncer colorrectal  
cáncer de riñón  
cáncer pancreático  
cáncer óseo  
cáncer de mama  
cáncer de ovarios  
cáncer de próstata  
cáncer de esófago  
cáncer de estómago  
cáncer oral  
cáncer nasal  
cáncer de garganta  
carcinoma de células escamosas  
carcinoma de células basales  
adenocarcinoma  
carcinoma de glándulas utópicas  
carcinoma de glándulas sebáceas  
carcinoma papilar  
adenocarcinomas papilares  
cistadenocarcinoma  
carcinoma medular  
carcinoma broncogénico  
carcinoma de células renales  
hepatoma  
carcinoma de conductos biliares  
coriocarcinoma  
seminoma  
carcinoma embrionario  
tumor de Wilms  
cancer cervical  
cancer uterino  
cancer testicular  
carcinoma de pulmón de células pequeñas  
carcinoma de vejiga  
cáncer de pulmón  
carcinoma epitelial  
glioma  
glioblastoma multiforme  
astrocitoma  
meduloblastoma

craneofaringioma  
ependimoma  
pinealoma  
hemangioblastoma  
neurinoma del acústico  
oligodendrogioma  
meningioma  
cáncer de piel  
melanoma  
neuroblastoma  
retinoblastoma

cánceres de transmisión sanguínea, que incluyen pero no se limitan a

leucemia linfooblástica aguda "ALL"  
leucemia linfooblástica aguda de linfocitos B  
leucemia linfooblástica aguda de linfocitos T  
leucemia mieloblástica aguda "AML"  
leucemia promielocítica aguda "APL"  
leucemia monoblástica aguda  
leucemia eritroleucémica aguda  
leucemia megacarioblástica aguda  
leucemia mielomonocítica aguda  
leucemia no linfocítica aguda  
leucemia sin diferenciar aguda  
leucemia mielocítica crónica "CML"  
leucemia linfocítica crónica "CLL"  
leucemia de células pilosas  
mieloma múltiple

leucemias aguda y crónica:

linfooblástica  
mielogénica

leucemias aguda y crónica:

linfocítica  
leucemias mielocíticas

Linfomas:

enfermedad de Hodgkin

Linfoma no Hodgkin

Mieloma múltiple

macroglobulinemia de Waldenström

Enfermedad de cadena pesada

Policitemia vera

- 5 Los Conjugados a modo de Ejemplo proporcionan una dirección al tumor o cáncer específica de conjugación, reduciendo de este modo la toxicidad general de estos compuestos. Las unidades Conectoras estabilizan los Conjugados a modo de Ejemplo en sangre, sin embargo se pueden escindir con proteasas específicas de tumores dentro de la célula, liberando un Fármaco.

#### 4.8.2 TERAPIA DE MODALIDAD MÚLTIPLE PARA CÁNCER

- 10 Los cánceres, que incluyen, pero no se limitan a, un tumor, metástasis, u otra enfermedad o trastorno caracterizado por crecimiento celular descontrolado, se pueden tratar o prevenir mediante administración de un Conjugado a modo de Ejemplo y/o un Compuesto a modo de Ejemplo.

- 15 Métodos para tratar o prevenir el cáncer son los que se describen en el presente documento, que incluyen administrar a un paciente con necesidad del mismo una cantidad eficaz de un Conjugado a modo de Ejemplo y un agente quimioterapéutico. En un ejemplo, el agente quimioterapéutico es uno con el que no se ha encontrado que el tratamiento del cáncer sea resistente. En otro ejemplo, el agente quimioterapéutico es uno con el que se ha encontrado que el tratamiento del cáncer es resistente. Los Conjugados a modo de Ejemplo se pueden administrar a un paciente que también ha experimentado cirugía como tratamiento para el cáncer.

- 20 En un ejemplo, el método adicional de tratamiento es la terapia de radiación.

- 25 En un ejemplo específico, el Conjugado a modo de Ejemplo se administró simultáneamente con el agente quimioterapéutico o con terapia de radiación. En otro ejemplo específico, el agente quimioterapéutico o terapia de radiación se administra antes su después de la administración de un Conjugado a modo de Ejemplo, por ejemplo, al menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes o varios meses (*por ejemplo*, hasta tres meses), antes o después de la administración de un Conjugado a modo de Ejemplo.

- 30 Un agente quimioterapéutico se puede administrar durante una serie de sesiones. Se puede administrar uno cualquiera o una combinación de los agentes quimioterapéuticos que se enumeran en la Tabla 4. Con respecto a la radiación, se puede usar cualquier protocolo de terapia de radiación dependiendo del tipo de cáncer a tratar. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, se puede administrar radiación de rayos X; en particular, se puede usar megavoltaje de alta energía (radiación mayor que 1 MeV de energía) para tumores profundos, y se pueden usar radiación de haz de electrones rayos X de ortovoltaje para cánceres de piel. Además, se pueden administrar radioisótopos que emiten rayos gamma, tales como isótopos radiactivos de radio, cobalto y otros elementos.

- 35 Además, se describen métodos tratamiento del cáncer con un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo como una alternativa a la quimioterapia o a la terapia de radiación cuando se ha demostrado, o se puede demostrar, que la quimioterapia o la terapia de radiación puede ser demasiado tóxica, *por ejemplo*, da como resultado efectos secundarios inaceptables o insoportables, para el sujeto que se está tratando. El animal que se está tratando, opcionalmente, se puede tratar con otro tratamiento de cáncer tal como cirugía, terapia de radiación o quimioterapia, dependiendo del tratamiento que se encuentre aceptable o soportable.

- 45 Los Compuestos a modo de Ejemplo y/o los Conjugados a modo de Ejemplo también se pueden usar de forma *in vitro* o *ex vivo*, de modo que para el tratamiento de determinados cánceres, que incluyen, pero no se limitan a leucemias y linfomas, dicho tratamiento implica trasplantes de células madre autólogas. Esto puede implicar un proceso en etapas múltiples en el que las células madre hematopoyéticas autólogas del animal se cosechan y se purgan de todas las células cancerosas, a continuación se erradica la población de células de médula ósea restantes del animal mediante la administración de una dosis elevada de un Compuesto a modo de Ejemplo y/o Conjugado a modo de Ejemplo con o sin terapia de radiación de dosis elevada adjunta, y el injerto de células madre se infunde de nuevo en el animal. A continuación, se proporciona cuidados de apoyo mientras que la función de la médula ósea se restablece y el animal se recupera.

#### 4.8.3 TERAPIA CON MÚLTIPLES FÁRMACOS PARA CÁNCER

Se desvelan métodos para tratar el cáncer que incluyen administrar a un paciente con necesidad del mismo una cantidad eficaz de un Conjugado a modo de Ejemplo y otro agente terapéutico que es un agente anticáncer. Agentes anticáncer adecuados incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, taxol, L-asparaginasa, mercaptopurina, tioguanina, hidroxiurea, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, cisplatino, carboplatino, mitomicina, dacarbazina, procarbazina, topotecán, mostazas de nitrógeno, cytoxan, etopósido, 5-fluorouracilo, BCNU, irinotecán, camptotecinas, bleomicina, doxorubicina, idarrubicina, daunorrubicia, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, asparaginasa, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel, and docetaxel. En un aspecto, el agente anticáncer incluye, pero no se limitan a, un fármaco que se enumera en la Tabla 4.

TABLA 4

Agentes de alquilación	
Mostazas de nitrógeno:	ciclofosfamida ifosfamida trofosfamida clorambucilo melfalano
Nitrosoureas:	carmustina (BCNU) lomustina (CCNU)
Alquilsulfonatos	busulfán
	treosulfán
Triazenos:	decarbazina
Compuestos que contienen platino:	cisplatino carboplatino
Alcaloides Vegetales	
Alcaloides de la vinca:	vincristina vinblastina vindesina vinorelbina
Taxoides:	paclitaxel docetaxol
Inhibidores de la ADN Topoisomerasa	
Epipodofilinas:	etopósido tenipósido topotecán 9-aminocamtotecina camptotecina crisnatol
mitomicinas:	mitomicina C
Anti-metabolitos	
Anti-folatos:	
Inhibidores de DHFR:	metotrexato trimetrexato
Anti-metabolitos	
Inhibidores de la IMP deshidrogenasa:	ácido micofenólico tiazofurina ribavirina EICAR
Inhibidores de la ribonucleótido reductasa:	hidroxiurea deferoxamina

Análogos de pirimidina:	
Análogos de un acilo	5-Fluorouracilo
	flouxuridina doxifluridina ratitrexed
Análogos de citosinas	citarabina (ara C) arabinósido de citosina fludarabina
Análogos de purina:	mercaptopurina tioguanina
Terapias hormonales:	
Antagonistas de receptores:	
Antiestrógenos	tamoxifeno raloxifeno megestrol
Agonistas de LHRH:	goserilina acetato de leuprolida
Antiandrógenos:	flutamida bicalutamida
Retinoides/Deltoides	
Análogos de vitamina D3:	EB 1089 CB 1093 KH 1060
Terapias fotodinámicas:	vertoporfina (BPD-MA) ftalocianina fotosensibilizador Pc4 demetoxi-hipocrelina A (2BA-2-DMHA)
Citoquinas:	Interferón- $\alpha$ Interferón- $\gamma$ factor de necrosis tumoral
Otros:	Gemcitabina Velcade Revamid Talamid
Inhibidores de isoprenilación:	Lovastatina
Neurotoxinas dopaminérgicas:	ión de 1-metil-4-fenilpiridinio
Inhibidores del ciclo celular	estaurosporina
Actinomicinas:	Actinomicina D
	dactinomicina
Bleomicinas:	bleomicina A2 bleomicina B2 peplomicina
Antraciclinas:	daunorrubicina Doxorrubicina (adriamicina) idarrubicina epirrubicina
Retinoides/Deltoides	
	pirarubicina zorubicina mtoxantrona

Inhibidores de MDR:	verapamilo
Inhibidores de ATPasa Ca <sup>2+</sup> :	tapsigargina

4.8.4 TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES

- 5 Los Conjugados a modo de Ejemplo son útiles para eliminar o inhibir la replicación de una célula que produce una enfermedad autoinmune o para tratar una enfermedad autoinmune. Los Conjugados a modo de Ejemplo se pueden usar en consecuencia en diversos entornos para el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un paciente. Los Conjugados Fármaco-Conector-Ligando se pueden usar para administrar un Fármaco a una célula diana. Sin quedar ligado a teoría alguna, el Conjugado de Fármaco-Conector-Ligando puede asociarse con un antígeno en la superficie de una célula diana, y el Conjugado a modo de Ejemplo se recoge a continuación dentro de una célula diana a través de endocitosis mediada por receptores. Una vez dentro de la célula, una, secuencias peptídicas específicas dentro de la unidad Conectora se escinden enzimáticamente o hidrolíticamente, dando como resultado la liberación de un Fármaco. A continuación, el Fármaco liberado es libre para migrar en el citosol e inducir actividades citotóxicas o citostáticas. En un ejemplo alternativo, el Fármaco se escinde del Conjugado a modo de Ejemplo fuera de la célula diana, y el Fármaco penetra posteriormente en la célula.
- 10
- 15 En un ejemplo, la unidad Ligando se une a un antígeno autoinmune. En un aspecto, el antígeno está en la superficie de una célula implicada en una afección autoinmune.
- 20 En otro ejemplo, la unidad Ligando se une a un antígeno autoinmune que está en la superficie de una célula.
- 25 En un ejemplo, el Ligando se une a linfocitos activados que están asociados con el estado de enfermedad autoinmune.
- En un ejemplo más, los Conjugados a modo de Ejemplo eliminan o inhiben la multiplicación de células que producen un anticuerpo autoinmune asociado con una enfermedad autoinmune en particular.
- 30 Los tipos de enfermedades autoinmunes en particular que se pueden tratar con los Conjugados a modo de Ejemplo incluyen, pero no se limitan a, trastornos relacionados con linfocitos Th2 (*por ejemplo*, dermatitis atópica, asma atópica, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica, y enfermedad de injerto frente a huésped); trastornos relacionados con linfocitos Th1 (*por ejemplo*, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjögren, tiroiditis de Hashimoto, Enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, y tuberculosis); trastornos relacionados con linfocitos B activados (*por ejemplo*, lupus sistémico eritematoso, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide, y diabetes de tipo I); y las que se desvelan en la Tabla 5.

TABLA 5

- Hepatitis Activa Crónica
- Enfermedad de Addison
- Alveolitis Alérgica
- Reacción Alérgica
- Rinitis Alérgica
- Síndrome de Alport
- Anafilaxis
- Espondilitis Anquilosante
- Síndrome antifosfolipídico
- Artritis
- Ascariasis
- Aspergilosis
- Alergia Atópica
- Dermatitis Atrópica
- Rinitis Atrópica
- Enfermedad de Behcet
- Pulmón de Bird-Fancier

Asma Bronquial  
Síndrome de Caplan  
Cardiomiopatía  
Enfermedad Celíaca  
Enfermedad de Chagas  
Glomerulonefritis Crónica  
Síndrome de Cogan  
Enfermedad de Aglutinina Fría  
Infección por Rubéola Congénita  
Síndrome de CREST  
Enfermedad de Crohn  
Crioglobulinemia  
Síndrome de Cushing  
Dermatomiositis  
Lupus Discoide  
Síndrome de Dressler  
Síndrome de Eaton-Lambert  
Infección por Ecovirus  
Encefalomielitis  
Oftalmopatía Endocrina  
Infección por Virus Epstein-Barr  
Vómitos Equinos  
Eritematosis  
Síndrome de Evan  
Síndrome de Felty  
Fibromialgia  
Ciclitis de Fuch  
Atrofia Gástrica  
Alergia Gastrointestinal  
Arteritis de Células Gigantes  
Glomerulonefritis  
Síndrome de Goodpasture  
Enfermedad de Injerto frente a Huésped  
Enfermedad de Graves  
Enfermedad de Guillain-Barre  
Tiroiditis de Hashimoto  
Anemia Hemolítica  
Púrpura de Henoch-Schonlein  
Atrofia Adrenal Idiopática  
Fibritis Pulmonar Idiopática  
Nefropatía de IgA  
Enfermedades Intestinales Inflamatorias

Diabetes Mellitus dependiente de Insulina  
Artritis Juvenil  
Diabetes Mellitus Juvenil (Tipo I)  
Síndrome de Lambert-Eaton  
Laminitis  
Liquen Plano  
Hepatitis Lupoides  
Lupus  
Linfopenia  
Enfermedad de Meniere  
Enfermedad de Tejido Conectivo Mixto  
Esclerosis Múltiple  
Miastenia Gravis  
Anemia Perniciosa  
Síndromes Poliglandulares  
Demencia Presenil  
Agammaglobulinemia Primaria  
Cirrosis Biliar Primaria  
Psoriasis  
Artritis Psoriática  
Fenómeno de Raynauds  
Aborto Recurrente  
Síndrome de Reiter  
Fiebre Reumática  
Artritis Reumatoide  
Síndrome de Sampter  
esquistosomiasis  
Síndrome de Schmidt  
Esclerodermia  
Síndrome de Shulman  
Síndrome de Sjorgen  
Síndrome de Stiff-Man  
Oftalmia Simpática  
Lupus Sistémico Eritematoso  
Arteritis de Takayasu  
Arteritis Temporal  
Tiroiditis  
Trombocitopenia  
Tirotoxicosis  
Necrólisis Epidérmica Tóxica  
Resistencia a Insulina de Tipo B  
Diabetes Mellitus de Tipo I

Colitis Ulcerosa  
 Uveítis  
 Vitílico  
 Macroglobulemia de Waldenstrom  
 Granulomatosis de Wegener

#### 4.8.5 TERAPIA CON MÚLTIPLES FÁRMACOS DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES

- 5 Además, se desvelan métodos para tratar una enfermedad autoinmune que incluyen administrar a un paciente con necesidad del mismo una cantidad eficaz de un Conjugado a modo de Ejemplo y otro agente terapéutico conocido para el tratamiento de una enfermedad autoinmune. En un ejemplo, the anti-enfermedad autoinmune incluye, pero no se limita a, los agentes que se enumeran en la Tabla 6.

Tabla 6

ciclosporina  
 ciclosporina A  
 micofenilato mofetilo  
 sirolimus  
 tacrolimus  
 enanercept  
 prednisona  
 azatioprina  
 metotrexato ciclofosfamida  
 prednisona  
 ácido aminocaproico  
 cloroquina  
 hidroxicloroquina  
 hidrocortisona  
 dexametasona  
 clorambucilo  
 DHEA  
 danazol  
 bromocriptina  
 meloxicam  
 infliximab

10 **4.8.6 TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

- 15 Los Conjugados a modo de Ejemplo son útiles para eliminar o inhibir la multiplicación de una célula que produce una enfermedad infecciosa o para tratar una enfermedad infecciosa. Los Conjugados a modo de Ejemplo se pueden usar en consecuencia en diversos entornos para el tratamiento de una enfermedad infecciosa en un paciente. Los Conjugados Fármaco-Conector-Ligando se pueden usar para administrar un Fármaco a una célula diana. En un ejemplo, la unidad Ligando se une a la célula de la enfermedad infecciosa.

- 20 En un ejemplo, los Conjugados eliminan o inhiben la multiplicación de células que producen una enfermedad infecciosa en particular.

Los tipos de enfermedades infecciosas en particular que se pueden tratar con los Conjugados a modo de Ejemplo incluyen, pero no se limitan a, las que se desvelan en la Tabla 7.

TABLA 7

Enfermedades Bacterianas:

Diftheria  
Pertussis  
Bacteremia Oculta  
Infección del Tracto Urinario  
Gastroenteritis  
Celulitis  
Epiglotitis  
Traqueitis  
Hipertrofia Adenoide  
Abceso Retrofaríngeo  
Impétigo  
Ectima  
Neumonía  
Endocarditis  
Artritis Séptica  
Pneumococos  
Peritonitis  
Bacteremia  
Meningitis  
Meningitis Purulenta Aguda  
Uretritis  
Cervicitis  
Proctitis  
Faringitis  
Salpingitis  
Epididimitis  
Gonorrea  
Sífilis  
Listeriosis  
Ántrax  
Nocardiosis  
Salmonella  
Fiebre tifoidea  
Disentería  
Conjuntivitis  
Sinusitis  
Brucelosis  
Tularemia  
Cólera  
Plaga Bubónica  
Tétano

Enfermedades Bacterianas:

- Enteritis Necrotizante
- Actinomicosis
- Infecciones Anaerobias Mixtas
- Sífilis
- Fiebre Recurrente
- Leptospirosis
- Enfermedad de Lyme
- Fiebre por Mordedura de Rata
- Tuberculosis
- Linfadenitis
- Lepra
- Clamidia
- Neumonía por Clamidia
- Tracoma
- Conjuntivitis por Inclusión

Enfermedades Fúngicas Sistémicas:

- Histoplamosis
- Coccidioidomicosis
- Blastomicosis
- Esporotricosis
- Criptococosis
- Candidiasis Sistémica
- Aspergilosis
- Mucormicosis
- Micotoma
- Cromomicosis

Enfermedades por Rickettsia:

- Tifus
- Fiebre Maculada de las Montañas Rocosas
- Ehrlichiosis
- Rickettsiosis Oriental Transmitida por Garrapatas
- Rickettsiosis pustulosa
- Fiebre Q
- Bartonelosis

Enfermedades Parasitarias:

- Malaria

Enfermedades por Rickettsia:

Babesiosis  
Tripanosomiasis Africana  
Enfermedad de Chagas  
Leishmaniasis  
Fiebre Dum-Dum  
Toxoplasmosis  
Meningoencefalitis  
Queratitis  
Entamebiasis  
Giardiasis  
Criptosporidiosis  
Isosporiasis  
Ciclosporiasis  
Microsporidiosis  
Ascariasis  
Infección por Tricocéfalos  
Infección por Anquilostomas  
Infección por Lombrices  
Larva Migrans Ocular  
Triquinosis  
Enfermedad del Gusano de Guinea  
Filariasis Linfática  
Loiasis  
Oncocercosis  
Infección Canina del Gusano del corazón  
Esquistosomiasis  
Urticaria del Nadador  
Trematodo Oriental de Pulmón  
Trematodo Oriental de Hígado  
Fascioliasis  
Fasciolopsiasis  
Opistorquiasis  
Infecciones por Tenia  
Enfermedad Hidatídica  
Enfermedad Hidatídica Alveolar

Enfermedades Víricas:

Sarampión  
Panencefalitis esclerosante subaguda  
Resfriado Común  
Paperas  
Rubeola

Enfermedades Víricas:

Roseola  
Quinta Enfermedad  
Varicela  
Infección por el virus sincitial respiratorio  
Crup  
Bronquiolitis  
Mononucleosis infecciosa  
Poliomielitis  
Herpangina  
Enfermedad de manos, pies y boca  
Enfermedad de Bornholm  
Herpes Genital  
Verrugas Genitales  
Meningitis Aséptica  
Miocarditis  
Pericarditis  
Gastroenteritis  
Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)  
Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)  
Síndrome de Reye  
Síndrome de Kawasaki  
Gripe  
Bronquitis  
Neumonía Virical del "Caminante"  
Enfermedad Respiratoria Febril Aguda  
Fiebre faringoconjuntiva aguda  
Queratoconjuntivitis Epidémica  
Virus del Herpes Simplex 1 (VHS-1)  
Virus del Herpes Simplex 2 (VHS-2)  
Herpes  
Enfermedad Citomegálica de Inclusión  
Rabia  
Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva  
Kuru  
Insomnio Familiar Fatal  
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob  
Enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker  
Paraparesis Espástica Tropical  
Encefalitis Equina Occidental  
Encefalitis de California  
Encefalitis de St. Louis

Enfermedades Víricas:

Fiebre Amarilla  
Dengue  
Coriomeningitis Linfocítica  
Fiebre de Lassa  
Fiebre Hemorrágica  
Síndrome Pulmonar por Hantvirus  
Infecciones por el Virus de Marburg  
Infecciones por el Virus del Ébola  
Viruela

4.8.7 TERAPIA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS CON MÚLTIPLES FÁRMACOS

- 5 Se desvelan métodos para tratar una enfermedad infecciosa que incluyen administrar a un paciente con necesidad del mismo un Conjunto a modo de Ejemplo y otro agente terapéutico que es un agente anti-enfermedad infecciosa. En un ejemplo, el agente anti-enfermedad infecciosa es, pero no se limitan a, los agentes que se enumeran en la Tabla 8.

TABLA 8

Antibióticos de β-Lactama:  
Penicilina G  
Penicilina V  
Cloxacilina  
Dicloxacilina  
Meticilina  
Nafcilina  
Oxacilina  
Ampicilina  
Amoxicilina  
Bacampicilina  
Azlocilina  
Carbenicilina  
Mezlocilina  
Piperacilina

Aminoglicósidos:

Amicacina  
Gentamicina  
Kanamicina  
Neomicina  
Netilmicina  
Streptomicina  
Tobramicina

Macrólidos:

Azitromicina  
Clarithromicina  
Eritromicina  
Lincomicina  
Clindamicina

# ES 2 605 443 T3

## Tetraciclinas:

Demecloricina  
Doxiciclina  
Minociclina  
Oxitetraciclina  
Tetraciclina

## Quinolonas:

Cinoxacina  
Ácido Nalidíxico

## Fluoroquinolonas:

Ciprofloxacina  
Enoxacina  
Grepafloxacina  
Levofloxacina  
Lomefloxacina  
Norfloxacina  
Ofloxacina  
Sparfloxacina  
Trovafloxicina

## Polipéptidos:

Bacitracina  
Colistina  
Polimixina B

## Sulfonamidas:

Sulfisoxazol  
Sulfametoxazol  
Sulfadiazina  
Sulfametizol  
Sulfacetamida

## Diversos Agentes Antibacterianos:

Trimetoprim  
Sulfametazol  
Cloramfenicol  
Vancomicina  
Metronidazol  
Quinupristina  
Dalfopristina  
Rifampina  
Espectinomicina  
Nitrofurantoína

## Agentes Antivirales:

### Agentes Antivirales Generales:

Iodoxuradina  
Vidarabina

Trifluridina  
 Aciclovir  
 Famciclovir  
 Penciclovir  
 Valaciclovir  
 Ganciclovir  
 Foscarnet  
 Ribavirina  
 Amantadina  
 Rimantadina  
 Cidofovir  
 Oligonucleótidos Antisentido  
 Inmunoglobulinas  
 Interferones

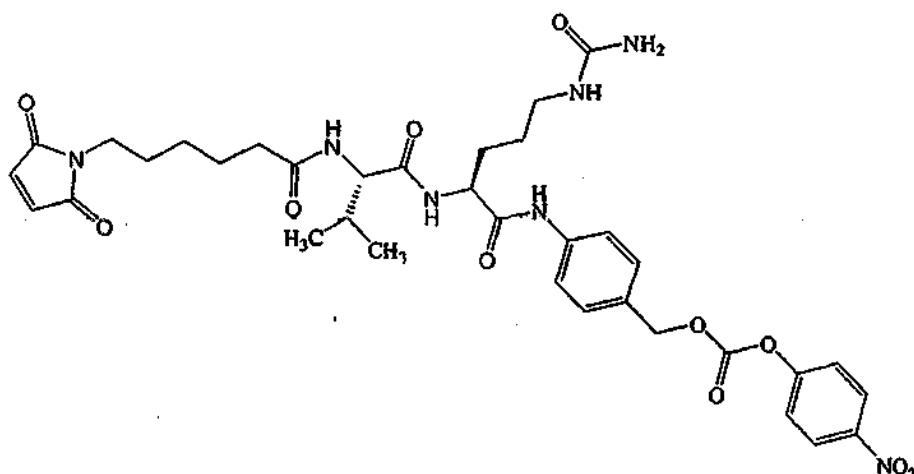
## Fármacos para infección por VIH

Tenofovir  
 Emtricitabina  
 Zidovudina  
 Didanosina  
 Zalcitabina  
 Estavudina  
 Lamivudina  
 Nevirapina  
 Delavirdina  
 Saquinavir  
 Ritonavir  
 Indinavir  
 Nelfinavir

**5. Ejemplos**

## Ejemplo 1 - Preparación del compuesto AB

5

**AB**

Fmoc-val-cit-PAB-OH (14.61 g, 24.3 mmol, 1.0 equiv., Patente de Estados Unidos Nº 6214345 de Firestone et al.) se diluyó con DMF (120 ml, 0,2 M) y a esta solución se añadió a dietilamina (60 ml). La reacción se controló por HPLC y se encontró que estaba completa en 2 h. La mezcla de reacción se concentró y el resto resultante se precipitó

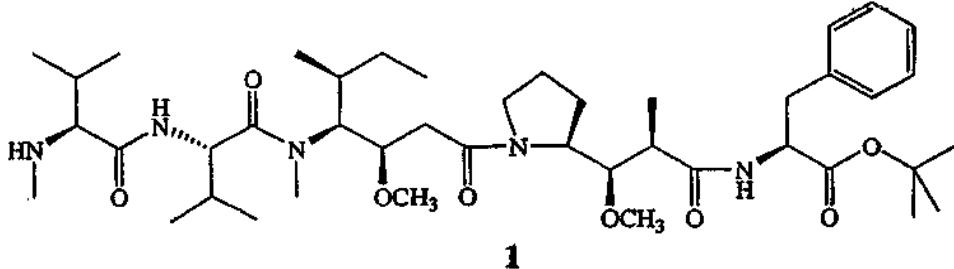
10

usando acetato de etilo (aprox. 100 ml) con sonicación durante 10 min. Se añadió éter (200 ml) y el precipitado se sonicó adicionalmente durante 5 min. La solución se dejó en reposo durante 30 min. sin agitación y a continuación se filtró y se secó a alto vacío para proporcionar Val-cit-PAB-OH, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento: 8,84 g (96 %). Val-cit-PAB-OH (8,0 g, 21 mmol) se diluyó con DMF (110 ml) y la solución resultante se trató con MC-OSu (Willner *et al.*, (1993) Bioconjugate Chem. 4: 521; 6,5 g, 21 mmol, 1,0 equiv.). La reacción era completa de acuerdo con HPLC después de 2 h. La mezcla de reacción se concentró y el aceite resultante se precipitó usando acetato de etilo (50 ml). Después de sonicar durante 15 min, se añadió éter (400 ml) y la mezcla se sonicó adicionalmente hasta que todas las partículas grandes se separaron. La solución se filtró a continuación y el sólido se secó para proporcionar un sólido intermedio de color blanquecino. Rendimiento: 11,63 g (96 %); ES-MS *m/z* 757,9 [M-H]<sup>+</sup>

Fmoc-val-cit-PAB-OH (14,61 g, 24,3 mmol, 1,0 equiv., Patente de Estados Unidos Nº 6214345 de Firestone *et al.*) se diluyó con DMF (120 ml, 0,2 M) y a esta solución se añadió a dietilamina (60 ml). La reacción se controló por HPLC y se encontró que estaba completa en 2 h. La mezcla de reacción se concentró y el resto resultante se precipitó usando acetato de etilo (aprox. 100 ml) con sonicación durante 10 min. Se añadió éter (200 ml) y el precipitado se sonicó adicionalmente durante 5 min. La solución se dejó en reposo durante 30 min. sin agitación y a continuación se filtró y se secó a alto vacío para proporcionar Val-cit-PAB-OH, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento: 8,84 g (96 %). Val-cit-PAB-OH (8,0 g, 21 mmol) se diluyó con DMF (110 ml) y la solución resultante se trató con MC-OSu (Willner *et al.*, (1993) Bioconjugate Chem. 4: 521; 6,5 g, 21 mmol, 1,0 equiv.). La reacción era completa de acuerdo con HPLC después de 2 h. La mezcla de reacción se concentró y el aceite resultante se precipitó usando acetato de etilo (50 ml). Después de sonicar durante 15 min, se añadió éter (400 ml) y la mezcla se sonicó adicionalmente hasta que todas las partículas grandes se separaron. La solución se filtró a continuación y el sólido se secó para proporcionar un sólido intermedio de color blanquecino. Rendimiento: 11,63 g (96 %); ES-MS *m/z* 757,9 [M-H]<sup>+</sup>.

El sólido intermedio de color blanquecino (8,0 g, 14,0 mmol) se diluyó con DMF (120 ml, 0,12 M) y a la solución resultante se añadió bis(4-nitrofenil)carbonato (8,5 g, 28,0 mmol, 2,0 equiv.) y DIEA (3,66 ml, 21,0 mmol, 1,5 equiv.). La reacción se completó en 1 h de acuerdo con HPLC. La mezcla de reacción se concentró para proporcionar un aceite que se precipitó con EtOAc, y a continuación se trituró con EtOAc (aprox. 25 ml). El soluto se precipitó adicionalmente con éter (aprox. 200 ml) y se trituró durante 15 min. El sólido se filtró y se secó a alto vacío para proporcionar el Compuesto AB que era puro en un 93 % de acuerdo con HPLC y se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento: 9,7 g (94 %).

#### Ejemplo 2 - Preparación del compuesto 1



Sal de HCl del éster t-butílico de fenilalanina (868 mg, 3 mmol), *N*-Boc-Dolaproína (668 mg, 1 equiv.), DEPC (820  $\mu$ l, 1,5 equiv.), y DIEA (1,2 ml) se diluyeron con díclorometano (3 ml). Después de 2 horas (h) a temperatura ambiente (aproximadamente 28 grados Celsius), la mezcla de reacción se diluyó con díclorometano (20 ml), se lavó sucesivamente con NaHCO<sub>3</sub> acuoso (ac.) saturado (2 x 10 ml), NaCl ac. saturado (2 x 10 ml). La fase orgánica se separó y se concentró. El resto resultante se volvió suspender en acetato de etilo y se purificó por cromatografía ultrarrápida en acetato de etilo. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el dipéptido en forma de un sólido de color blanco: 684 mg (46 %). ES-MS *m/z* 491,3 [M+H]<sup>+</sup>.

Para escisión selectiva de Boc en presencia de éster de t-butilo, el dipéptido anterior (500 mg, 1,28 mmol) se diluyó con dioxano (2 ml). Se añadió HCl 4 M/dioxano (960  $\mu$ l, 3 equiv.), y la mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Se observó desprotección de Boc casi completa por RP-HPLC con una cantidad mínima de escisión del éster de t-butilo. La mezcla se enfrió en un baño de hielo, y se añadió trietilamina (500  $\mu$ l).

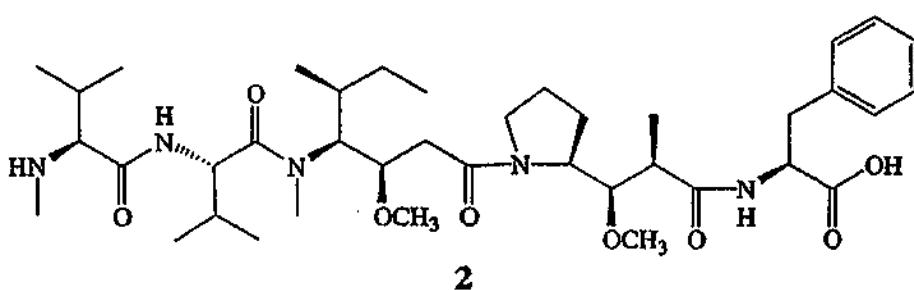
Después de 10 min, la mezcla se retiró del baño de enfriamiento, se diluyó con díclorometano (20 ml), se lavó sucesivamente con NaHCO<sub>3</sub> ac. saturado (2 x 10 ml), NaCl ac. saturado (2 x 10 ml). La fase orgánica se concentró para dar una espuma de color amarillo: 287 mg (57 %). El compuesto intermedio se usó sin purificación adicional.

El tripéptido Fmoc-Meval-val-dil-O-t-Bu (preparado tal como se describe en el documento WO 02/088172, titulado "Pentapeptide Compounds and Uses Related Thereto"; 0,73 mmol) se trató con TFA (3 ml), díclorometano (3 ml) durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a sequedad, el resto se co-evaporó con tolueno (3 x 20

ml), se secó al vacío durante una noche. El resto se diluyó con diclorometano (5 ml) y se añadió dipéptido desprotegido (287 mg, 0,73 mmol), seguido de DIEA (550 µl, 4 equiv.), DEPC (201 µl, 1,1 equiv.). Después de 2 h a temperatura ambiente la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (50 ml), se lavó sucesivamente con ácido cítrico ac. al 10 % (2 x 20 ml), NaHCO<sub>3</sub> ac. saturado (2 x 10 ml), NaCl ac. saturado (10 ml). La fase orgánica se separó y se concentró. El resto resultante se volvió a suspender en acetato de etilo y se purificó por cromatografía ultrarrápida en acetato de etilo. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar Fmoc-Mevel-val-dil-dap-phe-O-*t*-Bu en forma de un sólido de color blanco: 533 mg (71 %). R<sub>f</sub> 0,4 (EtOAc). ES-MS *m/z* 1010,6 [M+H]<sup>+</sup>.

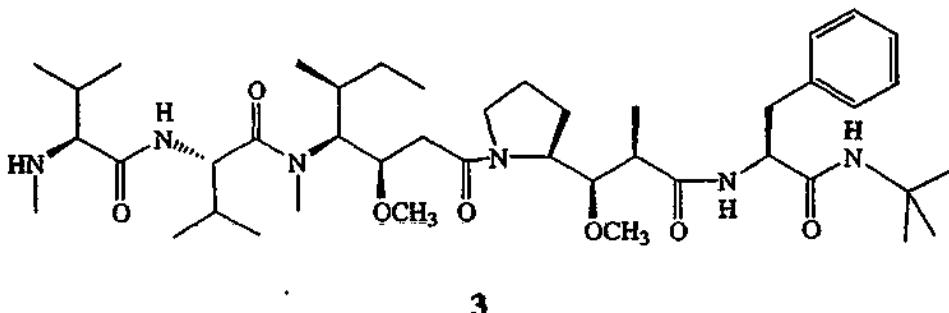
10 El producto (200 mg, 0,2 mmol) se diluyó con diclorometano (3 ml), dietilamina (1 ml). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Los disolventes se retiraron para proporcionar un aceite que se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice en un gradiente de la etapa de MeOH al 0-10 % en diclorometano para proporcionar el Compuesto 1 en forma de un sólido de color blanco: 137 mg (87 %). R<sub>f</sub> 0,3 (MeOWCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10 %). ES-MS *m/z* 788,6 [M+H]<sup>+</sup>.

15 **Ejemplo 3 - Preparación del compuesto 2**



20 El compuesto 2 se preparó a partir del compuesto 1 (30 mg, 0,038 mmol) por tratamiento con HCl 4 M/dioxano (4 ml) durante 7 h a temperatura ambiente. El disolvente se retiró, y el resto se secó al vacío durante una noche para proporcionar el Compuesto 2 en forma de un sólido higroscópico de color blanco: 35 mg (120 % calculado para sal de HCl). ES-MS *m/z* 732,56 [M+H]<sup>+</sup>

25 **Ejemplo 4 - Preparación del compuesto 3**



30 Fmoc-Mevel-val-dil-dap-phe-O-*t*-Bu (Ejemplo 2, 50 mg) se trató con HCl 4 M/dioxano (4 ml) durante 16 h a temperatura ambiente. El disolvente se retiró, y el resto se secó al vacío durante una noche para dar 50 mg de un sólido intermedio higroscópico de color blanco.

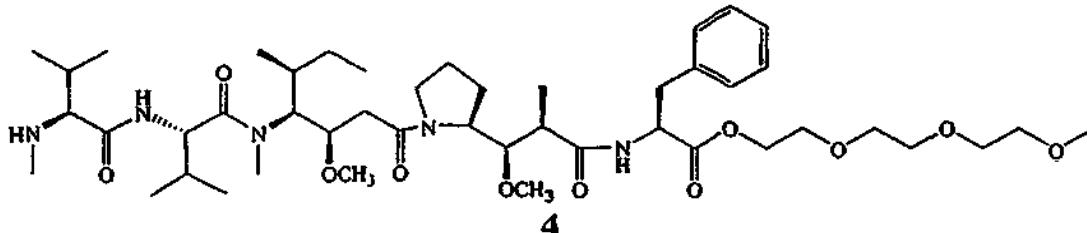
El sólido intermedio de color blanco (20 mg, 0,02 mmol) se diluyó con diclorometano (1 ml); se añadió DEPC (5 µl, 0,03 mmol, 1,5 equiv.) seguido de DIEA (11 µl, 0,06 mmol, 3 equiv.), y *t*-butilamina (3,2 µl, 0,03 mmol, 1,5 equiv.). 35 Después de 2 h a temperatura ambiente, se encontró que la reacción era completa por RP-HPLC. Se añadió más DEPC (10 µl) y *t*-butilamina (5 µl) y la reacción se agitó durante un periodo adicional de 4 h. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (15 ml), se lavó sucesivamente con agua (5 ml), HCl ac. 0,1 M (10 ml), NaCl ac. saturado (10 ml). La fase orgánica se separó y se concentró. El resto resultante se diluyó con diclorometano y se purificó por cromatografía ultrarrápida en un gradiente de etapa de MeOH al 0-5 % en diclorometano. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el compuesto intermedio protegido con Fmoc en forma de un sólido de color blanco: 7,3 mg (36 %). R<sub>f</sub> 0,75 (Me-OH al 10 % /CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

40 El compuesto intermedio protegido con Fmoc se diluyó con diclorometano (0,5 ml) y se trató con dietilamina (0,5 ml) durante 3 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a sequedad. El producto se aisló por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice en un gradiente de etapa de MeOH al 0-10 % en diclorometano para

proporcionar el Compuesto 3 en forma de un sólido de color blanco: 4 mg (70 %).  $R_f$  0.2 (MeOH al 10 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). ES-MS *m/z* 787 [M+H]<sup>+</sup>, 809 [M+Na]<sup>+</sup>.

**Ejemplo 5 - Preparación del compuesto 4**

5



Boc-L-Fenilalanina (265 mg, 1 mmol, 1 equiv.) y éter monometílico de trietilenglicol (164  $\mu$ l, 1 mmol, 1 equiv.) se diluyeron con diclorometano (5 ml). A continuación, se añadió DCC (412 mg, 2 mmol, 2 equiv.), seguido de DMAP (10 mg). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El precipitado se retiró por filtración. El disolvente se retiró al vacío, el resto se diluyó con acetato de etilo, y se purificó por gel de sílice cromatografía ultrarrápida en acetato de etilo. Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron, y se secaron al vacío para dar un sólido de color blanco: 377 mg (91 %).  $R_f$  0,5 (EtOAc). ES-MS *m/z* 434 [M+Na]<sup>+</sup>.

15

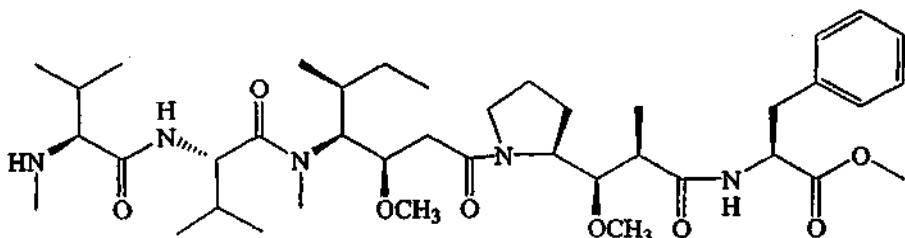
La retirada del grupo protector Boc se realizó por tratamiento del material anterior en dioxano (10 ml) con HCl 4 M/dioxano (6 ml) durante 6 h a temperatura ambiente. El disolvente se retiró al vacío, el resto se secó al vacío para dar un sólido de color blanco.

20 La sal de HCl del éster del éter monometílico de Fenilalanina-trietilenglicol (236 mg, 0,458 mmol, 1 equiv.) y N-Boc-Dolaproína (158 mg, 0,55 mmol, 1,2 equiv.) se diluyeron con diclorometano (3 ml). DEPC (125  $\mu$ l, 1,5 equiv.) y se añadió a la mezcla seguido de DIEA (250  $\mu$ l, 3 equiv.). Después de 2 h a temperatura ambiente la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (30 ml), se lavó sucesivamente con NaHCO<sub>3</sub> ac. saturado (2 x 10 ml), ácido cítrico ac. al 10 % (2 x 10 ml), NaCl ac. saturado (10 ml). La fase orgánica se separó y se concentró. El resto resultante se volvió suspender en acetato de etilo y se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice en acetato de etilo. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar una espuma intermedia de color blanco: 131 mg (50 %).  $R_f$  0,25 (EtOAc). ES-MS *m/z* 581,3 [M+H]<sup>+</sup>.

30 La desprotección de Boc se realizó en diclorometano (2 ml), TFA (0,5 ml) a temperatura ambiente durante 2 h. El disolvente se retiró al vacío, y el resto co-evaporó con tolueno (3 x 25 ml), después se secó al vacío para dar 138 mg de sal de TFA de dipéptido.

35 Fmoc-Meval-val-dil-OH (Ejemplo 2, 147 mg, 0,23 mmol, 1 equiv.), y sal de TFA de dipéptido (138 mg) se diluyeron con diclorometano (2 ml). A la mezcla se añadió DEPC (63  $\mu$ l, 1,5 equiv.), seguido de DIEA (160  $\mu$ l, 4 equiv.). Despues de 2 h a temperatura ambiente la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (30 ml), se lavó sucesivamente con ácido cítrico ac. al 10 % (2 x 20 ml), NaCl ac. saturado (20 ml). La fase orgánica se separó y se concentró. El resto resultante se volvió a suspender en diclorometano y se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice en un gradiente de etapa de MeOH al 0-5 % en diclorometano. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar una espuma de color blanco: 205 mg (81 %).  $R_f$  0,4 (MeOH al 10 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). ES-MS *m/z* 1100,6 [M+H]<sup>+</sup>, 1122,4 [M+Na]<sup>+</sup>.

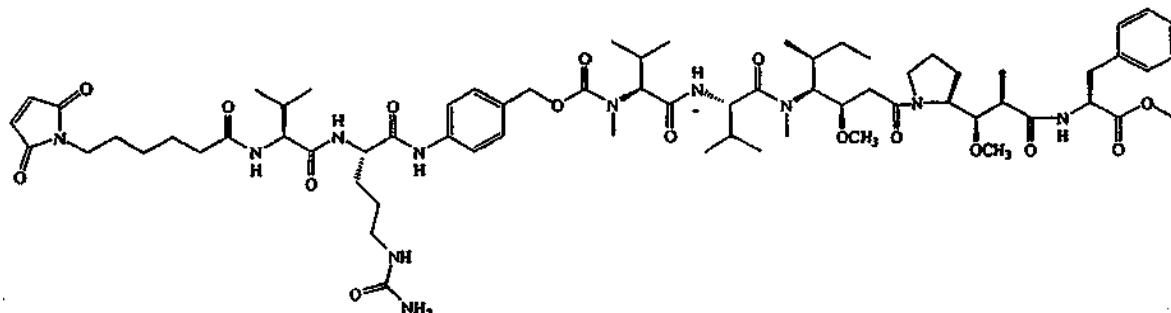
40 El grupo protector Fmoc se retiró por tratamiento con dietilamina (2 ml) en diclorometano (6 ml). Despues de 6 h a temperatura ambiente, el disolvente se retiró al vacío, el producto se aisló por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice en un gradiente de etapa de MeOH al 0-10 % en diclorometano. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron. Despues de la evaporación de diclorometano/hexano, 1:1, se obtuvo el Compuesto 4 en forma de una espuma de color blanco: 133 mg (80 %).  $R_f$  0,15 (MeOH al 10 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). ES-MS *m/z* 878,6 [M+H]<sup>+</sup>.

**Ejemplo 6 - Preparación del compuesto 5****5**

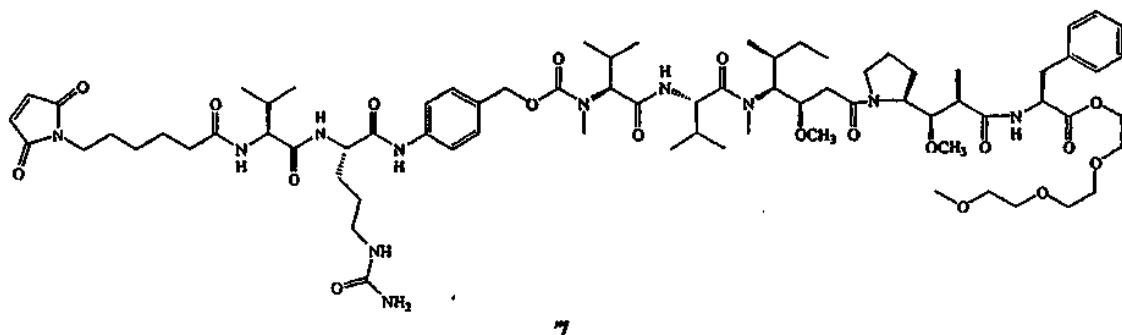
- 5 Fmoc-MeVal-val-dil-OH (Ejemplo 2, 0,50 g, 0,78 mmol) y dap-phe-OMe-HCl (0,3 g, 0,78 mmol, preparado de acuerdo con Pettit, G.R., et al. Anti-Cancer Drug Design 1998, 13, 243-277) se disolvieron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) seguido de la adición de diisopropiletilamina (0,30 ml, 1,71 mmol, 2,2 equiv.). Se añadió DEPC (0,20 ml, 1,17, 1,5 equiv.) y los contenidos se mantuvieron en Ar. La reacción era completa de acuerdo con HPLC en 1 h. La mezcla se concentró hasta un aceite y se purificó por cromatografía en SiO<sub>2</sub> (columna de 300 x 25 mm) y se eluyó con EtOAc al 100 %. El producto se aisló en forma de un sólido espumoso de color blanco. Rendimiento: 0,65 g (87 %). ES-MS *m/z* 968,35 [M+H]<sup>+</sup>, 991,34 [M+Na]<sup>+</sup>;  $\lambda_{\text{máx}}$  de UV 215, 265 nm.

10 El péptido protegido con Fmoc (0,14 g, 0,14 mmol) en cloruro de metileno (5 ml) se trató con dietilamina (2 ml) y los contenidos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción, completa por HPLC, se concentró hasta un aceite, se recogió en 2 ml de DMSO y se inyectó en una HPLC preparativa (columna C<sub>12</sub>-RP, 5  $\mu$ , 100  $\text{\AA}$ , gradiente lineal de MeCN en agua (que contenía TFA al 0,1 %) del 10 al 100 % en 40 min seguido de 20 min al 100 %, a un caudal de 25 ml/min). las fracciones que contenían el producto se evaporaron para proporcionar un polvo de color blanco para la sal de trifluoroacetato. Rendimiento: 0,126 g (98 %). *R<sub>f</sub>* 0,28 (EtOAc al 100 %); ES-MS *m/z* 746,59 [M+H]<sup>+</sup>, 768,51 [M+Na]<sup>+</sup>;  $\lambda_{\text{máx}}$  de UV 215 nm.

20

**Ejemplo 7 - Preparación del compuesto 6****6**

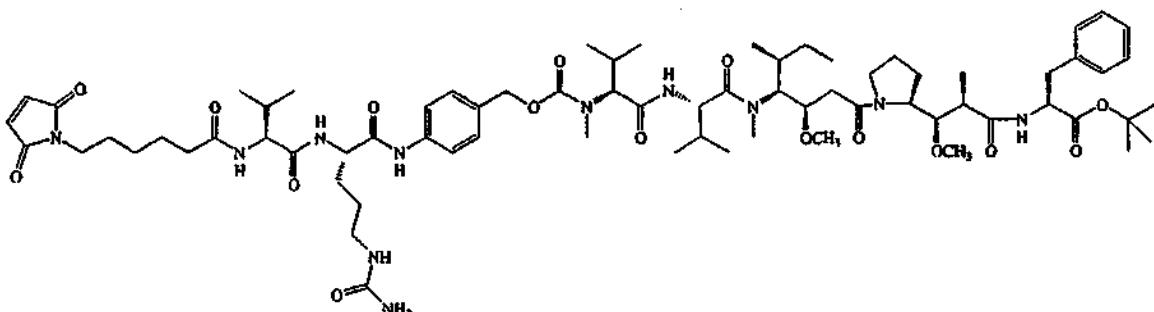
- 25 La sal de trifluoroacetato del Compuesto 5 (0,11 g, 0,13 mmol), Compuesto **AB** (0,103 g, 0,14 mmol, 1,1 equiv.) y HOBr (3,4 mg, 26  $\mu$ mol, 0,2 equiv.) se suspendieron en DMF/piridina (2 ml/0,5 ml, respectivamente). Se añadió diisopropiletilamina (22,5  $\mu$ l, 0,13 mmol, 1,0 equiv.) y la solución de color amarillo se agitó en una atmósfera de argón. Después de 3 h, se añadió una cantidad adicional de 1,0 equiv. de DIEA. 24 horas más tarde, se incluyeron 0,5 equiv. del conector activado en la mezcla de reacción. Después de 40 h totales, la reacción se completó. Los contenidos se evaporaron, se recogieron en DMSO y se inyectaron en una HPLC preparativa (columna C<sub>12</sub>-RP, 5  $\mu$ , 100  $\text{\AA}$ , gradiente lineal de MeCN en agua (que contenía TFA al 0,1 %) del 10 al 100 % en 40 min seguido de 20 min al 100 %, a un caudal de 50 ml/min). Las fracciones deseadas se evaporaron para dar el producto en forma de un aceite de color amarillo. Se añadieron cloruro de metileno (aprox. 2 ml) y éter en exceso para proporcionar el Compuesto 6 en forma de un precipitado de color blanco que se filtró y se secó. Rendimiento: 90 mg (52 %). ES-MS *m/z* 1344,32 [M+H]<sup>+</sup>, 1366,29 [M+Na]<sup>+</sup>;  $\lambda_{\text{máx}}$  de UV 215,248 nm.

**Ejemplo 8 - Preparación del compuesto 7**

- 5 El Compuesto 4 (133 mg, 0,15 mmol, 1 equiv.), Compuesto AB, (123 mg, 0,167 mmol, 1,1 equiv.), y HOBt (4 mg, 0,2 equiv.) se diluyeron con DMF (1,5 ml). Después de 2 min, se añadió piridina (5 ml) y la reacción se controló usando RP-HPLC. La reacción mostró que estaba completa en 18 h. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (20 ml), se lavó sucesivamente con ácido cítrico ac. al 10 % (2 x 10 ml), agua (10 ml), NaCl ac. saturado (10 ml). La fase orgánica se separó y se concentró. El resto resultante se volvió a suspender en diclorometano y se purificó por 10 chromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice en un gradiente de etapa de MeOH al 0-10 % en diclorometano. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el Compuesto 7 en forma de una espuma de color blanco: 46 mg (21 %). R<sub>f</sub> 0,15 (MeOH al 10 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). ES-MS m/z 1476,94 [M+H]<sup>+</sup>.

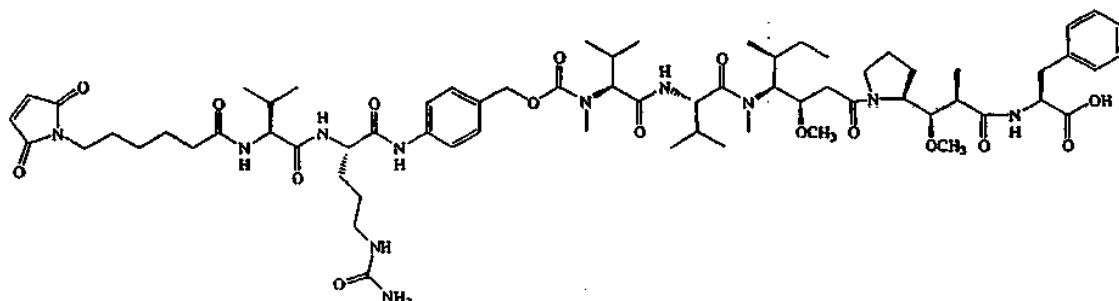
**Ejemplo 9 - Preparación del éster t-butílico de MC-Val-Cit-PAB-MMAF 8**

15



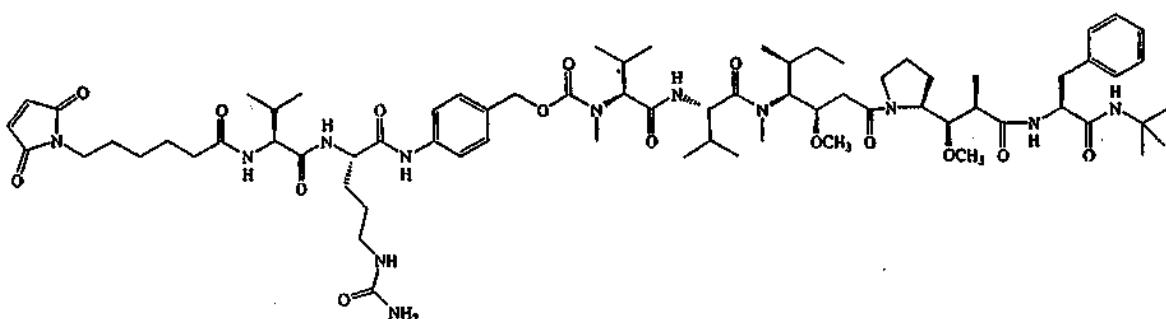
- 20 El Compuesto 1 (83 mg, 0,11 mmol), Compuesto AB (85 mg, 0,12 mmol, 1,1 equiv.), y HOBt (2,8 mg, 21 μmol, 0,2 equiv.) se recogieron en DMF seca (1,5 ml) y piridina (0,3 ml) en una atmósfera de argón. Después de 30 h, se encontró que la reacción está básicamente completa por HPLC. La mezcla se evaporó, se recogió en una cantidad mínima de DMSO y se purificó por HPLC preparativa (columna C<sub>12</sub>-RP, 5 μ, 100 Å, gradiente lineal de MeCN en agua (que contenía TFA al 0,1 %) del 10 al 100 % en 40 min seguido de 20 min al 100 %, a un caudal de 25 ml/min) para proporcionar el Compuesto 8 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 103 mg (71 %). ES-MS m/z 1387,06 [M+H]<sup>+</sup>, 1409,04 [M+Na]<sup>+</sup>; λ<sub>máx</sub> de UV 205, 248 nm.

25

**Ejemplo 10 - Preparación de MC-val-cit-PAB-MMAF 9**

5 El Compuesto 8 (45 mg, 32  $\mu$ mol) se suspendió en cloruro de metíleno (6 ml) seguido de la adición de TFA (3 ml). La solución resultante se mantuvo durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se purificó por HPLC preparativa (columna C<sub>12</sub>-RP, 5  $\mu$ , 100 Å, gradiente lineal de MeCN en agua (que contenía TFA al 0,1 %) del 10 al 100 % en 40 min seguido de 20 min al 100 %, a un caudal de 25 ml/min). Las fracciones deseadas se concentraron para proporcionar maleimidocaproil-valina-citrulina-p-hidroximetilaminobenceno-MMAF (MC-val-cit-PAB-MMAF) 9 en forma de un sólido de color blanquecino. Rendimiento: 11 mg (25 %). ES-MS *m/z* 1330,29 [M+H]<sup>+</sup>, 1352,24 [M+Na]<sup>+</sup>;  $\lambda_{\text{máx}}$  de UV 205, 248 nm.

10

**Ejemplo 11 - Preparación de MC-val-cit-PAB-MMAF terc-butil amida 10**

15 El Compuesto 3 (217 mg, 0,276 mmol, 1,0 equiv.), Compuesto AB (204 mg, 0,276 mmol, 1,0 equiv.), y HOBr (11 mg, 0,0828 mmol, 0,3 equiv.) se diluyeron con piridina/DMF (6 ml). A esta mezcla se añadió DIEA (0,048 ml), y la mezcla se agitó durante aproximadamente 16 h. los compuestos orgánicos volátiles se evaporaron al vacío. El resto en bruto se purificó por Chromatotron® (cromatografía en capa fina radial) con un gradiente de etapa (metanol al 0-5-10 % en DCM) para proporcionar MC-val-cit-PAB-MMAF terc-butil amida 10. Rendimiento: 172 mg (45 %); ES-MS *m/z* 1386,33 [M+H]<sup>+</sup>, 1408,36 [M+Na]<sup>+</sup>;  $\lambda_{\text{máx}}$  de UV 215, 248 nm.

**Ejemplo 12 - Preparación de AC10-MC-MMAE por conjugación de AC10 y MC-MMAE**

25 AC10, disuelto en borato sódico 500 mM y cloruro sódico 500 mM a pH 8,0 se trata con un exceso de ditiotreitol 100 mM (DTT). Después de incubación a 37 °C durante aproximadamente 30 minutos, el tampón se intercambia por elución sobre resina de Sephadex G25 y se eluyó con PBS con DTPA 1 mM. El valor de tiol/Ab se comprueba mediante la determinación de la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol por reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido disuelto en PBS se enfria en hielo.

30 El reactivo de conector de fármaco, maleimidocaproil-monometil auristatina E, es decir MC-MMAE, disuelto en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua a una concentración conocida, y se añade al anticuerpo reducido enfriado AC10 en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para inactivar la reacción y proteger cualquier grupo tiol del anticuerpo sin reaccionar. La mezcla de reacción se concentra mediante un tipo de ultrafiltración en centrífuga y AC10-MC-MMAE se purifica y se desalada por elución a través de resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2  $\mu$ m en condiciones estériles, y se congela para su almacenamiento.

**Ejemplo 13 - Preparación de AC10-MC-MMAF por conjugación de AC10 y MC-MMAF**

AC10-MC-MMAF se preparó por conjugación de AC10 y MC-MMAF siguiendo el procedimiento del Ejemplo 12.

**5 Ejemplo 14 - Preparación de AC10-MC-val-cit-PAB-MMAE por conjugación de AC10 y MC-val-cit-PAB-MMAE**

AC10-MC-val-cit-PAB-MMAE se preparó por conjugación de AC10 y MC-val-cit-PAB-MMAE siguiendo el procedimiento del Ejemplo 12.

**10 Ejemplo 15 - Preparación de AC10-MC-val-cit-PAB-MMAF por conjugación de AC10 y MC-val-cit-PAB-MMAF (9)**

AC10-MC-val-cit-PAB-MMAF se preparó por conjugación de AC10 y MC-val-cit-PAB-MMAF (9) siguiendo el procedimiento del Ejemplo 12.

**15 Ejemplo 16 – Determinación de citotoxicidad de compuestos seleccionados**

La actividad de citotoxicidad de MMAF y los Compuestos 1-5 se evaluaron en las líneas celulares OVCAR-3 positivas para Lewis Y, las líneas celulares positivas para Lewis Y de carcinoma de mama H3396, carcinoma de pulmón L2987 y carcinoma de colon LS174t se puede someter al ensayo para la citotoxicidad. Para evaluar la citotoxicidad de los Compuestos 1-5, se puede sembrar células a aproximadamente 5 – 10.000 por pocillo en 150 µl de medio de cultivo tratado a continuación con dosis graduadas de los Compuestos 1-5 por cuadruplicado al comienzo del ensayo. Los ensayos de citotoxicidad normalmente se realizan durante 96 horas después de la adición de los compuestos de ensayo. Cincuenta µl de colorante de resazurina se pueden añadir a cada pocillo durante las últimas 4 a 6 horas de la incubación para evaluar las células viables al final del cultivo. La reducción del colorante se puede determinar mediante espectrometría de fluorescencia usando las longitudes de onda de excitación y de emisión de 535 nm y 590 nm, respectivamente. Para el análisis, el alcance de la reducción con resazurina mediante las células tratadas se puede comparar con el de las células de control sin tratar.

30 Para ensayos de exposición de 1 h las células se pueden pulsar con el fármaco durante 1 h y a continuación lavar; el efecto citotóxico se puede determinar después de 96 h de incubación.

**Ejemplo 17 – cata citotoxicidad *in vitro* para compuestos seleccionados**

35 La Tabla 10 muestra el efecto citotóxico de Conjugados de los Compuestos cAC10 7-10, sometidos al ensayo tal como se describe en el Procedimiento General I en una línea celular Karpas 299 de CD30+. Se presentan los datos de dos experimentos separados. Se encontró que los conjugados cAC10 de los Compuestos 7 y 9 eran ligeramente más activos que cAC10-val-cit-MMAE.

TABLA 10

Conjugado	Cl <sub>50</sub> (ng/ml)
cAC10-val-cit-MMAE	6
cAC10-7	1,0
cAC10-8	15
cAC10-9	0,5
cAC10-10	20

40 En otros experimentos, BR96-val-cit-MMAF era al menos 250 veces más potente que el MMAF libre.

**Procedimiento General I – Determinación de citotoxicidad.** Para evaluar la citotoxicidad de los Conjugados a modo de Ejemplo 7-10, se sembraron celulasa aproximadamente 5 – 10.000 por pocillo en 150 µl de medio de cultivo y a continuación se trató con dosis graduadas de los Conjugados a modo de Ejemplo 7-10 por cuadruplicado al comienzo del ensayo. Se realizaron ensayos de citotoxicidad durante 96 horas después de la adición de los compuestos de ensayo. Cincuenta µl de colorante de resazurina se añadieron a cada pocillo durante las últimas 4 a 6 horas de la incubación para evaluar las células viables al final del cultivo. La reducción del colorante se puede determinar mediante espectrometría de fluorescencia usando las longitudes de onda de excitación y de emisión de 535 nm y 590 nm, respectivamente. Para el análisis, el alcance de la reducción con resazurina mediante las células tratadas se puede comparar con el de las células de control sin tratar.

**Ejemplo 18 – Ensayo de proliferación celular *in vitro***

La eficacia de ADC se puede medir con un ensayo de proliferación celular usando el siguiente protocolo (Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Mendoza et al. (2002) Cancer Res. 62: 5485-5488):

- 5      1. Una alícuota de 100 µl de cultivo celular que contiene aproximadamente  $10^4$  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.
- 10     2. Se prepararon pocillos de control que contenían medio y sin células.
- 15     3. Se añadió ADC a los concilios experimentales y se incubó durante 3-5 días.
- 20     4. Las placas se equilibraron a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.
- 25     5. Se añadió un volumen de Reactivo CellTiter-Glo igual al volumen del medio de cultivo celular presente en cada pocillo.
- 30     6. Los contenidos se mezclaron durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular.
- 35     7. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia.
- 40     8. La luminiscencia se registró y se indicó en gráficos como RLU = unidades relativas de luminiscencia.

**Ejemplo 19 – Aclaramiento de plasma en ratas**

La farmacocinética del aclaramiento de plasma de conjugados de anticuerpo y fármaco y anticuerpo total se estudiaron en ratas Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, 250-275 gramos cada una). Los animales se dosificaron con inyección embolo en la vena de la cola (Impulso IV). Se recogieron aproximadamente 300 µl de sangre entera a través de cánula yugular, o extracción en la cola, en recipientes con anticoagulante de litio/heparina en cada punto temporal: 0 (dosis previa), 10, y en 30 minutos; 1, 2, 4, 8, 24 y 36 horas; y 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28 días después de la dosis. El anticuerpo total se midió por ELISA - ECD/GxhuFc-HRP. El conjugado de anticuerpo y fármaco se midió por ELISA-MMAE/MMAF/ECD-Bio/SA-HRP.

**Ejemplo 20 - Aclaramiento de plasma en monos**

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

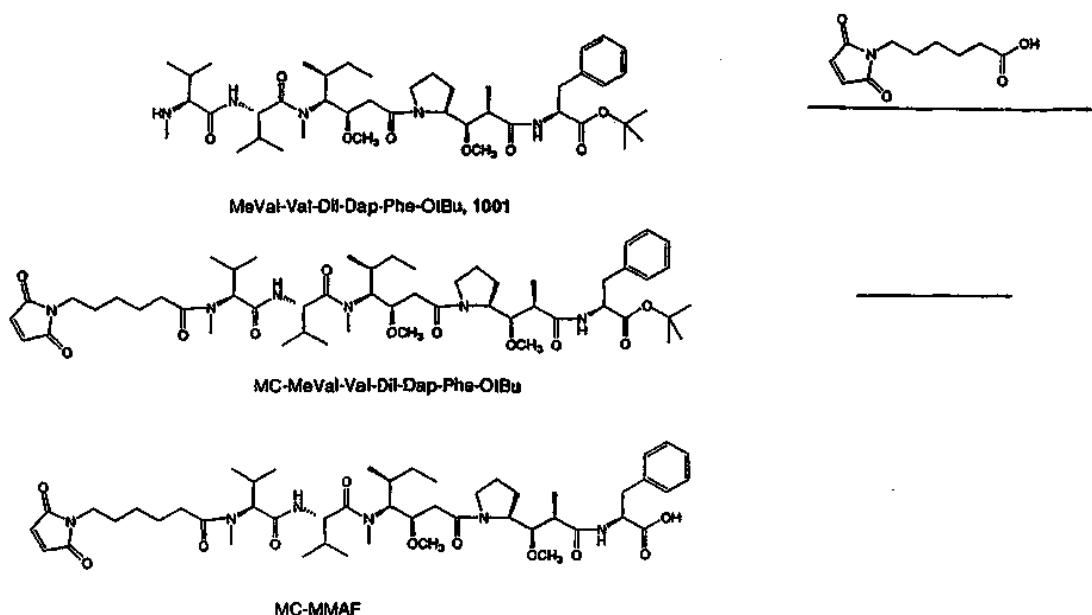
**Ejemplo 21 – Eficacia *in vivo* del volumen tumoral en ratones transgénicos con explantes**

Los animales adecuados para experimentos transgénicos se pueden obtener en fuentes comerciales convencionales tales como Taconic (Germantown, N.Y.). Muchas cepas son adecuadas, pero son preferentes los ratones hembra FVB debido a su mayor susceptibilidad a la formación de tumores. Los machos de FVB se pueden usar para apareamiento y se pueden usar sementales CD.1 vasectomizados para estimular un pseudo-embarazo. Los ratones vasectomizados se pueden obtener de cualquier proveedor comercial. Los fundadores se pueden criar con ratones FVB o con ratones heterocigotos 129/BL6 x FVB p53. Los ratones con heterocigosis en el alelo p53 se pueden usar para aumentar potencialmente la formación de tumores. Algunos tumores F1 son de cepas mixtas. Los tumores en los fundadores solamente pueden ser FVB.

Los animales que tienen tumores (alojinjerto propagado de ratones transgénicos Fo5 mmtv) se pueden tratar con una sola dosis o con múltiples dosis por inyección IV de ADC. El volumen tumoral se puede evaluar en diversos puntos temporales después de la inyección.

**Ejemplo 22 - Síntesis de MC-MMAF a través de éster t-butílico**

Síntesis 1:



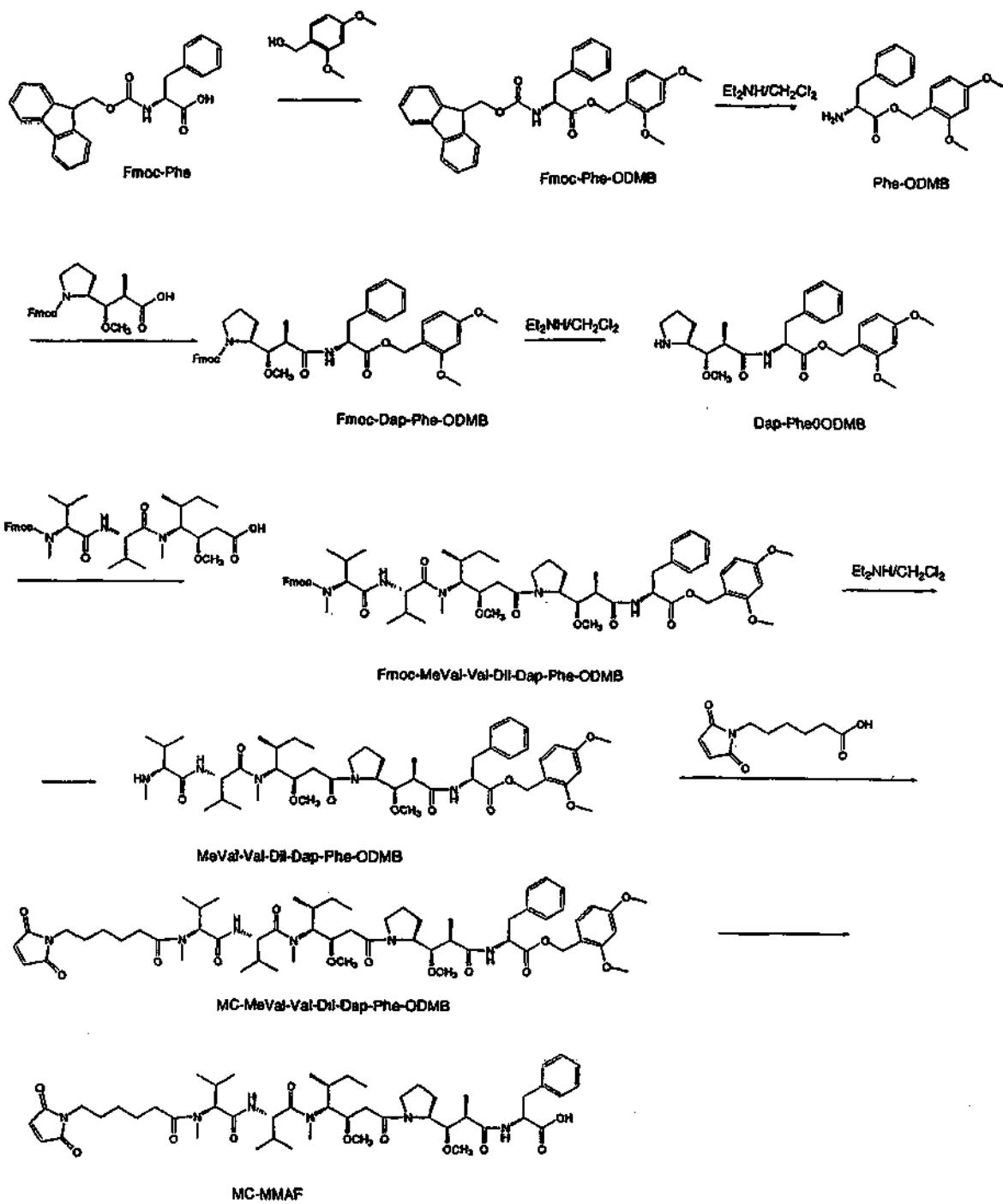
MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (compuesto 1, 128,6 mg, 0,163 mmol) se suspendió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,500 ml). Se añadieron ácido 6-maleimidocaproico (68,9 mg, 0,326 mmol) y 1,3-diisopropilcarbodiímidas (0,0505 ml, 0,326 mmol)

5 seguido de piridina (0,500 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 1,0 h. El análisis de HPLC indicó consumo completo del compuesto de partida 1. Los compuestos orgánicos volátiles se evaporaron a presión reducida. El producto se aisló por cromatografía en columna ultrarrápida, usando un gradiente de etapa de Metanol al 0 a 5 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se recuperó un total de 96 mg de MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (12) pura (rendimiento de un 60 %). ES-MS *m/z* 981,26 [M+H]<sup>+</sup>; 1003,47 [M+Na]<sup>+</sup>; 979,65 [M-H]<sup>-</sup>.

10 MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (Compuesto 12,74 mg, 0,0754 mmol) se suspendió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2,0 ml) y TFA (1 ml) a temperatura ambiente. Después de 2,5 h, el análisis de HPLC indicó consumo completo del material de partida. Los compuestos orgánicos volátiles se evaporaron a presión reducida, y el producto se aisló a través de RP-HPLC preparativa, usando una Columna Synergi Max-RP C<sub>12</sub> de 80 Å de Phenomenex (250 x 21,20 mm). Eluyente: gradiente lineal de MeCN del 10 % al 90 %/TFA al 0,05 % (ac.) durante 30 minutos, a continuación MeCN al 90 %/TFA al 0,05 % (ac.) isocrático para un periodo adicional de 20 minutos. ES-MS *m/z* 925,33 [M+H]<sup>+</sup>; 947,30 [M+Na]<sup>+</sup>; 923,45 [M-H]<sup>-</sup>.

**Ejemplo 23a - Síntesis de MC-MMAF (11) a través de éster dimetoxibencílico**

Síntesis 2:



5

**Preparación de éster Fmoc-L-Fenilalanina-2,4-dimetoxibencílico (Fmoc-Phe-ODMB)**

- Un matraz de fondo redondo de 5 l de 3 bocas, se cargó con Fmoc-L-Fenilalanina (200 g, 516 mmol de Bachem), alcohol 2,4-dimetoxibencílico (95,4 g, 567 mmol, Aldrich), y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2,0 l). Se añadió t-butil acetal de N,N-dimetilformamida (155 ml, 586 mmol, Fluka) a la suspensión resultante durante 20 min en atmósfera de  $\text{N}_2$ , que dio como resultado una solución transparente. Despues, la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche, tras lo cual el análisis de TLC (0,42, Heptano/EtOAc = 2:1) indicó que la reacción era completa. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar un aceite de color amarillo claro, que se disolvió de nuevo en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 ml) y se purificó a través de un lecho corto de gel de sílice (25 cm x 25 cm,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) para dar una

espuma incolora (250 g). Se añadió MeCN (1 l) en la espuma resultante, que disolvió totalmente el lote. A continuación se concentró a sequedad y se volvió a disolver en MeCN (1 l) y la suspensión resultante se agitó durante 1 h, se filtró y la torta de filtro se aclaró con MeCN (2 x 200 ml) para dar éster Fmoc-L-fenilalanina-2,4-dimetoxibencílico en forma de un sólido de color blanco (113,58 g, 41 %, AUC de un 95,5 % por análisis de HPLC).

5 Datos: HPLC.

#### Preparación Éster L-fenilalanina-2,4-dimetoxibencílico (Phe-ODMB)

10 Un matraz de fondo redondo de 500 ml se cargó con éster Fmoc-L-fenilalanina-2,4-dimetoxibencílico (26,00 g, 48,3 mmol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 ml) y dietilamina (75 ml, Acros). La mezcla se agitó a temperatura ambiente y la finalización se controló por HPLC. Después de 4 h, la mezcla se concentró (temperatura del baño < 30 °C). El resto se volvió a suspender en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 ml) y se concentró. Ésto se repitió una vez. Al resto se añadió MeOH (20 ml), que provocó la formación de un gel. Este resto se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 ml), se concentró y el aceite turbio se dejó vacío durante una noche. El resto se suspendió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml), a continuación se añadió tolueno (120 ml). La mezcla se concentró y el resto se dejó al vacío durante una noche.

15 Datos: HPLC, RMN 1H.

#### Preparación de Fmoc-Dolaproína (Fmoc-Dap)

20 Boc-Dolaproína (58,8 g, 0,205 mol) se suspendió en HCl 4 N en 1,4-dioxano (256 ml, 1,02 mol, Aldrich). Después de agitar durante 1,5 horas, el análisis de TLC indicó que la reacción era completa (MeOH al 10 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y la mezcla se concentró casi hasta sequedad. Se cargó 1,4-dioxano adicional (50 ml) y la mezcla se concentró a sequedad y se secó al vacío durante una noche. El sólido de color blanco resultante se disolvió en H<sub>2</sub>O (400 ml) y se transfirió a un 25 to matraz de fondo redondo, de tres bocas, de 3 l, con un agitador mecánico y sonda de temperatura. Se añadió N,N-diisopropiletilamina (214,3 ml, 1,23 mol, Acros) durante un minuto, causando una exotermia de 20,5 a 28,2 °C (interna). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió 1,4-dioxano (400 ml). Una solución de Fmoc-OSu (89,90 g, 0,267 mol, Advanced ChemTech) en 1,4-dioxano (400 ml) se añadió desde un embudo de adición durante 15 minutos, manteniendo la temperatura de reacción por debajo de 9 °C. La mezcla se dejó calentar a temperatura 30 ambiente y se agitó durante 19 horas, tras lo cual la mezcla se concentró por evaporación rotatoria hasta una suspensión acuosa (390 g). La suspensión se diluyó con H<sub>2</sub>O (750 ml) y Et<sub>2</sub>O (750 ml), provocando que se formara un precipitado de color blanco abundante. Las fases se separaron, manteniendo los sólidos con la fase orgánica. La fase acuosa se acidificó usando HCl conc. (30 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 500 ml). Los extractos combinados se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró para dar 59,25 g de un aceite de color amarillo A. El extracto de Et<sub>2</sub>O 35 se extrajo una vez con NaHCO<sub>3</sub> sat. (200 ml), manteniendo los sólidos con la fase acuosa. La suspensión acuosa se acidificó usando HCl conc. (50 ml) y se extrajo con Et<sub>2</sub>O (50 ml) manteniendo los sólidos con la fase orgánica. La fase orgánica se filtró y se concentró para dar 32,33 g de un aceite de color amarillo B. Los dos aceites (A y B) se combinaron y se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3,5 l), a continuación MeOH al 3 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9 l) para dar 68,23 g de Fmoc-dolaproína en forma de una espuma de color 40 blanco (81 %, pureza de un 97,5 % por HPLC (AUC)).

#### Preparación de Fmoc-Dap-Phe-ODMB

45 Phe-ODMB en bruto (48,3 mmol) se suspendió en DMF anhidra (105 ml, Acros) durante 5 minutos y se añadió Fmoc-Dap (19,80 g, 48,3 mmol). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió TBTU (17,08 g, 53,20 mmol, Matrix Innovations). Se añadió N,N-diisopropiletilamina (25,3 ml, 145,0 mmol, Acros) mediante una jeringa durante 3 min. Después de 1 h, el baño de hielo se retiró y la mezcla se dejó calentar durante 30 min. La mezcla se vertió en agua (1 l) y se extrajo con acetato de etilo (300 ml). Después de separación, la fase acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo (2 x 150 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (150 ml), se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se filtró (papel de filtro) para retirar las sustancias insolubles (compuestos inorgánicos y algo de dibenzofulveno). 50 Despues de concentración, el resto (41 g) se adsorbió sobre sílice (41 g) y se purificó por cromatografía (columna de 22 cm x 8 cm; Heptano al 65 %/EtOAc (2,5 l); Heptano al 33 %/EtOAc (3,8 l), para dar 29,4 g de producto en forma de una espuma de color blanco (86 %, pureza de un 92 % por HPLC).

Datos: HPLC, RMN 1H, TLC (EtOAc a 1:1/Heptano Rf = 0,33, tinción con rojo en vanillina).

#### 55 Preparación de Dap-Phe-ODMB

60 Un matraz de fondo redondo de 1 l se cargó con Fmoc-Dap-Phe-ODMB (27,66 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (122 ml) y dietilamina (61 ml, Acros). La solución se agitó a temperatura ambiente y la finalización se controló por HPLC. Despues de 7 h, la mezcla se concentró (temp. del baño < 30 °C). El resto se suspendió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 ml) y se concentró. Ésto se repitió dos veces. Al resto se añadió MeOH (20 ml) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 ml), y la solución se concentró. El resto se suspendió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml) y tolueno (400 ml), se concentró, y el resto se dejó al vacío durante una noche para dar un resto de color similar al crema.

65 Datos: HPLC, RMN 1H, MS.

Preparación de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB

Dap-Phe-ODMB en bruto (39,1 mmol) se suspendió en DMF anhidra (135 ml, Acros) durante 5 minutos y se añadió Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH (24,94 g, 39,1 mmol, véase el Ejemplo 2 para la preparación). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió TBTU (13,81 g, 43,0 mmol, Matrix Innovations). N,N-Diisopropiletilamina (20,5 ml, 117,3 mmol, Acros) se añadió mediante una jeringa durante 2 minutos. Después de 1 hora, el baño de hielo se retiró y la mezcla se dejó calentar durante 30 min. La mezcla se vertió en agua (1,5 l) y se diluyó con acetato de etilo (480 ml). Después de reposar durante 15 minutos, las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (300 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (200 ml), se secó ( $\text{MgSO}_4$ ) y se filtró (papel de filtro) para retirar las sustancias insolubles (compuestos inorgánicos y algo de dibenzofulveno). Después de concentración, el resto (49 g) se raspo del matraz y se adsorbió sobre sílice (49 g) y se purificó por cromatografía (columna dia de 15 cm x 10 cm; EtOAc a 2:1/Heptano (3 l), EtOAc (5 l); fracciones de 250 ml) para dar 31,84 g de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB en forma de una espuma de color blanco (73 %, pureza de un 93 % por HPLC (AUC)).

Datos: HPLC, TLC (EtOAc a 2:1/heptano,  $R_f$  = 0.21, tinción con rojo en vanillina).

Preparación de MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB

Un matraz de fondo redondo, de 1 l se cargó con Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (28,50 g),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (80 ml) y dietilamina (40 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche y después se concentró a presión reducida. El resto se adsorbió sobre sílice (30 g) y se purificó por cromatografía ultrarrápida (columna dia de 15 cm x 8 cm; MeOH al 2 %/DCM (2 l), MeOH al 3 %/DCM (1 l), MeOH al 6 %/DCM (4 l); fracciones de 250 ml) para dar 15,88 g de MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB en forma de una espuma de color blanco (69 %, pureza de un 96 % por HPLC (AUC)).

Datos: HPLC, TLC (MeOH al 6 %/DCM,  $R_f$  = 0.24, tinción con rojo en vanillina).

Preparación de MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB

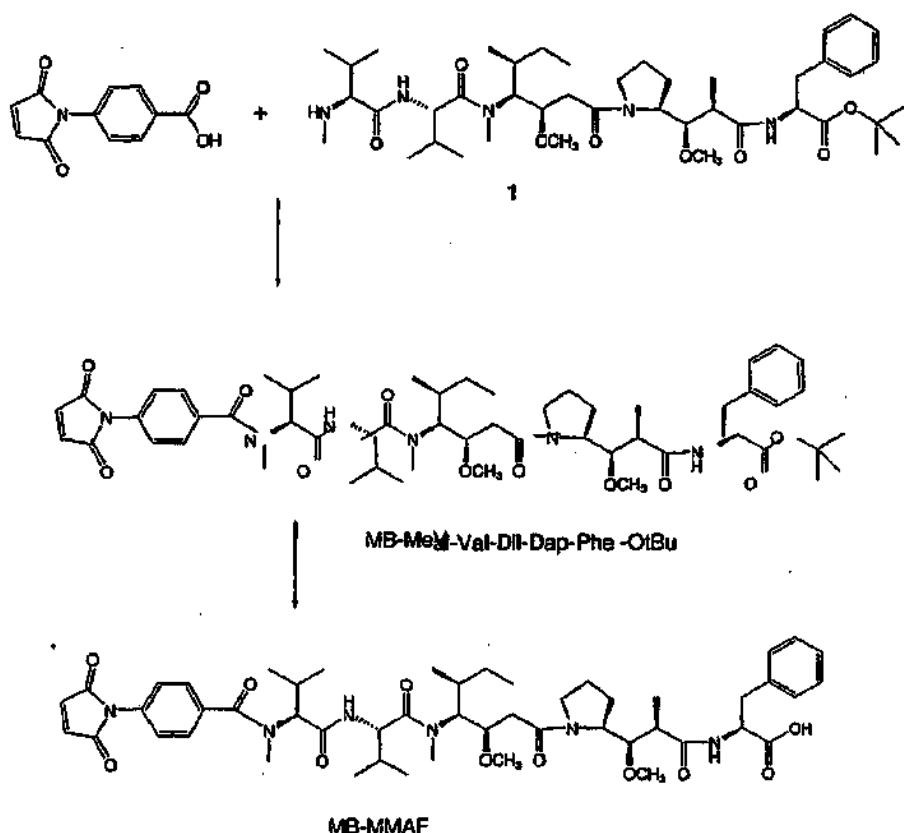
Un matraz de fondo redondo, de 50 ml se cargó con MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (750 mg, 0,85 mmol), DMF anhidra (4 ml), ácido maleimidocaproico (180 mg, 0,85 mmol) y TBTU (300 mg, 0,93 mmol, Matrix Innovations) a temperatura ambiente. N,N-Diisopropiletilamina (450  $\mu$ l, 2,57 mmol) se añadió mediante una jeringa. Después de 1,5 horas, la mezcla se vertió en agua (50 ml) y se diluyó con acetato de etilo (30 ml). NaCl se añadió para mejorar la separación. Después de la separación de las fases, la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (25 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtró y se concentró. El aceite resultante (1 g) se purificó por cromatografía ultrarrápida [100 ml de sílice; Heptano al 25 %/EtOAc (100 ml), Heptano al 10 %/EtOAc (200 ml), EtOAc (1,5 l)] para dar MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (13) en forma de una espuma de color blanco (521 mg, 57 %, pureza de un 94 % por HPLC(AUC)).

Datos: RMN 1H, HPLC.

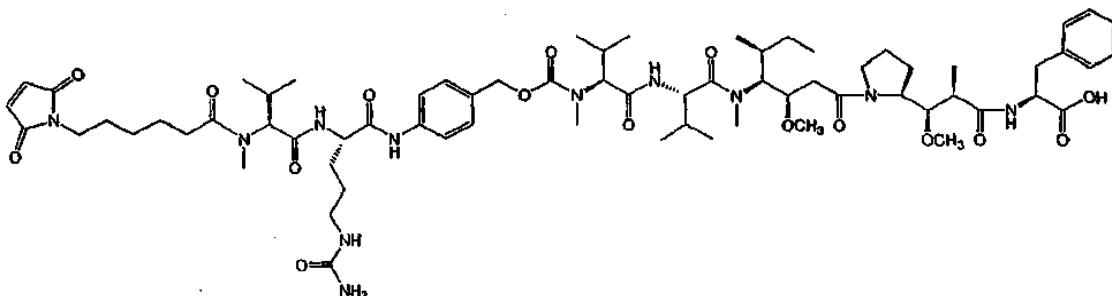
Preparación de MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OH (MC-MMAF) (11)

Un matraz de fondo redondo, de 50 ml se cargó con MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (Compuesto 13,428 mg, 0,39 mmol) y se disolvió en TFA al 2,5 %/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml). La solución se volvió de color rosa-púrpura durante 2 min. La finalización se controló por HPLC y TLC (MeOH al 6 %/DCM, tinción con  $\text{KMnO}_4$ ). Después de 40 min, se añadieron tres gotas de agua y la mezcla de color rosa-púrpura se concentró para dar 521 mg de un resto de color rosa. La purificación por cromatografía (IPA al 15 %/DCM) proporcionó 270 mg de MC-MMAF (73 %, pureza de un 92 % por HPLC) en forma de un sólido de color blanco.

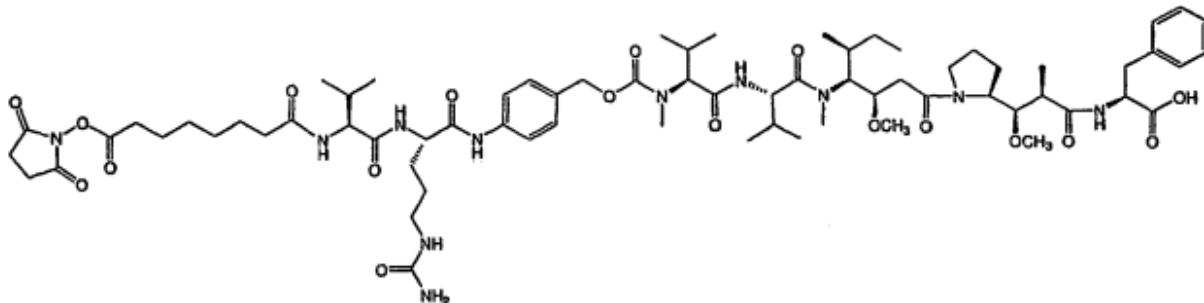
## Ejemplo 23b - Síntesis de análogo de mc-MMAF



- 5 MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (compuesto 1, 35 mg, 0,044 mmol) se suspendió en DMF (0,250 ml). Se añadieron ácido 4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-benzoico (11 mg, 0,049 mmol) y HATU (17 mg, 0,044 mmol) seguido de DIEA (0,031 ml, 0,17 mmol). Esta mezcla de reacción se dejó en agitación durante 2,0 h. El análisis de HPLC indicó el consumo completo del compuesto de partida 1.
- 10 El producto se aisló a través de RP-HPLC preparativa, usando una Columna Synergi Max-RP C<sub>12</sub> de 80 Å de Phenomenex (250 x 21,20 mm). Eluente: gradiente lineal de MeCN de un 10 % a un 80 %/TFA al 0,05 % (ac.) durante 8 minutos, a continuación MeCN al 80 %/TFA al 0,05 % (ac.) isocrático durante un periodo adicional 12 minutos. Se aisló un total de 20 mg de producto puro (14) (0,02 mmol, rendimiento de un 46 %). ES-MS *m/z* 987,85 [M+H]<sup>+</sup>; 1019,41 [M+Na]<sup>+</sup>; 985,54 [M-H]<sup>-</sup>.
- 15 MB-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (Compuesto 14,38 mg, 0,0385 mmol) se suspendió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 ml) y TFA (1 ml). La mezcla se agitó durante 2,0 h, y a continuación los compuestos volátiles se evaporaron a presión reducida. El producto se purificó por RP-HPLC preparativa, usando una Columna Synergi Max-RP C<sub>12</sub> de 80 Å de Phenomenex (250 x 21,20 mm). Eluente: gradiente lineal de MeCN de un 10 % a un 80 % y TFA al 0,05 % (ac.) durante 8 minutos, a continuación MeCN al 80 %/TFA al 0,05 % (ac.) isocrático durante un periodo adicional 12 minutos. Se aisló un total de 14,4 mg de producto de MB-MMAF (0,015 mmol, rendimiento de un 40 %). ES-MS *m/z* 930,96 [M+H]<sup>+</sup> 952,98 [M+Na]<sup>+</sup>; 929,37 [M-H]<sup>-</sup>.

**Ejemplo 23c - Preparación de MC-MeVal-Cit-PAB-MMAF (16)**

- 5 A una suspensión a temperatura ambiente de Fmoc-MeVal-OH (3,03 g, 8,57 mmol) y carbonato de N,N'-disuccimidilo (3,29 g, 12,86 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (80 ml) se añadió DIEA (4,48 ml, 25,71 mmol). Esta mezcla de reacción se dejó en agitación durante 3,0 h, y después se vertió en un embudo de separación en el que la mezcla orgánica se extrajo con HCl 0,1 M (ac.). El resto orgánico en bruto se concentró a presión reducida, y el producto se aisló por chromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice usando un gradiente lineal de acetato de etilo al 20-100 %/hexanos. Se recuperó un total de 2,18 g de Fmoc-MeVal-OSu puro (4,80 mmoles, rendimiento de un 56 %).
- 10 A una suspensión a temperatura ambiente de Fmoc-MeVal-OSu (2,18 g, 4,84 mmol) en DME (13 ml) y THF (6,5 ml) se añadió una solución de L-citrulina (0,85 g, 4,84 mmol) y  $\text{NaHCO}_3$  (0,41 g, 4,84 mmol) en  $\text{H}_2\text{O}$  (13 ml). La suspensión se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 16 h, a continuación se extrajo en *tert*-BuOH/ $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ , se acidificó a pH = 2-3 con HCl 1 M. La fase orgánica se separó, se secó y se concentró a presión reducida. El resto se trituró con éter dietílico dando como resultado 2,01 g de Fmoc-MeVal-Cit-COOH que se usó sin purificación adicional.
- 15 20 El Fmoc-MeVal-Cit-COOH bruto se suspendió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  a 2:1 (100 ml), y se le añadió alcohol *p*-aminobencílico (0,97 g, 7,9 mmol) y EEDQ (1,95 g, 7,9 mmol). Esta suspensión se dejó en agitación durante 125 h, a continuación los compuestos orgánicos volátiles se retiraron a presión reducida, y el resto se purificó por chromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice usando MeOH al 10 %/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se recuperó el Fmoc-MeVal-Cit-PAB-OH puro (0,55 g, 0,896 mmol, rendimiento de un 18,5 %). ES-MS  $m/z$  616,48 [ $\text{M}+\text{H}]^+$ .
- 25 30 35 A una suspensión de Fmoc-MeVal-Cit-PAB-OH (0,55 g, 0,896 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 ml) se añadió STRATOSPHERES™ (unido a resina de piperazina) (> 5 mmol/g, 150 mg). Despues de su agitación a temperatura ambiente durante 16 h la mezcla se filtró a través de celite (lavado previamente con MeOH), y se concentró a presión reducida. El resto se trituró con éter dietílico y hexanos. El material sólido resultante, MeVal-Cit-PAB-OH, se suspendió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml), y se le añadió MC-OSu (0,28 g, 0,896 mmol), DIEA (0,17 ml, 0,99 mmol) y DMF (15 ml). Esta suspensión se agitó durante 16 h, pero el análisis de HPLC de la mezcla de reacción indicó reacción incompleta, de modo que la suspensión se concentró a presión reducida hasta un volumen de 6 ml, a continuación se añadió una solución de  $\text{NaHCO}_3$  (ac.) al 10 % y la suspensión se agitó durante un periodo adicional de 16 h. El disolvente se retiró a presión reducida, y el resto se purificó por chromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice usando un gradiente de MeOH al 0-10 %/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dando como resultado 42 mg (0,072 mmol, rendimiento de un 8 %) de MC-MeVal-Cit-PAB-OH.
- 40 45 A una suspensión de MC-MeVal-Cit-PAB-OH (2,37 g, 4,04 mmol) y bis(nitrofenil)carbonato (2,59 g, 8,52 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml) se añadió DIEA (1,06 ml, 6,06 mmol). Esta suspensión se agitó durante 5,5 h, se concentró a presión reducida y se purificó por trituración con éter dietílico. MC-MeVal-Cit-PAB-OCO-pNP (147 mg, 0,196 mmol) se suspendió en una solución de piridina a 1:5/DMF (3 ml), y se le añadió HOEt (5 mg, 0,039 mmol), DIEA (0,17 ml, 0,978 mmol) y MMAF (compuesto 2, 150 mg, 0,205 mmol). Esta mezcla de reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente, y a continuación se purificó por RP-HPLC preparativa (x 3), usando una Columna Synergi Max-RP C<sub>12</sub> de 80 Å de Phenomenex (250 x 21,20 mm). Eluyente: gradiente lineal de MeCN de un 10 % a un 90 %/TFA al 0,05 % (ac.) durante 30 minutos, a continuación MeCN al 90 %/TFA al 0,05 % (ac.) isocrático durante un periodo adicional de 20 minutos. MC-MeVal-Cit-PAB-MMAF (16) se obtuvo en forma de un sólido de color amarillento (24,5 mg, 0,0182, rendimiento de un 0,45 %). ES-MS  $m/z$  1344,95 [ $\text{M}+\text{H}]^+$ ; 1366,94 [ $\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**Ejemplo 23d - Preparación de éster de succinimida de suberil-Val-Cit-PAB-MMAF (17)****Compuesto 17**

5 El Compuesto 1 (300 mg, 0,38 mmol), Fmoc-Val-Cit-PAB-pNP (436 mg, 0,57 mmol, 1,5 equiv.) se suspendieron en piridina anhidra, 5 ml. Se añadió HOBr (10 mg, 0,076 mmol, 0,2 equiv.) seguido de DIEA (199  $\mu$ l, 1,14 mmol, 3 equiv.). La mezcla de reacción se sonicó durante 10 min, y a continuación se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Piridina se retiró a presión reducida, el resto se volvió a suspender en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La mezcla se separó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice en un gradiente de etapa de MeOH, de un 0 a un 10 %, en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron, se secó al vacío durante una noche para dar 317 mg (rendimiento de un 59 %) de Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF-OtBu. ES-MS  $m/z$  1415,8 [M+H]<sup>+</sup>.

10 Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF-OtBu (100 mg) se agitó en TFA al 20 %/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml), durante 2 h. La mezcla se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 ml). La fase orgánica se lavó sucesivamente con agua (2 x 30 ml) y salmuera (1 x 30 ml). La fase orgánica se concentró, se cargó sobre un lecho de gel de sílice en MeOH al 10 %/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . El producto se eluyó con MeOH al 30 %/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Después de secar al vacío durante una noche se obtuvo, Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF en forma de un sólido de color blanco, 38 mg, rendimiento de un 40 %. ES-MS  $m/z$  1357,7 [M-H]<sup>-</sup>.

15 Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF, 67 mg, se suspendió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 ml) dietilamina (2 ml) y DMF (2 ml). La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El disolvente se retiró a presión reducida. El resto se co-evaporó con piridina (2 ml), a continuación con tolueno (2 x 5 ml), se secó al vacío. Se obtuvo Val-Cit-PAB-MMAF en forma de un aceite de color parduzco, y se usó sin purificación adicional.

20 Todo el Val-Cit-PAB-MMAF preparado a partir de 67 mg de Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF, se suspendió en piridina (2 ml), y se añadió a una solución de suberato de disuccinimidilo (74 mg, 0,2 mmol, 4 equiv.), en piridina (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 3 horas, se añadió éter (20 ml). El precipitado se recogió, se lavó con una cantidad adicional de éter. Un sólido de color rojizo se suspendió en MeOH al 30 %/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se filtra a través de una capa de gel de sílice con MeOH al 30 %/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como eluyente. Se obtuvo el Compuesto 17 en forma de un sólido de color blanco, 20 mg (rendimiento de un 29 %). ES-MS  $m/z$  1388,5 [M-H]<sup>-</sup>.

**Ejemplo 24 – Eficacia *in vivo* de Conjugados de Anticuerpo-Fármaco de mcMMAF**

25 **Eficacia de cAC10-mcMMAF en xenoinjertos de ALCL de Karpas-299:** Para evaluar la eficacia *in vivo* de cAC10-mcMMAF con un promedio de 4 restos de fármaco por anticuerpo (cAC10-mcF4), células ALCL humanas de Karpas-299 se implantaron por vía subcutánea en ratones C.B-17 SCID inmunodeficientes ( $5 \times 10^6$  células por ratón). Los volúmenes tumorales se calcularon usando la fórmula ( $0,5 \times L \times W^2$ ) en la que L y W son la medida más larga y más corta de dos medidas bidireccionales. Cuando el volumen tumoral medio en los animales de estudio alcanzó aproximadamente  $100 \text{ mm}^3$  (intervalo de 48-162), los ratones se dividieron en 3 grupos (5 ratones por grupo) y se dejaron sin tratar o se dosificaron con una sola inyección intravenosa a través de la vena de la cola de 1 o 2 mg/kg de cAC10-mcF4 (Figura 1). Los tumores en los ratones sin tratar crecieron rápidamente hasta un volumen medio de  $> 1.000 \text{ mm}^3$  en 7 días del comienzo de la terapia. Por el contrario, todo el tumor tratado con cAC10-mcF4 mostró una rápida regresión con 3/5 en el grupo de 1 mg/kg y 5/5 en el grupo de 2 mg/kg que obtuvo una respuesta total del tumor. Aunque el tumor en uno de los pacientes con respuesta total en el grupo de 2 mg/kg recurrió aproximadamente 4 semanas más tarde, no hubo tumores detectables en los 4/5 pacientes restantes en este grupo y en los 3 pacientes de respuesta total en el grupo de 1 mg/kg a las 10 semanas después de la terapia.

30 **Eficacia de cBR96-mcMMAF en xenoinjertos de NSCLC L2987:** cBR96 es un anticuerpo químico que reconoce el antígeno Le<sup>Y</sup>. Para evaluar la eficacia *in vivo* de cBR96-mcMMAF con 4 fármacos por anticuerpo (cBR96-mcF4), fragmentos de tumor de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) L2987 se implantaron en ratones atípicos desnudos. Cuando los tumores tenían un tamaño medio de aproximadamente  $100 \text{ mm}^3$ , los ratones se dividieron en 3 grupos: sin tratar y 2 grupos de terapia. Para la terapia, tal como se muestra en la Figura 3a, se administró cBR96-mcF4 a los ratones a 3 o 10 mg/kg/inyección cada 4 días para un total de 4 inyecciones (q4dx4). Tal como se muestra en la Figura 3b, se administró cBR96-mcF4 a los ratones o un conjugado de control de no unión, cAC10-mcF4, a 10 mg/kg/inyección cada 4 días para un total de 4 inyecciones (q4dx4). Tal como se muestra

en las Figuras 3a y 3b, BR96-mcF4 produjo un retraso del crecimiento tumoral pronunciado en comparación con los controles.

5 La Figura 2 muestra un ensayo de eficacia, de una sola dosis, *in vivo*, de cAC10-mcMMAF en L540CY subcutáneo. Para este estudio había 4 ratones en el grupo sin tratar y 10 en cada uno de los grupos de tratamiento.

#### **Ejemplo 25 – Eficacia *in vitro* de Conjugados de Anticuerpo-Fármaco de MC-MMAF**

10 *Actividad de conjugados de cAC10-anticuerpo-fármaco frente a líneas celulares CD30<sup>+</sup>.* Las Figuras 4a y 16b muestran curvas de dosis-respuesta a partir de un experimento representativo en el que se incubaron cultivos de Karpas 299 (linfoma anaplásico de células grandes) y L428 (Linfoma Hodgkin) con diluciones en serie de cAC10-mcMMAF (Figura 4a) o cAC10-vcMMAF (Figura 4b) durante 96 horas. Los cultivos se marcaron durante 4 horas con resazurina 50 µM [10-óxido de 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona] y se midió la fluorescencia. Los datos se redujeron en GraphPad Prism versión 4.00 usando el procedimiento de ajuste de curvas de dosis-respuesta de 4 parámetros. Los valores de  $IC_{50}$  se definen como la concentración en la que el crecimiento se reduce al 50 % en comparación con cultivos de control sin tratar. Cada concentración se sometió a ensayo por cuadruplicado.

20 *Actividad de conjugados de cBR96-anticuerpo-fármaco frente a líneas celulares LeY<sup>+</sup>.* Las Figuras 5a y 5b muestran curvas de dosis-respuesta a partir de un experimento representativo en el que se incubaron cultivos de H3396 (carcinoma de mama) y L2987 (carcinoma de pulmón de células no pequeñas) con diluciones en serie de cBR96-mcMMAF (Figura 5a) o -vcMMAF (Figura 5b) durante 96 horas. Los cultivos se marcaron durante 4 horas con resazurina 50 µM y se midió la fluorescencia. Los datos se redujeron en GraphPad Prism versión 4.00 usando el procedimiento de ajuste de curvas de dosis-respuesta de 4 parámetros. Los valores de  $IC_{50}$  se definen como la concentración en la que el crecimiento se reduce al 50 % en comparación con cultivos de control sin tratar. Cada concentración se sometió a ensayo por cuadruplicado.

25 *Actividad de conjugados c1F6-anticuerpo-fármaco frente a líneas celulares de carcinoma de células renales CD70<sup>+</sup>.* Las Figuras 6a y 6b muestran curvas de dosis-respuesta a partir de un experimento representativo en el que se incubaron cultivos de células Caki-1 y 786-O con diluciones en serie de c1F6-mcMMAF (Figura 6a) o -vcMMAF (Figura 6b) durante 96 horas. Los cultivos se marcaron durante 4 horas con resazurina 50 µM y se midió la fluorescencia medida. Los datos se redujeron en GraphPad Prism versión 4.00 usando el procedimiento de ajuste de curvas de dosis-respuesta de 4 parámetros. Los valores de  $IC_{50}$  se definen como la concentración en la que el crecimiento se reduce al 50 % en comparación con cultivos de control sin tratar. Cada concentración se sometió a ensayo por cuadruplicado.

35 **Ejemplo 26 - Purificación de trastuzumab**

40 Un vial que contiene 440 mg de HERCEPTIN® (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Patente de Estados Unidos N° 5821337) anticuerpo) se disolvió en 50 ml de tampón MES (MES 25 mM, NaCl 50 mM, pH 5,6) y se cargó en una columna de intercambio catiónico (Sephadex S, 15 cm x 1,7 cm) que se había equilibrado en el mismo tampón. La columna se lavó a continuación con el mismo tampón (5 volúmenes de columna). Trastuzumab se eluyó aumentando la concentración de NaCl del tampón a 200 mM. Las fracciones que contenían el anticuerpo se combinaron, se diluyó a 10 mg/ml, y se dializó en un tampón que contenía fosfato potásico 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA2 mM, pH 6,5.

45 **Ejemplo 27 - Preparación de trastuzumab-MC-MMAE por conjugación de trastuzumab y MC-MMAE**

50 Trastuzumab, disuelto en borato sódico 500 mM y cloruro sódico 500 mM a pH 8,0 se trata con un exceso de ditiotreitol 100 mM (DTT). Después de incubación a 37 °C durante aproximadamente 30 minutos, el campo se intercambia por elución sobre resina Sephadex G25 y eluyendo con PBS con DTPA 1 mM. El valor de tiol/Ab se comprueba mediante la determinación de la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol por reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación del absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido disuelto en PBS se enfrió en hielo.

55 El reactivo de conector del fármaco, maleimidocaproil-monometil auristatina E (MMAE), es decir MC-MMAE, disuelto en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua a una concentración conocida, y se añade al anticuerpo trastuzumab reducido enfriado en PBS. Despues de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para inactivar la reacción y se protege cualquier grupo tiol del anticuerpo sin reaccionar. La mezcla de reacción se mediante un ultrafiltración en centrífuga y trastuzumab-MC-MMAE se purifica y se desala mediante elución a través de resina G25 en PBS, se filtró a través de filtros de 0,2 µm en condiciones estériles, y se congeló para su almacenamiento.

60 **Ejemplo 28 - Preparación de trastuzumab-MC-MMAF por conjugación de trastuzumab y MC-MMAF**

65 Trastuzumab-MC-MMAF se preparó por conjugación de trastuzumab y MC-MMAF siguiendo el procedimiento del Ejemplo 27.

**Ejemplo 29 - Preparación de trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAE por conjugación de trastuzumab y MC-val-cit-PAB-MMAE**

5 Trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAE se preparó por conjugación de trastuzumab y MC-val-cit-PAB-MMAE siguiendo el procedimiento del Ejemplo 27.

**Ejemplo 30 - Preparación de trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF por conjugación de trastuzumab y MC-val-cit-PAB-MMAF 9**

10 Trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF se preparó por conjugación de trastuzumab y MC-val-cit-PAB-MMAF 9 siguiendo el procedimiento del Ejemplo 27.

**Ejemplo 31 – Toxicidad en ratas**

15 El perfil de toxicidad aguda de fármacos libres y ADC se evaluó en ratas Sprague-Dawley adolescentes (75-125 gramos cada una, Charles River Laboratories (Hollister, CA). Los animales fueron inyectados el Día 1, se obtuvieron perfiles completos de química y hematología en la medida inicial, el día 3 y el día 5 y se realizó una necropsia completa el Día 5. Se realizaron medidas de enzimas hepáticas en todos los animales e histología de rutina tal como se realiza en tres animales aleatorios para cada grupo para los siguientes tejidos: esternón, hígado, riñón, timo, bazo, intestino grueso y delgado. Los grupos experimentales fueron como sigue a continuación:

Grupo	Administrado	mg/kg	μg de MMAF/m <sup>2</sup>	MMAF/MAb	N/Sexo
1	Vehículo	0	0	0	2/F
2	trastuzumab-MC-val-cit-MMAF	9,94	840	4,2	6/F
3	trastuzumab-MC-val-cit-MMAF	24,90	2105	4,2	6/F
4	trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF	10,69	840	3,9	6/F
5	trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF	26,78	2105	3,9	6/F
6	trastuzumab-MC-MMAF	10,17	840	4,1	6/F
7	trastuzumab-MC-MMAF	25,50	2105	4,1	6/F
8	trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF	21,85	2105	4,8	6/F

25 Para trastuzumab-MC-val-cit-MMAF, trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF, trastuzumab-MC-MMAF y trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF, el término μg de MMAF/m<sup>2</sup> se calculó usando 731,5 como el PM de MMAF y 145167 como el PM de Herceptin.

El área de superficie corporal se calculó como sigue a continuación: [(peso corporal en gramos a potencia 0,667) x 11,8]/10000]. (Guidance for Industry and Reviewers, 2002).

30 Las soluciones de dosis se administraron mediante una sola inyección en bolo intravenoso en la vena de la cola el Día del Estudio 1 con un volumen de dosis de 10 ml/kg. Los pesos corporales de los animales se midieron antes de la dosis el Día del Estudio 1 y diariamente a partir de ese momento. Se recogió sangre entera en tubos que contenían EDTA para análisis de hematología. La sangre entera se recogió en tubos separadores de suero para análisis clínico de química. Las muestras de sangre se recogieron antes de la dosis el Día del Estudio -4, Día del Estudio 3 y Día del Estudio 5. Además, se recogió sangre entera en tubos que contenían heparina sódica en el momento de la necropsia del plasma se congeló a -70 °C para un posible análisis posterior. Los siguientes tejidos se recogieron y se colocaron en formalina tamponada neutra en el momento de la necropsia: hígado, riñones, corazón, timo, bazo, cerebro, esternón secciones del tracto GI, que incluyen estómago, intestino grueso y delgado. Se examinaron el esternón, intestino delgado, intestino grueso, hígado, timo, bazo y riñón.

35 40 Los niveles de enzimas en suero asociados al hígado en cada punto temporal se compararon con un intervalo (percentil 5° y 95°) a partir de ratas Sprague-Dawley hembra normales. Recuentos de glóbulos blancos y plaquetas en cada punto temporal se compararon con un intervalo (percentil 5° y 95°) a partir de ratas Sprague-Dawley hembra normales.

45 Estudio de dosis elevada en ratas Sprague-Dawley hembra normales:

Grupo 1:	Vehículo
Grupo 2:	trastuzumab-MC-MMAF, 52,24 mg/kg, 4210 µg/m <sup>2</sup>
Grupo 3:	trastuzumab-MC-MMAF, 68,25 mg/kg, 5500 µg/m <sup>2</sup>
Grupo 4:	trastuzumab-MC-MMAF, 86,00 mg/kg, 6930 µg/m <sup>2</sup>

Tejidos de 11 animales se sometieron a histología de rutina. Estos animales había sido parte de un estudio de toxicidad aguda de dosis variadas usando un inmunoconjuguado de trastuzumab-MC-MMAF. Se observó a los animales durante 12 días después de la dosificación.

#### Ejemplo 32 – Toxicidad/Seguridad en Mono Cynomolgus

Tres grupos de cuatro (2 machos, 2 hembras) *Macaca fascicularis* (mono cynomolgus) sin tratamiento previa se estudiaron para trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE y trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF. La administración intravenosa se realizó los dos días 1 y 22 de los estudios.

Muestra	Grupo	Dosis
Vehículo	1 1M/1F	día 1 día 22
Ejemplo de referencia de H-MC-vc-PAB-MMAE	2 2M/2F	180 µg/m <sup>2</sup> (0,5 mg/kg) el día 1 1100 µg/m <sup>2</sup> (3,0 mg/kg) el día 22
Ejemplo de referencia de H-MC-vc-PAB-MMAE	3 2M/2F	550 µg/m <sup>2</sup> (1,5 mg/kg) el día 8 550 µg/m <sup>2</sup> (1,5 mg/kg) el día 29
Ejemplo de referencia de H-MC-vc-PAB-MMAE	4 2M/2F	880 µg/m <sup>2</sup> (2,5 mg/kg) el día 15 880 µg/m <sup>2</sup> (2,5 mg/kg) el día 36

Muestra	Grupo	Dosis
Vehículo	1 1M/1F	día 1 día 22
H-MC-vc-PAB-MMAF	2 2M/2F	180 µg/m <sup>2</sup> (0,5 mg/kg) el día 1 1100 µg/m <sup>2</sup> (3,0 mg/kg) el día 22
H-MC-vc-PAB-MMAF	3 2M/2F	550 µg/m <sup>2</sup> (1,5 mg/kg) el día 1 550 µg/m <sup>2</sup> (1,5 mg/kg) el día 22
H-MC-vc-PAB-MMAF	4 2M/2F	880 µg/m <sup>2</sup> (2,5 mg/kg) el día 1 880 µg/m <sup>2</sup> (2,5 mg/kg) el día 22

H = trastuzumab

- 15 La dosificación se expresa en el área superficial de un animal con el fin de ser relevante para otras especies, es decir la dosificación en µg/m<sup>2</sup> es independiente de las especies y por lo tanto comparable entre especies. Las formulaciones de ADC contenían PBS, fosfato sódico 5,4 mM, fosfato potásico 4,2 mM, cloruro sódico 140 mM, pH 6,5.
- 20 Se recogió sangre para dosis previa de análisis de hematología, y a los 5 min, 6 h, 10 h, y a los 1, 3, 5, 7, 14, 21 días después de cada dosis. Los recuentos de eritrocitos (RBC) y de plaquetas (PLT) se midieron con el método de dispersión de luz. El recuento de leucocitos (WBC) se midió con el método de peroxidasa/basófilos. El recuento de reticulocitos se midió con el método de dispersión de luz con tinte catiónico. Los recuentos celulares se midieron en un aparato Advia 120. ALT (alanina aminotransferasa) y AST (aspartato aminotransferasa) se midieron en U/L con UV/NADH; metodología IFCC en un aparato AU400 de Olympus, y usando ensayos de Ab ELISA - ECD/GxhuFc-HRP. Conj. Ab ELISA-MMAE/MMAF//ECD-Bio/SA-HRP Total.
- 25

#### Ejemplo 33 - Producción, Caracterización y Humanización de Anticuerpo Monoclonal 4D5 Anti-ErbB2

- 30 El anticuerpo monoclonal 4D5 de murino que se une específicamente al dominio extracelular de ErbB2 se produjo tal como se describe en Fendly et al. (1990) Cancer Research 50: 1550-1558. En resumen, células NIH 3T3/HER2-3<sub>400</sub> (que expresan aproximadamente 1 x 10<sup>5</sup> moléculas de ErbB2/célula) se produjeron tal como se describe en Hudziak et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84: 7158-7163 (1987) y se cosecharon con solución salina tamponada con fosfato

(PBS) que contenía EDTA 25 mM y se usó para inmunizar ratones BALB/c. Se administraron inyecciones i.p. a los ratones de  $10^7$  células en 0,5 ml de PBS en las semanas 0, 2, 5 y 7. A los ratones con antisueros que inmunoprecipitaban ErbB2 marcado con  $^{32}\text{P}$  se les administraron inyecciones i.p. de un extracto de membranas de ErbB2 purificado con aglutinina-Sepharose de germen de trigo (WGA) en las semanas 9 y 13. Ésto fue seguido de una inyección i.v. de 0,1 ml de la preparación de ErbB2 y los estrenos y dos se fundieron con línea de mieloma de ratón X63-Ag8.653. Dos sobrenadantes de hibridoma se identificaron sistemáticamente para la unión a ErbB2 con ELISA y radioinmunoprecipitación.

#### Mapeo y caracterización de epítopos

El epítopo de ErbB2 unido mediante el anticuerpo monoclonal 4D5 se determinó mediante un análisis de unión competitiva (Fendly et al. Cancer Research 50: 1550 -1558 (1990)). Se realizaron estudios de bloqueo cruzado mediante fluorescencia directa en células intactas usando la Máquina de Identificación Sistemática PANDEX™ para cuantificar la fluorescencia. El anticuerpo monoclonal se conjugó con isotiocianato de fluoresceína (FITC), usando procedimientos establecidos (Wofsy et al. Selected Methods in Cellular Immunology, p. 287, Mishel y Schiigi (eds.) San Francisco: W.J. Freeman Co. (1980)). Las monocapas confluentes de células NIH 3T3/HER2-3<sub>400</sub> se tripsinizaron, se lavaron una vez, y se volvieron a suspender a  $1,75 \times 10^6$  células/ml en PBS frío que contenía albúmina de suero bovino al 0,5 % (BSA) y NaN<sub>3</sub> al 0,1 %. Se añadió una concentración final de partículas de látex al 1 % (IDC, Portland, OR) para reducir la obstrucción de las membranas de placa PANDEX™. Células en suspensión, 20  $\mu\text{l}$ , y 20  $\mu\text{l}$  de anticuerpos monoclonales purificados (de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) se añadieron a los pocillos de la placa PANDEX™ y se incubó en hielo durante 30 minutos. Una dilución predeterminada del anticuerpo monoclonal marcado con FITC en 20  $\mu\text{l}$  se añadió a cada pocillo, se incubó durante 30 minutos, se lavó, y la fluorescencia se cuantificó con la PANDEX™. Se consideró que los anticuerpos monoclonales compartían un epítopo si cada uno bloqueaba la unión del otro en un 50 % o más en comparación con un anticuerpo monoclonal de control irrelevante. En este experimento, al anticuerpo monoclonal 4D5 se le asignó el epítopo I (restos de aminoácidos de aproximadamente 529 a aproximadamente 625, inclusive dentro del dominio extracelular de ErbB2).

Las características inhibidoras de crecimiento del anticuerpo monoclonal 4D5 se evaluaron usando la línea celular de tumor de mama, SK-BR-3 (véase Hudziak et al. (1989) Molec. Cell. Biol. 9 (3): 1165-1172). En resumen, se separaron células SK-BR-3 usando tripsina al 0,25 % (vol/vol) y se suspendieron en medio completo a una densidad de  $4 \times 10^5$  células por ml. Se sembraron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  ( $4 \times 10^4$  células) en placas de microdilución de 96 pocillos, se permitió que las células se adhirieran, y se añadieron a continuación 100  $\mu\text{l}$  de ellos solos o medios que contenían anticuerpo monoclonal (concentración final de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Después de 72 horas, las placas se lavaron dos veces con PBS (pH 7,5), se tiñeron con violeta de cristal (0,5 % en metanol), y se analizaron para la proliferación celular relativa tal como se describe en Sugarman et al. (1985) Science 230: 943-945. El anticuerpo monoclonal 4D5 inhibió la proliferación celular relativa de SK-BR-3 en aproximadamente un 56 %.

Además, se evaluó la capacidad del anticuerpo monoclonal 4D5 para inhibir la fosforilación de tirosina estimulada por HRG de proteínas en el intervalo  $M_r$  180.000 a partir de lisados de células enteras de células MCF7 (Lewis et al. (1996) Cancer Research 56: 1457-1465). Se indica que las células MCF7 expresan todos los receptores conocidos de ErbB, pero a niveles relativamente bajos. Dado que ErbB2, ErbB3, y ErbB4 tienen tamaños moleculares casi idénticos, no es posible discernir que proteína se está convirtiendo en tirosina fosforilada cuando se evalúan lisados de células enteras mediante análisis de transferencia de Western. Sin embargo, estas células son ideales para ensayos de fosforilación con tirosina mediante HRG debido a que en las condiciones de ensayo usadas, en ausencia de HRG añadida de forma exógena, presenta niveles de bajos a indetectables de proteínas de fosforilación de tirosina en el intervalo de  $M_r$  180.000.

Se sembraron células MCF7 en placas de 24 pocillos y se añadieron anticuerpos monoclonales a ErbB2 a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente; a continuación se añadió rHRG $\beta$ 1<sub>177-244</sub> a cada pocillo hasta una concentración final de 0,2 nM, y la incubación continuó durante 8 minutos. Los medios se aspiraron cuidadosamente de cada pocillo, y las reacciones se detuvieron mediante la adición de 100  $\mu\text{l}$  de tampón de muestra de SDS (SDS al 5 %, DTT 25 mM, y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Cada muestra (25  $\mu\text{l}$ ) se sometió a electroforesis en un gel de gradiente al 4-12 % (Novex) y a continuación se transfirieron electroforéticamente a membranas de difluoro de polivinilideno. Se desarrollaron inmunotinciones con antifosfotirosina (4G10, de UBI, usada a 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), y la intensidad de la banda reactiva predominante a  $\sim M_r$  180.000 se cuantificó mediante densitometría de reflectancia, tal como se ha descrito anteriormente (Holmes et al. (1992) Science 256: 1205-1210; Sliwkowski et al. J. Biol. Chem. 269: 14661-14665 (1994)).

El anticuerpo monoclonal 4D5 inhibió significativamente la generación de una señal de fosforilación de tirosina inducida por HRG a  $M_r$  180.000. En ausencia de HRG, pero fue incapaz de estimular la fosforilación de tirosina de proteínas en el intervalo de  $M_r$  180.000. Además, este anticuerpo no tiene reacción cruzada con EGFR (Fendly et al. Cancer Research 50: 1550-1558 (1990)), ErbB3, o ErbB4. El anticuerpo monoclonal 4D5 fue capaz de bloquear la estimulación con HRG de la fosforilación de tirosina en un 50 %.

Se evaluó el efecto inhibidor del crecimiento de anticuerpo monoclonal 4D5 en células MDA-MB-175 y SK-BR-3 en

5 presencia o ausencia de rHRG $\beta$ 1 exógeno (Schaefer et al. Oncogene 15: 1385-1394 (1997)). Los niveles de ErbB2 en células MDA-MB-175 son 4-6 veces más elevados que el nivel encontrado en células epiteliales de mama normales y el receptor ErbB2-ErbB4 es constitutivamente tirosina fosforilada en células MDA-MB-175. El anticuerpo monoclonal 4D5 fue capaz de inhibir la proliferación celular de células MDA-MB-175, tanto en presencia como en ausencia de HRG exógena. La inhibición de proliferación celular por 4D5 es dependiente del nivel de expresión de ErbB2 (Lewis et al. Cancer Immunol. Immunother. 37: 255-263 (1993)). Se podría detectar una inhibición máxima de un 66 % en células SK-BR-3. Sin embargo, este efecto se podría superar con HRG exógeno.

10 10 El anticuerpo monoclonal 4D5 de murino se humanizó, usando una estrategia de "mutagénesis de conversión genética", tal como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5821337, cuya divulgación completa se incorpora expresamente por la presente por referencia. El anticuerpo monoclonal 4D5 humanizado usado en los siguientes experimentos se denomina huMAb4D5-8. Este anticuerpo es de isotipo IgG1.

15 Listado de secuencias

15 <110> Doronina, Svetlana O.  
Toki, Brian E.  
Senter, Peter D.  
Ebens, Allen J.  
20 Polakis, Paul  
Sliwkowski, Mark X.  
Spencer, Susan D  
Kline, Toni Beth  
25 <120> COMPUESTOS DE MONOMETILVALINA CAPACES DE CONJUGACIÓN CON LIGANDOS  
<130> 018891-001020PC  
<141> 05-11-2004  
30 <150> US 60/598.899  
<151> 04-08-2004  
<150> US 60/557.116  
35 <151> 26-03-2004  
<150> US 60/518.534  
<151> 06-11-2003  
40 <160> 35  
<210> 1  
<211> 502  
<212> PRT  
45 <213> Homo sapien  
<400> 1

## ES 2 605 443 T3

Met Leu Leu Arg Ser Ala Gly Lys Leu Asn Val Gly Thr Lys Lys  
1 5 10 15

Glu Asp Gly Glu Ser Thr Ala Pro Thr Pro Arg Pro Lys Val Leu  
20 25 30

Arg Cys Lys Cys His His His Cys Pro Glu Asp Ser Val Asn Asn  
35 40 45

Ile Cys Ser Thr Asp Gly Tyr Cys Phe Thr Met Ile Glu Glu Asp  
50 55 60

Asp Ser Gly Leu Pro Val Val Thr Ser Gly Cys Leu Gly Leu Glu  
65 70 75

Gly Ser Asp Phe Gln Cys Arg Asp Thr Pro Ile Pro His Gln Arg  
80 85 90

Arg Ser Ile Glu Cys Cys Thr Glu Arg Asn Glu Cys Asn Lys Asp  
95 100 105

Leu His Pro Thr Leu Pro Pro Leu Lys Asn Arg Asp Phe Val Asp  
110 115 120

Gly Pro Ile His His Arg Ala Leu Leu Ile Ser Val Thr Val Cys  
125 130 135

## ES 2 605 443 T3

Ser Leu Leu Leu Val Leu Ile Ile Leu Phe Cys Tyr Phe Arg Tyr  
 140 145 150  
 Lys Arg Gln Glu Thr Arg Pro Arg Tyr Ser Ile Gly Leu Glu Gln  
 155 160 165  
 Asp Glu Thr Tyr Ile Pro Pro Gly Glu Ser Leu Arg Asp Leu Ile  
 170 175 180  
 Glu Gln Ser Gln Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Leu Leu  
 185 190 195  
 Val Gln Arg Thr Ile Ala Lys Gln Ile Gln Met Val Lys Gln Ile  
 200 205 210  
 Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Met Gly Lys Trp Arg Gly  
 215 220 225  
 Glu Lys Val Ala Val Lys Val Phe Phe Thr Thr Glu Glu Ala Ser  
 230 235 240  
 Trp Phe Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Gln Thr Val Leu Met Arg His  
 245 250 255  
 Glu Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Ile Lys Gly Thr Gly  
 260 265 270  
 Ser Trp Thr Gln Leu Tyr Leu Ile Thr Asp Tyr His Glu Asn Gly  
 275 280 285  
 Ser Leu Tyr Asp Tyr Leu Lys Ser Thr Thr Leu Asp Ala Lys Ser  
 290 295 300  
 Met Leu Lys Leu Ala Tyr Ser Ser Val Ser Gly Leu Cys His Leu  
 305 310 315  
 His Thr Glu Ile Phe Ser Thr Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His  
 320 325 330  
 Arg Asp Leu Lys Ser Lys Asn Ile Leu Val Lys Lys Asn Gly Thr  
 335 340 345  
 Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala Val Lys Phe Ile Ser Asp  
 350 355 360  
 Thr Asn Glu Val Asp Ile Pro Pro Asn Thr Arg Val Gly Thr Lys  
 365 370 375  
 Arg Tyr Met Pro Pro Glu Val Leu Asp Glu Ser Leu Asn Arg Asn  
 380 385 390  
 His Phe Gln Ser Tyr Ile Met Ala Asp Met Tyr Ser Phe Gly Leu  
 395 400 405  
 Ile Leu Trp Glu Val Ala Arg Arg Cys Val Ser Gly Gly Ile Val  
 410 415 420  
 Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr His Asp Leu Val Pro Ser Asp Pro  
 425 430 435  
 Ser Tyr Glu Asp Met Arg Glu Ile Val Cys Ile Lys Lys Leu Arg

## ES 2 605 443 T3

440	445	450
Pro Ser Phe Pro Asn Arg Trp Ser Ser Asp Glu Cys Leu Arg Gln		
455	460	465
Met Gly Lys Leu Met Thr Glu Cys Trp Ala His Asn Pro Ala Ser		
470	475	480
Arg Leu Thr Ala Leu Arg Val Lys Lys Thr Leu Ala Lys Met Ser		
485	490	495
Glu Ser Gln Asp Ile Lys Leu		
500		

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 507

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapien

&lt;400&gt; 2

Met Ala Gly Ala Gly Pro Lys Arg Arg Ala Leu Ala Ala Pro Ala		
1	5	10
Ala Glu Glu Lys Glu Glu Ala Arg Glu Lys Met Leu Ala Ala Lys		
20	25	30
Ser Ala Asp Gly Ser Ala Pro Ala Gly Glu Gly Glu Gly Val Thr		
35	40	45
Leu Gln Arg Asn Ile Thr Leu Leu Asn Gly Val Ala Ile Ile Val		
50	55	60
Gly Thr Ile Ile Gly Ser Gly Ile Phe Val Thr Pro Thr Gly Val		
65	70	75
Leu Lys Glu Ala Gly Ser Pro Gly Leu Ala Leu Val Val Trp Ala		
80	85	90
Ala Cys Gly Val Phe Ser Ile Val Gly Ala Leu Cys Tyr Ala Glu		
95	100	105
Leu Gly Thr Thr Ile Ser Lys Ser Gly Gly Asp Tyr Ala Tyr Met		
110	115	120
Leu Glu Val Tyr Gly Ser Leu Pro Ala Phe Leu Lys Leu Trp Ile		
125	130	135
Glu Leu Leu Ile Ile Arg Pro Ser Ser Gin Tyr Ile Val Ala Leu		
140	145	150
Val Phe Ala Thr Tyr Leu Leu Lys Pro Leu Phe Pro Thr Cys Pro		
155	160	165
Val Pro Glu Glu Ala Ala Lys Leu Val Ala Cys Leu Cys Val Leu		
170	175	180
Leu Leu Thr Ala Val Asn Cys Tyr Ser Val Lys Ala Ala Thr Arg		
185	190	195
Val Gln Asp Ala Phe Ala Ala Lys Leu Leu Ala Leu Ala Leu		
200	205	210

## ES 2 605 443 T3

Ile	Ile	Leu	Leu	Gly	Phe	Val	Gln	Ile	Gly	Lys	Gly	Val	Val	Ser
								215		220				225
Asn	Leu	Asp	Pro	Asn	Phe	Ser	Phe	Glu	Gly	Thr	Lys	Leu	Asp	Val
								230		235				240
Gly	Asn	Ile	Val	Leu	Ala	Leu	Tyr	Ser	Gly	Leu	Phe	Ala	Tyr	Gly
				245				250						255
Gly	Trp	Asn	Tyr	Leu	Asn	Phe	Val	Thr	Glu	Glu	Met	Ile	Asn	Pro
								260		265				270
Tyr	Arg	Asn	Leu	Pro	Leu	Ala	Ile	Ile	Ser	Leu	Pro	Ile	Val	
							275		280					285
Thr	Leu	Val	Tyr	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Ala	Tyr	Phe	Thr	Thr	Leu
							290			295				300
Ser	Thr	Glu	Gln	Met	Leu	Ser	Ser	Glu	Ala	Val	Ala	Val	Asp	Phe
							305			310				315
Gly	Asn	Tyr	His	Leu	Gly	Val	Met	Ser	Trp	Ile	Ile	Pro	Val	Phe
							320			325				330
Val	Gly	Leu	Ser	Cys	Phe	Gly	Ser	Val	Asn	Gly	Ser	Leu	Phe	Thr
							335			340				345
Ser	Ser	Arg	Leu	Phe	Phe	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Gly	His	Leu	Pro
							350			355				360
Ser	Ile	Leu	Ser	Met	Ile	His	Pro	Gln	Leu	Leu	Thr	Pro	Val	Pro
							365			370				375
Ser	Leu	Val	Phe	Thr	Cys	Val	Met	Thr	Leu	Leu	Tyr	Ala	Phe	Ser
							380			385				390
Lys	Asp	Ile	Phe	Ser	Val	Ile	Asn	Phe	Phe	Ser	Phe	Phe	Asn	Trp
							395			400				405
Leu	Cys	Val	Ala	Leu	Ala	Ile	Ile	Gly	Met	Ile	Trp	Leu	Arg	His
							410			415				420
Arg	Lys	Pro	Glu	Leu	Glu	Arg	Pro	Ile	Lys	Val	Asn	Leu	Ala	Leu
							425			430				435
Pro	Val	Phe	Phe	Ile	Leu	Ala	Cys	Leu	Phe	Leu	Ile	Ala	Val	Ser
							440			445				450
Phe	Trp	Lys	Thr	Pro	Val	Glu	Cys	Gly	Ile	Gly	Phe	Thr	Ile	Ile
							455			460				465
Leu	Ser	Gly	Leu	Pro	Val	Tyr	Phe	Phe	Gly	Val	Trp	Trp	Lys	Asn
							470			475				480
Lys	Pro	Lys	Trp	Leu	Leu	Gln	Gly	Ile	Phe	Ser	Thr	Thr	Val	Leu
							485			490				495
Cys	Gln	Lys	Leu	Met	Gln	Val	Val	Pro	Gln	Glu	Thr			
							500			505				

<210> 3  
<211> 339

## ES 2 605 443 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapien

&lt;400&gt; 3

5

Met	Glu	Ser	Arg	Lys	Asp	Ile	Thr	Asn	Gln	Glu	Glu	Leu	Trp	Lys
1						5				10				15
Met	Lys	Pro	Arg	Arg	Asn	Leu	Glu	Glu	Asp	Asp	Tyr	Leu	His	Lys
	20								25					30
Asp	Thr	Gly	Glu	Thr	Ser	Met	Leu	Lys	Arg	Pro	Val	Leu	Leu	His
					35				40					45
Leu	His	Gln	Thr	Ala	His	Ala	Asp	Glu	Phe	Asp	Cys	Pro	Ser	Glu
		50						55						60
Leu	Gln	His	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Pro	Gln	Trp	His	Leu	Pro	Ile
		65						70						75
Lys	Ile	Ala	Ala	Ile	Ile	Ala	Ser	Leu	Thr	Phe	Leu	Tyr	Thr	Leu
		80							85					90
Leu	Arg	Glu	Val	Ile	His	Pro	Leu	Ala	Thr	Ser	His	Gln	Gln	Tyr
		95							100					105
Phe	Tyr	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Val	Ile	Asn	Lys	Val	Leu	Pro	Met
		110							115					120
Val	Ser	Ile	Thr	Leu	Leu	Ala	Leu	Val	Tyr	Leu	Pro	Gly	Val	Ile
		125							130					135
Ala	Ala	Ile	Val	Gln	Leu	His	Asn	Gly	Thr	Lys	Tyr	Lys	Phe	
		140						145						150
Pro	His	Trp	Leu	Asp	Lys	Trp	Met	Leu	Thr	Arg	Lys	Gln	Phe	Gly
		155						160						165
Leu	Leu	Ser	Phe	Phe	Ala	Val	Leu	His	Ala	Ile	Tyr	Ser	Leu	
		170						175						180
Ser	Tyr	Pro	Met	Arg	Arg	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Lys	Leu	Leu	Asn	Trp
		185						190						195
Ala	Tyr	Gln	Gln	Val	Gln	Gln	Asn	Lys	Glu	Asp	Ala	Trp	Ile	Glu
		200							205					210
His	Asp	Val	Trp	Arg	Met	Glu	Ile	Tyr	Val	Ser	Leu	Gly	Ile	Val
		215							220					225
Gly	Leu	Ala	Ile	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Val	Thr	Ser	Ile	Pro	Ser
		230							235					240
Val	Ser	Asp	Ser	Leu	Thr	Trp	Arg	Glu	Phe	His	Tyr	Ile	Gln	Ser
		245							250					255
Lys	Leu	Gly	Ile	Val	Ser	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Ile	His	Ala	Leu
		260							265					270
Ile	Phe	Ala	Trp	Asn	Lys	Trp	Ile	Asp	Ile	Lys	Gln	Phe	Val	Trp

## ES 2 605 443 T3

275	280	285
-----	-----	-----

Tyr Thr Pro Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Ile Val		
290	295	300

Val Leu Ile Phe Lys Ser Ile Leu Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys		
305	310	315

Lys Ile Leu Lys Ile Arg His Gly Trp Glu Asp Val Thr Lys Ile		
320	325	330

Asn Lys Thr Glu Ile Cys Ser Gln Leu		
335		

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 6995

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapien

&lt;400&gt; 4

Pro Val Thr Ser Leu Leu Thr Pro Gly Leu Val Ile Thr Thr Asp			
1	5	10	15

Arg Met Gly Ile Ser Arg Glu Pro Gly Thr Ser Ser Thr Ser Asn		
20	25	30

Leu Ser Ser Thr Ser His Glu Arg Leu Thr Thr Leu Glu Asp Thr		
35	40	45

Val Asp Thr Glu Ala Met Gln Pro Ser Thr His Thr Ala Val Thr		
50	55	60

Asn Val Arg Thr Ser Ile Ser Gly His Glu Ser Gln Ser Ser Val		
65	70	75

Leu Ser Asp Ser Glu Thr Pro Lys Ala Thr Ser Pro Met Gly Thr		
80	85	90

Thr Tyr Thr Met Gly Glu Thr Ser Val Ser Ile Ser Thr Ser Asp		
95	100	105

Phe Phe Glu Thr Ser Arg Ile Gln Ile Glu Pro Thr Ser Ser Leu		
110	115	120

Thr Ser Gly Leu Arg Glu Thr Ser Ser Ser Glu Arg Ile Ser Ser		
125	130	135

Ala Thr Glu Gly Ser Thr Val Leu Ser Glu Val Pro Ser Gly Ala		
140	145	150

Thr Thr Glu Val Ser Arg Thr Glu Val Ile Ser Ser Arg Gly Thr		
155	160	165

Ser Met Ser Gly Pro Asp Gln Phe Thr Ile Ser Pro Asp Ile Ser		
170	175	180

Thr Glu Ala Ile Thr Arg Leu Ser Thr Ser Pro Ile Met Thr Glu		
185	190	195

Ser Ala Glu Ser Ala Ile Thr Ile Glu Thr Gly Ser Pro Gly Ala		
200	205	210

## ES 2 605 443 T3

Thr Ser Glu Gly Thr Leu Thr Leu Asp Thr Ser Thr Thr Thr Phe  
 215 220 225  
 Trp Ser Gly Thr His Ser Thr Ala Ser Pro Gly Phe Ser His Ser  
 230 235 240  
 Glu Met Thr Thr Leu Met Ser Arg Thr Pro Gly Asp Val Pro Trp  
 245 250 255  
 Pro Ser Leu Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Ser Val Ser Ser Ser  
 260 265 270  
 Leu Ser Ser Pro Ala Met Thr Ser Thr Ser Phe Phe Ser Thr Leu  
 275 280 285  
 Pro Glu Ser Ile Ser Ser Ser Pro His Pro Val Thr Ala Leu Leu  
 290 295 300  
 Thr Leu Gly Pro Val Lys Thr Thr Asp Met Leu Arg Thr Ser Ser  
 305 310 315  
 Glu Pro Glu Thr Ser Ser Pro Pro Asn Leu Ser Ser Thr Ser Ala  
 320 325 330  
 Glu Ile Leu Ala Thr Ser Glu Val Thr Lys Asp Arg Glu Lys Ile  
 335 340 345  
 His Pro Ser Ser Asn Thr Pro Val Val Asn Val Gly Thr Val Ile  
 350 355 360  
 Tyr Lys His Leu Ser Pro Ser Ser Val Leu Ala Asp Leu Val Thr  
 365 370 375  
 Thr Lys Pro Thr Ser Pro Met Ala Thr Thr Ser Thr Leu Gly Asn  
 380 385 390  
 Thr Ser Val Ser Thr Ser Thr Pro Ala Phe Pro Glu Thr Met Met  
 395 400 405  
 Thr Gln Pro Thr Ser Ser Leu Thr Ser Gly Leu Arg Glu Ile Ser  
 410 415 420  
 Thr Ser Gln Glu Thr Ser Ser Ala Thr Glu Arg Ser Ala Ser Leu  
 425 430 435  
 Ser Gly Met Pro Thr Gly Ala Thr Thr Lys Val Ser Arg Thr Glu  
 440 445 450  
 Ala Leu Ser Leu Gly Arg Thr Ser Thr Pro Gly Pro Ala Gln Ser  
 455 460 465  
 Thr Ile Ser Pro Glu Ile Ser Thr Glu Thr Ile Thr Arg Ile Ser  
 470 475 480  
 Thr Pro Leu Thr Thr Gly Ser Ala Glu Met Thr Ile Thr Pro  
 485 490 495  
 Lys Thr Gly His Ser Gly Ala Ser Ser Gln Gly Thr Phe Thr Leu  
 500 505 510

## ES 2 605 443 T3

Asp Thr Ser Ser Arg Ala Ser Trp Pro Gly Thr His Ser Ala Ala  
 515 520 525  
 Thr His Arg Ser Pro His Ser Gly Met Thr Thr Pro Met Ser Arg  
 530 535 540  
 Gly Pro Glu Asp Val Ser Trp Pro Ser Arg Pro Ser Val Glu Lys  
 545 550 555  
 Thr Ser Pro Pro Ser Ser Leu Val Ser Leu Ser Ala Val Thr Ser  
 560 565 570  
 Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Thr Pro Ser Glu Ser Ser His Ser Ser  
 575 580 585  
 Pro Leu Arg Val Thr Ser Leu Phe Thr Pro Val Met Met Lys Thr  
 590 595 600  
 Thr Asp Met Leu Asp Thr Ser Leu Glu Pro Val Thr Thr Ser Pro  
 605 610 615  
 Pro Ser Met Asn Ile Thr Ser Asp Glu Ser Leu Ala Thr Ser Lys  
 620 625 630  
 Ala Thr Met Glu Thr Glu Ala Ile Gln Leu Ser Glu Asn Thr Ala  
 635 640 645  
 Val Thr Gln Met Gly Thr Ile Ser Ala Arg Gln Glu Phe Tyr Ser  
 650 655 660  
 Ser Tyr Pro Gly Leu Pro Glu Pro Ser Lys Val Thr Ser Pro Val  
 665 670 675  
 Val Thr Ser Ser Thr Ile Lys Asp Ile Val Ser Thr Thr Ile Pro  
 680 685 690  
 Ala Ser Ser Glu Ile Thr Arg Ile Glu Met Glu Ser Thr Ser Thr  
 695 700 705  
 Leu Thr Pro Thr Pro Arg Glu Thr Ser Thr Ser Gln Glu Ile His  
 710 715 720  
 Ser Ala Thr Lys Pro Ser Thr Val Pro Tyr Lys Ala Leu Thr Ser  
 725 730 735  
 Ala Thr Ile Glu Asp Ser Met Thr Gln Val Met Ser Ser Ser Arg  
 740 745 750  
 Gly Pro Ser Pro Asp Gln Ser Thr Met Ser Gln Asp Ile Ser Thr  
 755 760 765  
 Glu Val Ile Thr Arg Leu Ser Thr Ser Pro Ile Lys Thr Glu Ser  
 770 775 780  
 Thr Glu Met Thr Ile Thr Thr Gln Thr Gly Ser Pro Gly Ala Thr  
 785 790 795  
 Ser Arg Gly Thr Leu Thr Leu Asp Thr Ser Thr Thr Phe Met Ser  
 800 805 810  
 Gly Thr His Ser Thr Ala Ser Gln Gly Phe Ser His Ser Gln Met

## ES 2 605 443 T3

815	820	825
Thr Ala Leu Met Ser Arg Thr Pro Gly Glu Val Pro Trp Leu Ser		
830	835	840
His Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Ser		
845	850	855
Ser Pro Val Met Thr Ser Ser Ser Pro Val Ser Ser Thr Leu Pro		
860	865	870
Asp Ser Ile His Ser Ser Ser Leu Pro Val Thr Ser Leu Leu Thr		
875	880	885
Ser Gly Leu Val Lys Thr Thr Glu Leu Leu Gly Thr Ser Ser Glu		
890	895	900
Pro Glu Thr Ser Ser Pro Pro Asn Leu Ser Ser Thr Ser Ala Glu		
905	910	915
Ile Leu Ala Thr Thr Glu Val Thr Thr Asp Thr Glu Lys Leu Glu		
920	925	930
Met Thr Asn Val Val Thr Ser Gly Tyr Thr His Glu Ser Pro Ser		
935	940	945
Ser Val Leu Ala Asp Ser Val Thr Thr Lys Ala Thr Ser Ser Met		
950	955	960
Gly Ile Thr Tyr Pro Thr Gly Asp Thr Asn Val Leu Thr Ser Thr		
965	970	975
Pro Ala Phe Ser Asp Thr Ser Arg Ile Gln Thr Lys Ser Lys Leu		
980	985	990
Ser Leu Thr Pro Gly Leu Met Glu Thr Ser Ile Ser Glu Glu Thr		
995	1000	1005
Ser Ser Ala Thr Glu Lys Ser Thr Val Leu Ser Ser Val Pro Thr		
1010	1015	1020
Gly Ala Thr Thr Glu Val Ser Arg Thr Glu Ala Ile Ser Ser Ser		
1025	1030	1035
Arg Thr Ser Ile Pro Gly Pro Ala Gln Ser Thr Met Ser Ser Asp		
1040	1045	1050
Thr Ser Met Glu Thr Ile Thr Arg Ile Ser Thr Pro Leu Thr Arg		
1055	1060	1065
Lys Glu Ser Thr Asp Met Ala Ile Thr Pro Lys Thr Gly Pro Ser		
1070	1075	1080
Gly Ala Thr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Leu Asp Ser Ser Ser Thr		
1085	1090	1095
Ala Ser Trp Pro Gly Thr His Ser Ala Thr Thr Gln Arg Phe Pro		
1100	1105	1110
Arg Ser Val Val Thr Thr Pro Met Ser Arg Gly Pro Glu Asp Val		
1115	1120	1125

Ser Trp Pro Ser Pro Leu Ser Val Glu Lys Asn Ser Pro Pro Ser  
 1130 1135 1140  
 Ser Leu Val Ser Ser Ser Val Thr Ser Pro Ser Pro Leu Tyr  
 1145 1150 1155  
 Ser Thr Pro Ser Gly Ser Ser His Ser Ser Pro Val Pro Val Thr  
 1160 1165 1170  
 Ser Leu Phe Thr Ser Ile Met Met Lys Ala Thr Asp Met Leu Asp  
 1175 1180 1185  
 Ala Ser Leu Glu Pro Glu Thr Thr Ser Ala Pro Asn Met Asn Ile  
 1190 1195 1200  
 Thr Ser Asp Glu Ser Leu Ala Ala Ser Lys Ala Thr Thr Glu Thr  
 1205 1210 1215  
 Glu Ala Ile His Val Phe Glu Asn Thr Ala Ala Ser His Val Glu  
 1220 1225 1230  
 Thr Thr Ser Ala Thr Glu Glu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro Gly Phe  
 1235 1240 1245  
 Ser Glu Pro Thr Lys Val Ile Ser Pro Val Val Thr Ser Ser Ser  
 1250 1255 1260  
 Ile Arg Asp Asn Met Val Ser Thr Thr Met Pro Gly Ser Ser Gly  
 1265 1270 1275  
 Ile Thr Arg Ile Glu Ile Glu Ser Met Ser Ser Leu Thr Pro Gly  
 1280 1285 1290  
 Leu Arg Glu Thr Arg Thr Ser Gln Asp Ile Thr Ser Ser Thr Glu  
 1295 1300 1305  
 Thr Ser Thr Val Leu Tyr Lys Met Pro Ser Gly Ala Thr Pro Glu  
 1310 1315 1320  
 Val Ser Arg Thr Glu Val Met Pro Ser Ser Arg Thr Ser Ile Pro  
 1325 1330 1335  
 Gly Pro Ala Gln Ser Thr Met Ser Leu Asp Ile Ser Asp Glu Val  
 1340 1345 1350  
 Val Thr Arg Leu Ser Thr Ser Pro Ile Met Thr Glu Ser Ala Glu  
 1355 1360 1365  
 Ile Thr Ile Thr Thr Gln Thr Gly Tyr Ser Leu Ala Thr Ser Gln  
 1370 1375 1380  
 Val Thr Leu Pro Leu Gly Thr Ser Met Thr Phe Leu Ser Gly Thr  
 1385 1390 1395  
 His Ser Thr Met Ser Gln Gly Leu Ser His Ser Glu Met Thr Asn  
 1400 1405 1410  
 Leu Met Ser Arg Gly Pro Glu Ser Leu Ser Trp Thr Ser Pro Arg  
 1415 1420 1425

## ES 2 605 443 T3

Phe Val Glu Thr Thr Arg Ser Ser Ser Ser Leu Thr Ser Leu Pro  
 1430 1435 1440  
 Leu Thr Thr Ser Leu Ser Pro Val Ser Ser Thr Leu Leu Asp Ser  
 1445 1450 1455  
 Ser Pro Ser Ser Pro Leu Pro Val Thr Ser Leu Ile Leu Pro Gly  
 1460 1465 1470  
 Leu Val Lys Thr Thr Glu Val Leu Asp Thr Ser Ser Glu Pro Lys  
 1475 1480 1485  
 Thr Ser Ser Ser Pro Asn Leu Ser Ser Thr Ser Val Glu Ile Pro  
 1490 1495 1500  
 Ala Thr Ser Glu Ile Met Thr Asp Thr Glu Lys Ile His Pro Ser  
 1505 1510 1515  
 Ser Asn Thr Ala Val Ala Lys Val Arg Thr Ser Ser Ser Val His  
 1520 1525 1530  
 Glu Ser His Ser Ser Val Leu Ala Asp Ser Glu Thr Thr Ile Thr  
 1535 1540 1545  
 Ile Pro Ser Met Gly Ile Thr Ser Ala Val Glu Asp Thr Thr Val  
 1550 1555 1560  
 Phe Thr Ser Asn Pro Ala Phe Ser Glu Thr Arg Arg Ile Pro Thr  
 1565 1570 1575  
 Glu Pro Thr Phe Ser Leu Thr Pro Gly Phe Arg Glu Thr Ser Thr  
 1580 1585 1590  
 Ser Glu Glu Thr Thr Ser Ile Thr Glu Thr Ser Ala Val Leu Phe  
 1595 1600 1605  
 Gly Val Pro Thr Ser Ala Thr Thr Glu Val Ser Met Thr Glu Ile  
 1610 1615 1620  
 Met Ser Ser Asn Arg Thr His Ile Pro Asp Ser Asp Gln Ser Thr  
 1625 1630 1635  
 Met Ser Pro Asp Ile Ile Thr Glu Val Ile Thr Arg Leu Ser Ser  
 1640 1645 1650  
 Ser Ser Met Met Ser Glu Ser Thr Gln Met Thr Ile Thr Thr Gln  
 1655 1660 1665  
 Lys Ser Ser Pro Gly Ala Thr Ala Gln Ser Thr Leu Thr Leu Ala  
 1670 1675 1680  
 Thr Thr Thr Ala Pro Leu Ala Arg Thr His Ser Thr Val Pro Pro  
 1685 1690 1695  
 Arg Phe Leu His Ser Glu Met Thr Thr Leu Met Ser Arg Ser Pro  
 1700 1705 1710  
 Glu Asn Pro Ser Trp Lys Ser Ser Pro Phe Val Glu Lys Thr Ser  
 1715 1720 1725  
 Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser Leu Pro Val Thr Thr Ser Pro Ser

1730	1735	1740
Val Ser Ser Thr Leu Pro Gin Ser Ile Pro Ser Ser Ser Phe Ser		
1745	1750	1755
Val Thr Ser Leu Leu Thr Pro Gly Met Val Lys Thr Thr Asp Thr		
1760	1765	1770
Ser Thr Glu Pro Gly Thr Ser Leu Ser Pro Asn Leu Ser Gly Thr		
1775	1780	1785
Ser Val Glu Ile Leu Ala Ala Ser Glu Val Thr Thr Asp Thr Glu		
1790	1795	1800
Lys Ile His Pro Ser Ser Ser Met Ala Val Thr Asn Val Gly Thr		
1805	1810	1815
Thr Ser Ser Gly His Glu Leu Tyr Ser Sex Val Ser Ile His Ser		
1820	1825	1830
Glu Pro Ser Lys Ala Thr Tyr Pro Val Gly Thr Pro Ser Ser Met		
1835	1840	1845
Ala Glu Thr Ser Ile Ser Thr Ser Met Pro Ala Asn Phe Glu Thr		
1850	1855	1860
Thr Gly Phe Glu Ala Glu Pro Phe Ser His Leu Thr Ser Gly Leu		
1865	1870	1875
Arg Lys Thr Asn Met Ser Leu Asp Thr Ser Ser Val Thr Pro Thr		
1880	1885	1890
Asn Thr Pro Ser Ser Pro Gly Ser Thr His Leu Leu Gln Ser Ser		
1895	1900	1905
Lys Thr Asp Phe Thr Ser Ser Ala Lys Thr Ser Ser Pro Asp Trp		
1910	1915	1920
Pro Pro Ala Ser Gln Tyr Thr Glu Ile Pro Val Asp Ile Ile Thr		
1925	1930	1935
Pro Phe Asn Ala Ser Pro Ser Ile Thr Glu Ser Thr Gly Ile Thr		
1940	1945	1950
Ser Phe Pro Glu Ser Arg Phe Thr Met Ser Val Thr Glu Ser Thr		
1955	1960	1965
His His Leu Ser Thr Asp Leu Leu Pro Ser Ala Glu Thr Ile Ser		
1970	1975	1980
Thr Gly Thr Val Met Pro Ser Leu Ser Glu Ala Met Thr Ser Phe		
1985	1990	1995
Ala Thr Thr Gly Val Pro Arg Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Pro		
2000	2005	2010
Phe Ser Arg Thr Glu Ser Gly Pro Gly Asp Ala Thr Leu Ser Thr		
2015	2020	2025
Ile Ala Glu Ser Leu Pro Ser Ser Thr Pro Val Pro Phe Ser Ser		
2030	2035	2040

## ES 2 605 443 T3

Ser Thr Phe Thr Thr Asp Ser Ser Thr Ile Pro Ala Leu His  
    2045   2050   2055  
  
 Glu Ile Thr Ser Ser Ser Ala Thr Pro Tyr Arg Val Asp Thr Ser  
    2060   2065   2070  
  
 Leu Gly Thr Glu Ser Ser Thr Thr Glu Gly Arg Leu Val Met Val  
    2075   2080   2085  
  
 Ser Thr Leu Asp Thr Ser Ser Gln Pro Gly Arg Thr Ser Ser Ser  
    2090   2095   2100  
  
 Pro Ile Leu Asp Thr Arg Met Thr Glu Ser Val Glu Leu Gly Thr  
    2105   2110   2115  
  
 Val Thr Ser Ala Tyr Gin Val Pro Ser Leu Ser Thr Arg Leu Thr  
    2120   2125   2130  
  
 Arg Thr Asp Gly Ile Met Glu His Ile Thr Lys Ile Pro Asn Glu  
    2135   2140   2145  
  
 Ala Ala His Arg Gly Thr Ile Arg Pro Val Lys Gly Pro Gln Thr  
    2150   2155   2160  
  
 Ser Thr Ser Pro Ala Ser Pro Lys Gly Leu His Thr Gly Gly Thr  
    2165   2170   2175  
  
 Lys Arg Met Glu Thr Thr Thr Ala Leu Lys Thr Thr Thr Thr  
    2180   2185   2190  
  
 Ala Leu Lys Thr Thr Ser Arg Ala Thr Leu Thr Thr Ser Val Tyr  
    2195   2200   2205  
  
 Thr Pro Thr Leu Gly Thr Leu Thr Pro Leu Asn Ala Ser Met Gln  
    2210   2215   2220  
  
 Met Ala Ser Thr Ile Pro Thr Glu Met Met Ile Thr Thr Pro Tyr  
    2225   2230   2235  
  
 Val Phe Pro Asp Val Pro Glu Thr Thr Ser Ser Leu Ala Thr Ser  
    2240   2245   2250  
  
 Leu Gly Ala Glu Thr Ser Thr Ala Leu Pro Arg Thr Thr Pro Ser  
    2255   2260   2265  
  
 Val Phe Asn Arg Glu Ser Glu Thr Thr Ala Ser Leu Val Ser Arg  
    2270   2275   2280  
  
 Ser Gly Ala Glu Arg Ser Pro Val Ile Gln Thr Leu Asp Val Ser  
    2285   2290   2295  
  
 Ser Ser Glu Pro Asp Thr Thr Ala Ser Trp Val Ile His Pro Ala  
    2300   2305   2310  
  
 Glu Thr Ile Pro Thr Val Ser Lys Thr Thr Pro Asn Phe Phe His  
    2315   2320   2325  
  
 Ser Glu Leu Asp Thr Val Ser Ser Thr Ala Thr Ser His Gly Ala  
    2330   2335   2340

## ES 2 605 443 T3

Asp Val Ser Ser Ala Ile Pro Thr Asn Ile Ser Pro Ser Glu Leu  
 2345 2350 2355  
 Asp Ala Leu Thr Pro Leu Val Thr Ile Ser Gly Thr Asp Thr Ser  
 2360 2365 2370  
 Thr Thr Phe Pro Thr Leu Thr Lys Ser Pro His Glu Thr Glu Thr  
 2375 2380 2385  
 Arg Thr Thr Trp Leu Thr His Pro Ala Glu Thr Ser Ser Thr Ile  
 2390 2395 2400  
 Pro Arg Thr Ile Pro Asn Phe Ser His His Glu Ser Asp Ala Thr  
 2405 2410 2415  
 Pro Ser Ile Ala Thr Ser Pro Gly Ala Glu Thr Ser Ser Ala Ile  
 2420 2425 2430  
 Pro Ile Met Thr Val Ser Pro Gly Ala Glu Asp Leu Val Thr Ser  
 2435 2440 2445  
 Gln Val Thr Ser Ser Gly Thr Asp Arg Asn Met Thr Ile Pro Thr  
 2450 2455 2460  
 Leu Thr Leu Ser Pro Gly Glu Pro Lys Thr Ile Ala Ser Leu Val  
 2465 2470 2475  
 Thr His Pro Glu Ala Gln Thr Ser Ser Ala Ile Pro Thr Ser Thr  
 2480 2485 2490  
 Ile Ser Pro Ala Val Ser Arg Leu Val Thr Ser Met Val Thr Ser  
 2495 2500 2505  
 Leu Ala Ala Lys Thr Ser Thr Thr Asn Arg Ala Leu Thr Asn Ser  
 2510 2515 2520  
 Pro Gly Glu Pro Ala Thr Thr Val Ser Leu Val Thr His Ser Ala  
 2525 2530 2535  
 Gln Thr Ser Pro Thr Val Pro Trp Thr Thr Ser Ile Phe Phe His  
 2540 2545 2550  
 Ser Lys Ser Asp Thr Thr Pro Ser Met Thr Thr Ser His Gly Ala  
 2555 2560 2565  
 Glu Ser Ser Ser Ala Val Pro Thr Pro Thr Val Ser Thr Glu Val  
 2570 2575 2580  
 Pro Gly Val Val Thr Pro Leu Val Thr Ser Ser Arg Ala Val Ile  
 2585 2590 2595  
 Ser Thr Thr Ile Pro Ile Leu Thr Leu Ser Pro Gly Glu Pro Glu  
 2600 2605 2610  
 Thr Thr Pro Ser Met Ala Thr Ser His Gly Glu Glu Ala Ser Ser  
 2615 2620 2625  
 Ala Ile Pro Thr Pro Thr Val Ser Pro Gly Val Pro Gly Val Val  
 2630 2635 2640  
 Thr Ser Leu Val Thr Ser Ser Arg Ala Val Thr Ser Thr Ile

## ES 2 605 443 T3

2645	2650	2655
Pro Ile Leu Thr Phe Ser Leu Gly Glu Pro Glu Thr Thr Pro Ser		
2660	2665	2670
Met Ala Thr Ser His Gly Thr Glu Ala Gly Ser Ala Val Pro Thr		
2675	2680	2685
Val Leu Pro Glu Val Pro Gly Met Val Thr Ser Leu Val Ala Ser		
2690	2695	2700
Ser Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Leu Pro Thr Leu Thr Leu Ser		
2705	2710	2715
Pro Gly Glu Pro Glu Thr Thr Pro Ser Met Ala Thr Ser His Gly		
2720	2725	2730
Ala Glu Ala Ser Ser Thr Val Pro Thr Val Ser Pro Glu Val Pro		
2735	2740	2745
Gly Val Val Thr Ser Leu Val Thr Ser Ser Ser Gly Val Asn Ser		
2750	2755	2760
Thr Ser Ile Pro Thr Leu Ile Leu Ser Pro Gly Glu Leu Glu Thr		
2765	2770	2775
Thr Pro Ser Met Ala Thr Ser His Gly Ala Glu Ala Ser Ser Ala		
2780	2785	2790
Val Pro Thr Pro Thr Val Ser Pro Gly Val Ser Gly Val Val Thr		
2795	2800	2805
Pro Leu Val Thr Ser Ser Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Ile Pro		
2810	2815	2820
Ile Leu Thr Leu Ser Ser Ser Glu Pro Glu Thr Thr Pro Ser Met		
2825	2830	2835
Ala Thr Ser His Gly Val Glu Ala Ser Ser Ala Val Leu Thr Val		
2840	2845	2850
Ser Pro Glu Val Pro Gly Met Val Thr Phe Leu Val Thr Ser Ser		
2855	2860	2865
Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Ile Pro Thr Leu Thr Ile Ser Ser		
2870	2875	2880
Asp Glu Pro Glu Thr Thr Ser Leu Val Thr His Ser Glu Ala		
2885	2890	2895
Lys Met Ile Ser Ala Ile Pro Thr Leu Gly Val Ser Pro Thr Val		
2900	2905	2910
Gln Gly Leu Val Thr Ser Leu Val Thr Ser Ser Gly Ser Glu Thr		
2915	2920	2925
Ser Ala Phe Ser Asn Leu Thr Val Ala Ser Ser Gln Pro Glu Thr		
2930	2935	2940
Ile Asp Ser Trp Val Ala His Pro Gly Thr Glu Ala Ser Ser Val		
2945	2950	2955

## ES 2 605 443 T3

Val Pro Thr Leu Thr Val Ser Thr Gly Glu Pro Phe Thr Asn Ile  
 2960 2965 2970  
 Ser Leu Val Thr His Pro Ala Glu Ser Ser Ser Thr Leu Pro Arg  
 2975 2980 2985  
 Thr Thr Ser Arg Phe Ser His Ser Glu Leu Asp Thr Met Pro Ser  
 2990 2995 3000  
 Thr Val Thr Ser Pro Glu Ala Glu Ser Ser Ser Ala Ile Ser Thr  
 3005 3010 3015  
 Thr Ile Ser Pro Gly Ile Pro Gly Val Leu Thr Ser Leu Val Thr  
 3020 3025 3030  
 Ser Ser Gly Arg Asp Ile Ser Ala Thr Phe Pro Thr Val Pro Glu  
 3035 3040 3045  
 Ser Pro His Glu Ser Glu Ala Thr Ala Ser Trp Val Thr His Pro  
 3050 3055 3060  
 Ala Val Thr Ser Thr Thr Val Pro Arg Thr Thr Pro Asn Tyr Ser  
 3065 3070 3075  
 His Ser Glu Pro Asp Thr Thr Pro Ser Ile Ala Thr Ser Pro Gly  
 3080 3085 3090  
 Ala Glu Ala Thr Ser Asp Phe Pro Thr Ile Thr Val Ser Pro Asp  
 3095 3100 3105  
 Val Pro Asp Met Val Thr Ser Gln Val Thr Ser Ser Gly Thr Asp  
 3110 3115 3120  
 Thr Ser Ile Thr Ile Pro Thr Leu Thr Leu Ser Ser Gly Glu Pro  
 3125 3130 3135  
 Glu Thr Thr Thr Ser Phe Ile Thr Tyr Ser Glu Thr His Thr Ser  
 3140 3145 3150  
 Ser Ala Ile Pro Thr Leu Pro Val Ser Pro Asp Ala Ser Lys Met  
 3155 3160 3165  
 Leu Thr Ser Leu Val Ile Ser Ser Gly Thr Asp Ser Thr Thr Thr  
 3170 3175 3180  
 Phe Pro Thr Leu Thr Glu Thr Pro Tyr Glu Pro Glu Thr Thr Ala  
 3185 3190 3195  
 Ile Gln Leu Ile His Pro Ala Glu Thr Asn Thr Met Val Pro Arg  
 3200 3205 3210  
 Thr Thr Pro Lys Phe Ser His Ser Lys Ser Asp Thr Thr Leu Pro  
 3215 3220 3225  
 Val Ala Ile Thr Ser Pro Gly Pro Glu Ala Ser Ser Ala Val Ser  
 3230 3235 3240  
 Thr Thr Thr Ile Ser Pro Asp Met Ser Asp Leu Val Thr Ser Leu  
 3245 3250 3255

Val Pro Ser Ser Gly Thr Asp Thr Ser Thr Thr Phe Pro Thr Leu  
 3260 3265 3270  
 Ser Glu Thr Pro Tyr Glu Pro Glu Thr Thr Ala Thr Trp Leu Thr  
 3275 3280 3285  
 His Pro Ala Glu Thr Ser Thr Thr Val Ser Gly Thr Ile Pro Asn  
 3290 3295 3300  
 Phe Ser His Arg Gly Ser Asp Thr Ala Pro Ser Met Val Thr Ser  
 3305 3310 3315  
 Pro Gly Val Asp Thr Arg Ser Gly Val Pro Thr Thr Thr Ile Pro  
 3320 3325 3330  
 Pro Ser Ile Pro Gly Val Val Thr Ser Gln Val Thr Ser Ser Ala  
 3335 3340 3345  
 Thr Asp Thr Ser Thr Ala Ile Pro Thr Leu Thr Pro Ser Pro Gly  
 3350 3355 3360  
 Glu Pro Glu Thr Thr Ala Ser Ser Ala Thr His Pro Gly Thr Gln  
 3365 3370 3375  
 Thr Gly Phe Thr Val Pro Ile Arg Thr Val Pro Ser Ser Glu Pro  
 3380 3385 3390  
 Asp Thr Met Ala Ser Trp Val Thr His Pro Pro Gln Thr Ser Thr  
 3395 3400 3405  
 Pro Val Ser Arg Thr Thr Ser Ser Phe Ser His Ser Ser Pro Asp  
 3410 3415 3420  
 Ala Thr Pro Val Met Ala Thr Ser Pro Arg Thr Glu Ala Ser Ser  
 3425 3430 3435  
 Ala Val Leu Thr Thr Ile Ser Pro Gly Ala Pro Glu Met Val Thr  
 3440 3445 3450  
 Ser Gln Ile Thr Ser Ser Gly Ala Ala Thr Ser Thr Thr Val Pro  
 3455 3460 3465  
 Thr Leu Thr His Ser Pro Gly Met Pro Glu Thr Thr Ala Leu Leu  
 3470 3475 3480  
 Ser Thr His Pro Arg Thr Glu Thr Ser Lys Thr Phe Pro Ala Ser  
 3485 3490 3495  
 Thr Val Phe Pro Gln Val Ser Glu Thr Thr Ala Ser Leu Thr Ile  
 3500 3505 3510  
 Arg Pro Gly Ala Glu Thr Ser Thr Ala Leu Pro Thr Gln Thr Thr  
 3515 3520 3525  
 Ser Ser Leu Phe Thr Leu Leu Val Thr Gly Thr Ser Arg Val Asp  
 3530 3535 3540  
 Leu Ser Pro Thr Ala Ser Pro Gly Val Ser Ala Lys Thr Ala Pro  
 3545 3550 3555  
 Leu Ser Thr His Pro Gly Thr Glu Thr Ser Thr Met Ile Pro Thr

## ES 2 605 443 T3

	3560	3565	3570
Ser Thr Leu Ser Leu Gly Leu Leu Glu Thr Thr Gly Leu Leu Ala			
3575	3580	3585	
Thr Ser Ser Ser Ala Glu Thr Ser Thr Ser Thr Leu Thr Leu Thr			
3590	3595	3600	
Val Ser Pro Ala Val Ser Gly Leu Ser Ser Ala Ser Ile Thr Thr			
3605	3610	3615	
Asp Lys Pro Gln Thr Val Thr Ser Trp Asn Thr Glu Thr Ser Pro			
3620	3625	3630	
Ser Val Thr Ser Val Gly Pro Pro Glu Phe Ser Arg Thr Val Thr			
3635	3640	3645	
Gly Thr Thr Met Thr Leu Ile Pro Ser Glu Met Pro Thr Pro Pro			
3650	3655	3660	
Lys Thr Ser His Gly Glu Gly Val Ser Pro Thr Thr Ile Leu Arg			
3665	3670	3675	
Thr Thr Met Val Glu Ala Thr Asn Leu Ala Thr Thr Gly Ser Ser			
3680	3685	3690	
Pro Thr Val Ala Lys Thr Thr Thr Phe Asn Thr Leu Ala Gly			
3695	3700	3705	
Ser Leu Phe Thr Pro Leu Thr Thr Pro Gly Met Ser Thr Leu Ala			
3710	3715	3720	
Ser Glu Ser Val Thr Ser Arg Thr Ser Tyr Asn His Arg Ser Trp			
3725	3730	3735	
Ile Ser Thr Thr Ser Ser Tyr Asn Arg Arg Tyr Trp Thr Pro Ala			
3740	3745	3750	
Thr Ser Thr Pro Val Thr Ser Thr Phe Ser Pro Gly Ile Ser Thr			
3755	3760	3765	
Ser Ser Ile Pro Ser Ser Thr Ala Ala Thr Val Pro Phe Met Val			
3770	3775	3780	
Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Glu Glu			
3785	3790	3795	
Asp Met Arg His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Ala Thr Glu Arg			
3800	3805	3810	
Glu Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu Phe Arg Asn Ser Ser Leu			
3815	3820	3825	
Glu Tyr Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Ala Ser Leu Arg Pro Glu			
3830	3835	3840	
Lys Asp Ser Ser Ala Thr Ala Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg			
3845	3850	3855	
Pro Asp Pro Glu Asp Leu Gly Leu Asp Arg Glu Arg Leu Tyr Trp			
3860	3865	3870	

## ES 2 605 443 T3

Glu Leu Ser Asn Leu Thr Asn Gly Ile Gln Glu Leu Gly Pro Tyr  
 3875 3880 3885  
 Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg  
 3890 3895 3900  
 Ser Ser Met Pro Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser Thr Val Asp  
 3905 3910 3915  
 Val Gly Thr Ser Gly Thr Pro Ser Ser Pro Ser Pro Thr Thr  
 3920 3925 3930  
 Ala Gly Pro Leu Leu Met Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr  
 3935 3940 3945  
 Asn Leu Gln Tyr Glu Glu Asp Met Arg Arg Thr Gly Ser Arg Lys  
 3950 3955 3960  
 Phe Asn Thr Met Glu Ser Val Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu  
 3965 3970 3975  
 Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu  
 3980 3985 3990  
 Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp  
 3995 4000 4005  
 Ala Ile Cys Thr His Arg Leu Asp Pro Lys Ser Pro Gly Leu Asn  
 4010 4015 4020  
 Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Lys Leu Thr Asn Asp Ile  
 4025 4030 4035  
 Glu Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val  
 4040 4045 4050  
 Asn Gly Phe Thr His Gln Ser Ser Val Ser Thr Thr Ser Thr Pro  
 4055 4060 4065  
 Gly Thr Ser Thr Val Asp Leu Arg Thr Ser Gly Thr Pro Ser Ser  
 4070 4075 4080  
 Leu Ser Ser Pro Thr Ile Met Ala Ala Gly Pro Leu Leu Val Pro  
 4085 4090 4095  
 Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Glu Asp  
 4100 4105 4110  
 Met Gly His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val  
 4115 4120 4125  
 Leu Gln Gly Leu Leu Gly Pro Ile Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly  
 4130 4135 4140  
 Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Ser Leu Arg Ser Glu Lys  
 4145 4150 4155  
 Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys Ile His His Leu  
 4160 4165 4170

## ES 2 605 443 T3

Asp Pro Lys Ser Pro Gly Leu Asn Arg Glu Arg Leu Tyr Trp Glu  
                   4175                  4180                  4185  
  
 Leu Ser Gln Leu Thr Asn Gly Ile Lys Glu Leu Gly Pro Tyr Thr  
                   4190                  4195                  4200  
  
 Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Thr  
                   4205                  4210                  4215  
  
 Ser Val Pro Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser Thr Val Asp Leu  
                   4220                  4225                  4230  
  
 Gly Thr Ser Gly Thr Pro Phe Ser Leu Pro Ser Pro Ala Thr Ala  
                   4235                  4240                  4245  
  
 Gly Pro Leu Leu Val Leu Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn  
                   4250                  4255                  4260  
  
 Leu Lys Tyr Glu Glu Asp Met His Arg Pro Gly Ser Arg Lys Phe  
                   4265                  4270                  4275  
  
 Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Thr Leu Val Gly Pro Met Phe  
                   4280                  4285                  4290  
  
 Lys Asn Thr Ser Val Gly Leu Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr  
                   4295                  4300                  4305  
  
 Leu Leu Arg Ser Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp Ala  
                   4310                  4315                  4320  
  
 Ile Cys Thr His Arg Leu Asp Pro Lys Ser Pro Gly Val Asp Arg  
                   4325                  4330                  4335  
  
 Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr Asn Gly Ile Lys  
                   4340                  4345                  4350  
  
 Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn  
                   4355                  4360                  4365  
  
 Gly Phe Thr His Trp Ile Pro Val Pro Thr Ser Ser Thr Pro Gly  
                   4370                  4375                  4380  
  
 Thr Ser Thr Val Asp Leu Gly Ser Gly Thr Pro Ser Ser Leu Pro  
                   4385                  4390                  4395  
  
 Ser Pro Thr Ser Ala Thr Ala Gly Pro Leu Leu Val Pro Phe Thr  
                   4400                  4405                  4410  
  
 Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Lys Tyr Glu Glu Asp Met His  
                   4415                  4420                  4425  
  
 Cys Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln  
                   4430                  4435                  4440  
  
 Ser Leu Leu Gly Pro Met Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu  
                   4445                  4450                  4455  
  
 Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Ser Glu Lys Asp Gly  
                   4460                  4465                  4470  
  
 Ala Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg Leu Asp Pro

## ES 2 605 443 T3

4475	4480	4485
Lys Ser Pro Gly Val Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser		
4490	4495	4500
Gln Leu Thr Asn Gly Ile Lys Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp		
4505	4510	4515
Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Gln Thr Ser Ala		
4520	4525	4530
Pro Asn Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser Thr Val Asp Leu Gly Thr		
4535	4540	4545
Ser Gly Thr Pro Ser Ser Leu Pro Ser Pro Thr Ser Ala Gly Pro		
4550	4555	4560
Leu Leu Val Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln		
4565	4570	4575
Tyr Glu Glu Asp Met His His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr		
4580	4585	4590
Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Gly Pro Met Phe Lys Asn		
4595	4600	4605
Thr Ser Val Gly Leu Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu		
4610	4615	4620
Arg Pro Glu Lys Asn Gly Ala Ala Thr Gly Met Asp Ala Ile Cys		
4625	4630	4635
Ser His Arg Leu Asp Pro Lys Ser Pro Gly Leu Asn Arg Glu Gln		
4640	4645	4650
Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Gly Ile Lys Glu Leu		
4655	4660	4665
Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe		
4670	4675	4680
Thr His Arg Ser Ser Val Ala Pro Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser		
4685	4690	4695
Thr Val Asp Leu Gly Thr Ser Gly Thr Pro Ser Ser Leu Pro Ser		
4700	4705	4710
Pro Thr Thr Ala Val Pro Leu Leu Val Pro Phe Thr Leu Asn Phe		
4715	4720	4725
Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Glu Asp Met Arg His Pro Gly		
4730	4735	4740
Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu		
4745	4750	4755
Gly Pro Leu Phe Lys Asn Ser Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly		
4760	4765	4770
Cys Arg Leu Ile Ser Leu Arg Ser Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr		
4775	4780	4785

## ES 2 605 443 T3

Gly Val Asp Ala Ile Cys Thr His His Leu Asn Pro Gln Ser Pro  
 4790 4795 4800  
 Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Gln Leu Ser Gln Met Thr  
 4805 4810 4815  
 Asn Gly Ile Lys Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser  
 4820 4825 4830  
 Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Ser Ser Gly Leu Thr Thr  
 4835 4840 4845  
 Ser Thr Pro Trp Thr Ser Thr Val Asp Leu Gly Thr Ser Gly Thr  
 4850 4855 4860  
 Pro Ser Pro Val Pro Ser Pro Thr Thr Ala Gly Pro Leu Leu Val  
 4865 4870 4875  
 Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Glu Glu  
 4880 4885 4890  
 Asp Met His Arg Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Ala Thr Glu Arg  
 4895 4900 4905  
 Val Leu Gln Gly Leu Leu Ser Pro Ile Phe Lys Asn Ser Ser Val  
 4910 4915 4920  
 Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Ser Leu Arg Pro Glu  
 4925 4930 4935  
 Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Met Asp Ala Val Cys Leu Tyr His  
 4940 4945 4950  
 Pro Asn Pro Lys Arg Pro Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp  
 4955 4960 4965  
 Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Asn Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr  
 4970 4975 4980  
 Ser Leu Asp Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Gln  
 4985 4990 4995  
 Asn Ser Val Pro Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser Thr Val Tyr  
 5000 5005 5010  
 Trp Ala Thr Thr Gly Thr Pro Ser Ser Phe Pro Gly His Thr Glu  
 5015 5020 5025  
 Pro Gly Pro Leu Leu Ile Pro Phe Thr Phe Asn Phe Thr Ile Thr  
 5030 5035 5040  
 Asn Leu His Tyr Glu Glu Asn Met Gln His Pro Gly Ser Arg Lys  
 5045 5050 5055  
 Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu  
 5060 5065 5070  
 Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu  
 5075 5080 5085

## ES 2 605 443 T3

Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Gln Glu Ala Ala Thr Gly Val Asp  
 5090 5095 5100  
 Thr Ile Cys Thr His Arg Val Asp Pro Ile Gly Pro Gly Leu Asp  
 5105 5110 5115  
 Arg Glu Arg Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr Asn Ser Ile  
 5120 5125 5130  
 Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asp Ser Leu Tyr Val  
 5135 5140 5145  
 Asn Gly Phe Asn Pro Trp Ser Ser Val Pro Thr Thr Ser Thr Pro  
 5150 5155 5160  
 Gly Thr Ser Thr Val His Leu Ala Thr Ser Gly Thr Pro Ser Ser  
 5165 5170 5175  
 Leu Pro Gly His Thr Ala Pro Val Pro Leu Leu Ile Pro Phe Thr  
 5180 5185 5190  
 Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu His Tyr Glu Glu Asn Met Gln  
 5195 5200 5205  
 His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln  
 5210 5215 5220  
 Gly Leu Leu Lys Pro Leu Phe Lys Ser Thr Ser Val Gly Pro Leu  
 5225 5230 5235  
 Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys His Gly  
 5240 5245 5250  
 Ala Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys Thr Leu Arg Leu Asp Pro  
 5255 5260 5265  
 Thr Gly Pro Gly Leu Asp Arg Glu Arg Leu Tyr Trp Glu Leu Ser  
 5270 5275 5280  
 Gln Leu Thr Asn Ser Val Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp  
 5285 5290 5295  
 Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Ser Ser Val  
 5300 5305 5310  
 Pro Thr Thr Ser Ile Pro Gly Thr Ser Ala Val His Leu Glu Thr  
 5315 5320 5325  
 Ser Gly Thr Pro Ala Ser Leu Pro Gly His Thr Ala Pro Gly Pro  
 5330 5335 5340  
 Leu Leu Val Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln  
 5345 5350 5355  
 Tyr Glu Glu Asp Met Arg His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr  
 5360 5365 5370  
 Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu Phe Lys Ser  
 5375 5380 5385  
 Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu

## ES 2 605 443 T3

5390	5395	5400
Arg Pro Glu Lys Arg Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp Thr Ile Cys		
5405	5410	5415
Thr His Arg Leu Asp Pro Leu Asn Pro Gly Leu Asp Arg Glu Gln		
5420	5425	5430
Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Lys Leu Thr Arg Gly Ile Ile Glu Leu		
5435	5440	5445
Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Arg Gly Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe		
5450	5455	5460
Thr His Arg Asn Phe Val Pro Ile Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser		
5465	5470	5475
Thr Val His Leu Gly Thr Ser Glu Thr Pro Ser Ser Leu Pro Arg		
5480	5485	5490
Pro Ile Val Pro Gly Pro Leu Leu Val Pro Phe Thr Leu Asn Phe		
5495	5500	5505
Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Glu Glu Ala Met Arg His Pro Gly		
5510	5515	5520
Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu		
5525	5530	5535
Arg Pro Leu Phe Lys Asn Thr Ser Ile Gly Pro Leu Tyr Ser Ser		
5540	5545	5550
Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Asp Lys Ala Ala Thr		
5555	5560	5565
Arg Val Asp Ala Ile Cys Thr His His Pro Asp Pro Gln Ser Pro		
5570	5575	5580
Gly Leu Asn Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr		
5585	5590	5595
His Gly Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asp Ser		
5600	5605	5610
Leu Tyr Val Asp Gly Phe Thr His Trp Ser Pro Ile Pro Thr Thr		
5615	5620	5625
Ser Thr Pro Gly Thr Ser Ile Val Asn Leu Gly Thr Ser Gly Ile		
5630	5635	5640
Pro Pro Ser Leu Pro Glu Thr Thr Ala Thr Gly Pro Leu Leu Val		
5645	5650	5655
Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Glu Glu		
5660	5665	5670
Asn Met Gly His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Ile Thr Glu Ser		
5675	5680	5685
Val Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu Phe Lys Ser Thr Ser Val		
5690	5695	5700

## ES 2 605 443 T3

Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu  
 5705 5710 5715  
 Lys Asp Gly Val Ala Thr Arg Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg  
 5720 5725 5730  
 Pro Asp Pro Lys Ile Pro Gly Leu Asp Arg Gln Gln Leu Tyr Trp  
 5735 5740 5745  
 Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Ser Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr  
 5750 5755 5760  
 Thr Leu Asp Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr Gln Arg  
 5765 5770 5775  
 Ser Ser Val Pro Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Phe Thr Val Gln  
 5780 5785 5790  
 Pro Glu Thr Ser Glu Thr Pro Ser Ser Leu Pro Gly Pro Thr Ala  
 5795 5800 5805  
 Thr Gly Pro Val Leu Leu Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Ile  
 5810 5815 5820  
 Asn Leu Gln Tyr Glu Glu Asp Met His Arg Pro Gly Ser Arg Lys  
 5825 5830 5835  
 Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Met Pro Leu  
 5840 5845 5850  
 Phe Lys Asn Thr Ser Val Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu  
 5855 5860 5865  
 Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr Arg Val Asp  
 5870 5875 5880  
 Ala Val Cys Thr His Arg Pro Asp Pro Lys Ser Pro Gly Leu Asp  
 5885 5890 5895  
 Arg Glu Arg Leu Tyr Trp Lys Leu Ser Gln Leu Thr His Gly Ile  
 5900 5905 5910  
 Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg His Ser Leu Tyr Val  
 5915 5920 5925  
 Asn Gly Phe Thr His Gln Ser Ser Met Thr Thr Arg Thr Pro  
 5930 5935 5940  
 Asp Thr Ser Thr Met His Leu Ala Thr Ser Arg Thr Pro Ala Ser  
 5945 5950 5955  
 Leu Ser Gly Pro Thr Thr Ala Ser Pro Leu Leu Val Leu Phe Thr  
 5960 5965 5970  
 Ile Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Arg Tyr Glu Glu Asn Met His  
 5975 5980 5985  
 His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln  
 5990 5995 6000

## ES 2 605 443 T3

Gly Leu Leu Arg Pro Val Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu  
 6005 6010 6015  
 Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Lys Lys Asp Gly  
 6020 6025 6030  
 Ala Ala Thr Lys Val Asp Ala Ile Cys Thr Tyr Arg Pro Asp Pro  
 6035 6040 6045  
 Lys Ser Pro Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser  
 6050 6055 6060  
 Gln Leu Thr His Ser Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp  
 6065 6070 6075  
 Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr Gln Arg Ser Ser Val  
 6080 6085 6090  
 Pro Thr Thr Ser Ile Pro Gly Thr Pro Thr Val Asp Leu Gly Thr  
 6095 6100 6105  
 Ser Gly Thr Pro Val Ser Lys Pro Gly Pro Ser Ala Ala Ser Pro  
 6110 6115 6120  
 Leu Leu Val Leu Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Arg  
 6125 6130 6135  
 Tyr Glu Glu Asn Met Gln His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr  
 6140 6145 6150  
 Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Arg Ser Leu Phe Lys Ser  
 6155 6160 6165  
 Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu  
 6170 6175 6180  
 Arg Pro Glu Lys Asp Gly Thr Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys  
 6185 6190 6195  
 Thr His His Pro Asp Pro Lys Ser Pro Arg Leu Asp Arg Glu Gln  
 6200 6205 6210  
 Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Asn Ile Thr Glu Leu  
 6215 6220 6225  
 Gly Pro Tyr Ala Leu Asp Asn Asp Ser Leu Phe Val Asn Gly Phe  
 6230 6235 6240  
 Thr His Arg Ser Ser Val Ser Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Pro  
 6245 6250 6255  
 Thr Val Tyr Leu Gly Ala Ser Lys Thr Pro Ala Ser Ile Phe Gly  
 6260 6265 6270  
 Pro Ser Ala Ala Ser His Leu Leu Ile Leu Phe Thr Leu Asn Phe  
 6275 6280 6285  
 Thr Ile Thr Asn Leu Arg Tyr Glu Glu Asn Met Trp Pro Gly Ser  
 6290 6295 6300  
 Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Arg

## ES 2 605 443 T3

6305	6310	6315
Pro Leu Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys 6320	6325	6330
Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Glu Ala Thr Gly 6335	6340	6345
Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg Pro Asp Pro Thr Gly Pro Gly 6350	6355	6360
Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Thr His 6365	6370	6375
Ser Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asp Ser Leu 6380	6385	6390
Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Ser Ser Val Pro Thr Thr Ser 6395	6400	6405
Thr Gly Val Val Ser Glu Glu Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile 6410	6415	6420
Asn Asn Leu Arg Tyr Met Ala Asp Met Gly Gln Pro Gly Ser Leu 6425	6430	6435
Lys Phe Asn Ile Thr Asp Asn Val Met Gln His Leu Leu Ser Pro 6440	6445	6450
Leu Phe Gln Arg Ser Ser Leu Gly Ala Arg Tyr Thr Gly Cys Arg 6455	6460	6465
Val Ile Ala Leu Arg Ser Val Lys Asn Gly Ala Glu Thr Arg Val 6470	6475	6480
Asp Leu Leu Cys Thr Tyr Leu Gln Pro Leu Ser Gly Pro Gly Leu 6485	6490	6495
Pro Ile Lys Gln Val Phe His Glu Leu Ser Gln Gln Thr His Gly 6500	6505	6510
Ile Thr Arg Leu Gly Pro Tyr Ser Leu Asp Lys Asp Ser Leu Tyr 6515	6520	6525
Leu Asn Gly Tyr Asn Glu Pro Gly Pro Asp Glu Pro Pro Thr Thr 6530	6535	6540
Pro Lys Pro Ala Thr Thr Phe Leu Pro Pro Leu Ser Glu Ala Thr 6545	6550	6555
Thr Ala Met Gly Tyr His Leu Lys Thr Leu Thr Leu Asn Phe Thr 6560	6565	6570
Ile Ser Asn Leu Gln Tyr Ser Pro Asp Met Gly Lys Gly Ser Ala 6575	6580	6585
Thr Phe Asn Ser Thr Glu Gly Val Leu Gln His Leu Leu Arg Pro 6590	6595	6600
Leu Phe Gln Lys Ser Ser Met Gly Pro Phe Tyr Leu Gly Cys Gln 6605	6610	6615

## ES 2 605 443 T3

Leu Ile Ser Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val  
 6620 6625 6630  
 Asp Thr Thr Cys Thr Tyr His Pro Asp Pro Val Gly Pro Gly Leu  
 6635 6640 6645  
 Asp Ile Gln Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Gly  
 6650 6655 6660  
 Val Thr Gln Leu Gly Phe Tyr Val Leu Asp Arg Asp Ser Leu Phe  
 6665 6670 6675  
 Ile Asn Gly Tyr Ala Pro Gln Asn Leu Ser Ile Arg Gly Glu Tyr  
 6680 6685 6690  
 Gln Ile Asn Phe His Ile Val Asn Trp Asn Leu Ser Asn Pro Asp  
 6695 6700 6705  
 Pro Thr Ser Ser Glu Tyr Ile Thr Leu Leu Arg Asp Ile Gln Asp  
 6710 6715 6720  
 Lys Val Thr Thr Leu Tyr Lys Gly Ser Gln Leu His Asp Thr Phe  
 6725 6730 6735  
 Arg Phe Cys Leu Val Thr Asn Leu Thr Met Asp Ser Val Leu Val  
 6740 6745 6750  
 Thr Val Lys Ala Leu Phe Ser Ser Asn Leu Asp Pro Ser Leu Val  
 6755 6760 6765  
 Glu Gln Val Phe Leu Asp Lys Thr Leu Asn Ala Ser Phe His Trp  
 6770 6775 6780  
 Leu Gly Ser Thr Tyr Gln Leu Val Asp Ile His Val Thr Glu Met  
 6785 6790 6795  
 Glu Ser Ser Val Tyr Gln Pro Thr Ser Ser Ser Ser Thr Gln His  
 6800 6805 6810  
 Phe Tyr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Pro Tyr Ser Gln Asp  
 6815 6820 6825  
 Lys Ala Gln Pro Gly Thr Thr Asn Tyr Gln Arg Asn Lys Arg Asn  
 6830 6835 6840  
 Ile Glu Asp Ala Leu Asn Gln Leu Phe Arg Asn Ser Ser Ile Lys  
 6845 6850 6855  
 Ser Tyr Phe Ser Asp Cys Gln Val Ser Thr Phe Arg Ser Val Pro  
 6860 6865 6870  
 Asn Arg His His Thr Gly Val Asp Ser Leu Cys Asn Phe Ser Pro  
 6875 6880 6885  
 Leu Ala Arg Arg Val Asp Arg Val Ala Ile Tyr Glu Glu Phe Leu  
 6890 6895 6900  
 Arg Met Thr Arg Asn Gly Thr Gln Leu Gln Asn Phe Thr Leu Asp  
 6905 6910 6915

## ES 2 605 443 T3

Arg Ser Ser Val Leu Val Asp Gly Tyr Ser Pro Asn Arg Asn Glu  
 6920 6925 6930  
 Pro Leu Thr Gly Asn Ser Asp Leu Pro Phe Trp Ala Val Ile Leu  
 6935 6940 6945  
 Ile Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Leu Ile Thr Cys Leu Ile Cys  
 6950 6955 6960  
 Gly Val Leu Val Thr Thr Arg Arg Lys Lys Glu Gly Glu Tyr  
 6965 6970 6975  
 Asn Val Gln Gln Gln Cys Pro Gly Tyr Tyr Gln Ser His Leu Asp  
 6980 6985 6990  
 Leu Glu Asp Leu Gln  
 6995

<210> 5  
 <211> 622  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

<400> 5

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

## ES 2 605 443 T3

185	190	195
Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu	Leu Pro Arg Leu Val Ser	
200	205	210
Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln	Gln Glu Ala Ala Arg Ala	
215	220	225
Ala Leu Gln Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp		
230	235	240
Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu		
245	250	255
Gly Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala		
260	265	270
Trp Arg Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu		
275	280	285
Arg Thr Ile Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr		
290	295	300
Ala Cys Pro Ser Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu		
305	310	315
Ile Phe Tyr Lys Lys Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala		
320	325	330
Leu Leu Ala Thr Gln Met Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr		
335	340	345
Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr		
350	355	360
Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu		
365	370	375
Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile Arg Lys Trp Asn Val Thr		
380	385	390
Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu Val Asn Lys Gly His		
395	400	405
Glu Met Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val Lys		
410	415	420
Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala		
425	430	435
Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser		
440	445	450
Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu		
455	460	465
Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala		
470	475	480
Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys		
485	490	495

## ES 2 605 443 T3

Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala  
 500 505 510

Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys  
 515 520 525

Leu Arg Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gin  
 530 535 540

Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg  
 545 550 555

His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp  
 560 565 570

Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly  
 575 580 585

Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr  
 590 595 600

Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro Val Leu Thr Val Leu Ala Leu  
 605 610 615

Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala  
 620

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 690

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapien

&lt;400&gt; 6

Met Ala Pro Trp Pro Glu Leu Gly Asp Ala Gln Pro Asn Pro Asp  
 1 5 10 15

Lys Tyr Leu Glu Gly Ala Ala Gly Gln Gln Pro Thr Ala Pro Asp  
 20 25 30

Lys Ser Lys Glu Thr Asn Lys Thr Asp Asn Thr Glu Ala Pro Val  
 35 40 45

Thr Lys Ile Glu Leu Leu Pro Ser Tyr Ser Thr Ala Thr Leu Ile  
 50 55 60

Asp Glu Pro Thr Glu Val Asp Asp Pro Trp Asn Leu Pro Thr Leu  
 65 70 75

Gln Asp Ser Gly Ile Lys Trp Ser Glu Arg Asp Thr Lys Gly Lys  
 80 85 90

Ile Leu Cys Phe Phe Gln Gly Ile Gly Arg Leu Ile Leu Leu  
 95 100 105

Gly Phe Leu Tyr Phe Phe Val Cys Ser Leu Asp Ile Leu Ser Ser  
 110 115 120

Ala Phe Gln Leu Val Gly Gly Lys Met Ala Gly Gln Phe Phe Ser  
 125 130 135

## ES 2 605 443 T3

Asn Ser Ser Ile Met Ser Asn Pro Leu Leu Gly Leu Val Ile Gly  
 140 145 150  
 Val Leu Val Thr Val Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ser  
 155 160 165  
 Ile Val Val Ser Met Val Ser Ser Ser Leu Leu Thr Val Arg Ala  
 170 175 180  
 Ala Ile Pro Ile Ile Met Gly Ala Asn Ile Gly Thr Ser Ile Thr  
 185 190 195  
 Asn Thr Ile Val Ala Leu Met Gln Val Gly Asp Arg Ser Glu Phe  
 200 205 210  
 Arg Arg Ala Phe Ala Gly Ala Thr Val His Asp Phe Phe Asn Trp  
 215 220 225  
 Leu Ser Val Leu Val Leu Leu Pro Val .Glu Val Ala Thr His Tyr  
 230 235 240  
 Leu Glu Ile Ile Thr Gin Leu Ile Val Glu Ser Phe His Phe Lys  
 245 250 255  
 Asn Gly Glu Asp Ala Pro Asp Leu Leu Lys Val Ile Thr Lys Pro  
 260 265 270  
 Phe Thr Lys Leu Ile Val Gln Leu Asp Lys Lys Val Ile Ser Gln  
 275 280 285  
 Ile Ala Met Asn Asp Glu Lys Ala Lys Asn Lys Ser Leu Val Lys  
 290 295 300  
 Ile Trp Cys Lys Thr Phe Thr Asn Lys Thr Gln Ile Asn Val Thr  
 305 310 315  
 Val Pro Ser Thr Ala Asn Cys Thr Ser Pro Ser Leu Cys Trp Thr  
 320 325 330  
 Asp Gly Ile Gln Asn Trp Thr Met Lys Asn Val Thr Tyr Lys Glu  
 335 340 345  
 Asn Ile Ala Lys Cys Gln His Ile Phe Val Asn Phe His Leu Pro  
 350 355 360  
 Asp Leu Ala Val Gly Thr Ile Leu Leu Ile Leu Ser Leu Leu Val  
 365 370 375  
 Leu Cys Gly Cys Leu Ile Met Ile Val Lys Ile Leu Gly Ser Val  
 380 385 390  
 Leu Lys Gly Gln Val Ala Thr Val Ile Lys Lys Thr Ile Asn Thr  
 395 400 405  
 Asp Phe Pro Phe Pro Phe Ala Trp Leu Thr Gly Tyr Leu Ala Ile  
 410 415 420  
 Leu Val Gly Ala Gly Met Thr Phe Ile Val Gln Ser Ser Ser Val  
 425 430 435  
 Phe Thr Ser Ala Leu Thr Pro Leu Ile Gly Ile Gly Val Ile Thr

## ES 2 605 443 T3

440	445	450
Ile Glu Arg Ala Tyr Pro Leu Thr Leu Gly Ser Asn Ile Gly Thr 455	460	465
Thr Thr Thr Ala Ile Leu Ala Ala Leu Ala Ser Pro Gly Asn Ala 470	475	480
Leu Arg Ser Ser Leu Gln Ile Ala Leu Cys His Phe Phe Phe Asn 485	490	495
Ile Ser Gly Ile Leu Leu Trp Tyr Pro Ile Pro Phe Thr Arg Leu 500	505	510
Pro Ile Arg Met Ala Lys Gly Leu Gly Asn Ile Ser Ala Lys Tyr 515	520	525
Arg Trp Phe Ala Val Phe Tyr Leu Ile Ile Phe Phe Phe Leu Ile 530	535	540
Pro Leu Thr Val Phe Gly Leu Ser Leu Ala Gly Trp Arg Val Leu 545	550	555
Val Gly Val Gly Val Pro Val Val Phe Ile Ile Leu Val Leu 560	565	570
Cys Leu Arg Leu Leu Gln Ser Arg Cys Pro Arg Val Leu Pro Lys 575	580	585
Lys Leu Gln Asn Trp Asn Phe Leu Pro Leu Trp Met Arg Ser Leu 590	595	600
Lys Pro Trp Asp Ala Val Val Ser Lys Phe Thr Gly Cys Phe Gln 605	610	615
Met Arg Cys Cys Tyr Cys Cys Arg Val Cys Cys Arg Ala Cys Cys 620	625	630
Leu Leu Cys Gly Cys Pro Lys Cys Cys Arg Cys Ser Lys Cys Cys 635	640	645
Glu Asp Leu Glu Glu Ala Gln Glu Gly Gln Asp Val Pro Val Lys 650	655	660
Ala Pro Glu Thr Phe Asp Asn Ile Thr Ile Ser Arg Glu Ala Gln 665	670	675
Gly Glu Val Pro Ala Ser Asp Ser Lys Thr Glu Cys Thr Ala Leu 680	685	690

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1093

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapien

&lt;400&gt; 7

Met Val Leu Ala Gly Pro Leu Ala Val Ser Leu Leu Leu Pro Ser 1	5	10	15
Leu Thr Leu Leu Val Ser His Leu Ser Ser Ser Gln Asp Val Ser 20	25	30	

## ES 2 605 443 T3

Ser	Glu	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Gln	Leu	Cys	Ala	Leu	Ser	Lys	His
					35			40					45	
Pro	Thr	Val	Ala	Phe	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Trp	Val	Ser	Asn	Phe
				50				55					60	
Thr	Tyr	Pro	Gly	Ala	Arg	Asp	Phe	Ser	Gln	Leu	Ala	Leu	Asp	Pro
				65				70					75	
Ser	Gly	Asn	Gln	Leu	Ile	Val	Gly	Ala	Arg	Asn	Tyr	Leu	Phe	Arg
				80				85					90	
Leu	Ser	Leu	Ala	Asn	Val	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	Thr	Glu	Trp	Ala
				95				100					105	
Ser	Ser	Glu	Asp	Thr	Arg	Arg	Ser	Cys	Gln	Ser	Lys	Gly	Lys	Thr
				110				115					120	
Glu	Glu	Glu	Cys	Gln	Asn	Tyr	Val	Arg	Val	Leu	Ile	Val	Ala	Gly
				125				130					135	
Arg	Lys	Val	Phe	Met	Cys	Gly	Thr	Asn	Ala	Phe	Ser	Pro	Met	Cys
				140				145					150	
Thr	Ser	Arg	Gln	Val	Gly	Asn	Leu	Ser	Arg	Thr	Thr	Glu	Lys	Ile
				155				160					165	
Asn	Gly	Val	Ala	Arg	Cys	Pro	Tyr	Asp	Pro	Arg	His	Asn	Ser	Thr
				170				175					180	
Ala	Val	Ile	Ser	Ser	Gln	Gly	Glu	Leu	Tyr	Ala	Ala	Thr	Val	Ile
				185				190					195	
Asp	Phe	Ser	Gly	Arg	Asp	Pro	Ala	Ile	Tyr	Arg	Ser	Leu	Gly	Ser
				200				205					210	
Gly	Pro	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala	Gln	Tyr	Asn	Ser	Lys	Trp	Leu	Asn
				215				220					225	
Glu	Pro	Asn	Phe	Val	Ala	Ala	Tyr	Asp	Ile	Gly	Leu	Phe	Ala	Tyr
				230				235					240	
Phe	Phe	Leu	Arg	Glu	Asn	Ala	Val	Glu	His	Asp	Cys	Gly	Arg	Thr
				245				250					255	
Val	Tyr	Ser	Arg	Val	Ala	Arg	Val	Cys	Lys	Asn	Asp	Val	Gly	Gly
				260				265					270	
Arg	Phe	Leu	Leu	Glu	Asp	Thr	Trp	Thr	Thr	Phe	Met	Lys	Ala	Arg
				275				280					285	
Leu	Asn	Cys	Ser	Arg	Pro	Gly	Glu	Val	Pro	Phe	Tyr	Tyr	Asn	Glu
				290				295					300	
Leu	Gln	Ser	Ala	Phe	His	Leu	Pro	Glu	Gln	Asp	Leu	Ile	Tyr	Gly
				305				310					315	
Val	Phe	Thr	Thr	Asn	Val	Asn	Ser	Ile	Ala	Ala	Ser	Ala	Val	Cys
				320				325					330	

## ES 2 605 443 T3

Ala Phe Asn Leu Ser Ala Ile Ser Gln Ala Phe Asn Gly Pro Phe  
                  335                 340                 345  
 Arg Tyr Gln Glu Asn Pro Arg Ala Ala Trp Leu Pro Ile Ala Asn  
                  350                 355                 360  
 Pro Ile Pro Asn Phe Gln Cys Gly Thr Leu Pro Glu Thr Gly Pro  
                  365                 370                 375  
 Asn Glu Asn Leu Thr Glu Arg Ser Leu Gln Asp Ala Gln Arg Leu  
                  380                 385                 390  
 Phe Leu Met Ser Glu Ala Val Gln Pro Val Thr Pro Glu Pro Cys  
                  395                 400                 405  
 Val Thr Gln Asp Ser Val Arg Phe Ser His Leu Val Val Asp Leu  
                  410                 415                 420  
 Val Gln Ala Lys Asp Thr Leu Tyr His Val Leu Tyr Ile Gly Thr  
                  425                 430                 435  
 Glu Ser Gly Thr Ile Leu Lys Ala Leu Ser Thr Ala Ser Arg Ser  
                  440                 445                 450  
 Leu His Gly Cys Tyr Leu Glu Glu Leu His Val Leu Pro Pro Gly  
                  455                 460                 465  
 Arg Arg Glu Pro Leu Arg Ser Leu Arg Ile Leu His Ser Ala Arg  
                  470                 475                 480  
 Ala Leu Phe Val Gly Leu Arg Asp Gly Val Leu Arg Val Pro Leu  
                  485                 490                 495  
 Glu Arg Cys Ala Ala Tyr Arg Ser Gln Gly Ala Cys Leu Gly Ala  
                  500                 505                 510  
 Arg Asp Pro Tyr Cys Gly Trp Asp Gly Lys Gln Gln Arg Cys Ser  
                  515                 520                 525  
 Thr Leu Glu Asp Ser Ser Asn Met Ser Leu Trp Thr Gln Asn Ile  
                  530                 535                 540  
 Thr Ala Cys Pro Val Arg Asn Val Thr Arg Asp Gly Gly Phe Gly  
                  545                 550                 555  
 Pro Trp Ser Pro Trp Gln Pro Cys Glu His Leu Asp Gly Asp Asn  
                  560                 565                 570  
 Ser Gly Ser Cys Leu Cys Arg Ala Arg Ser Cys Asp Ser Pro Arg  
                  575                 580                 585  
 Pro Arg Cys Gly Gly Leu Asp Cys Leu Gly Pro Ala Ile His Ile  
                  590                 595                 600  
 Ala Asn Cys Ser Arg Asn Gly Ala Trp Thr Pro Trp Ser Ser Trp  
                  605                 610                 615  
 Ala Leu Cys Ser Thr Ser Cys Gly Ile Gly Phe Gln Val Arg Gln  
                  620                 625                 630  
 Arg Ser Cys Ser Asn Pro Ala Pro Arg His Gly Gly Arg Ile Cys

## ES 2 605 443 T3

635	640	645
Val Gly Lys Ser Arg Glu Glu Arg Phe Cys Asn Glu Asn Thr Pro		
650	655	660
Cys Pro Val Pro Ile Phe Trp Ala Ser Trp Gly Ser Trp Ser Lys		
665	670	675
Cys Ser Ser Asn Cys Gly Gly Met Gln Ser Arg Arg Arg Ala		
680	685	690
Cys Glu Asn Gly Asn Ser Cys Leu Gly Cys Gly Val Glu Phe Lys		
695	700	705
Thr Cys Asn Pro Glu Gly Cys Pro Glu Val Arg Arg Asn Thr Pro		
710	715	720
Trp Thr Pro Trp Leu Pro Val Asn Val Thr Gln Gly Gly Ala Arg		
725	730	735
Gln Glu Gln Arg Phe Arg Phe Thr Cys Arg Ala Pro Leu Ala Asp		
740	745	750
Pro His Gly Leu Gln Phe Gly Arg Arg Arg Thr Glu Thr Arg Thr		
755	760	765
Cys Pro Ala Asp Gly Ser Gly Ser Cys Asp Thr Asp Ala Leu Val		
770	775	780
Glu Asp Leu Leu Arg Ser Gly Ser Thr Ser Pro His Thr Val Ser		
785	790	795
Gly Gly Trp Ala Ala Trp Gly Pro Trp Ser Ser Cys Ser Arg Asp		
800	805	810
Cys Glu Leu Gly Phe Arg Val Arg Lys Arg Thr Cys Thr Asn Pro		
815	820	825
Glu Pro Arg Asn Gly Gly Leu Pro Cys Val Gly Asp Ala Ala Glu		
830	835	840
Tyr Gln Asp Cys Asn Pro Gln Ala Cys Pro Val Arg Gly Ala Trp		
845	850	855
Ser Cys Trp Thr Ser Trp Ser Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Gly		
860	865	870
Gly His Tyr Gln Arg Thr Arg Ser Cys Thr Ser Pro Ala Pro Ser		
875	880	885
Pro Gly Glu Asp Ile Cys Leu Gly Leu His Thr Glu Glu Ala Leu		
890	895	900
Cys Ala Thr Gln Ala Cys Pro Glu Gly Trp Ser Pro Trp Ser Glu		
905	910	915
Trp Ser Lys Cys Thr Asp Asp Gly Ala Gln Ser Arg Ser Arg His		
920	925	930
Cys Glu Glu Leu Leu Pro Gly Ser Ser Ala Cys Ala Gly Asn Ser		
935	940	945

Ser Gln Ser Arg Pro Cys Pro Tyr Ser Glu Ile Pro Val Ile Leu  
 950 955 960  
 Pro Ala Ser Ser Met Glu Glu Ala Thr Gly Cys Ala Gly Phe Asn  
 965 970 975  
 Leu Ile His Leu Val Ala Thr Gly Ile Ser Cys Phe Leu Gly Ser  
 980 985 990  
 Gly Leu Leu Thr Leu Ala Val Tyr Leu Ser Cys Gln His Cys Gln  
 995 1000 1005  
 Arg Gln Ser Gln Glu Ser Thr Leu Val His Pro Ala Thr Pro Asn  
 1010 1015 1020  
 His Leu His Tyr Lys Gly Gly Thr Pro Lys Asn Glu Lys Tyr  
 1025 1030 1035  
 Thr Pro Met Glu Phe Lys Thr Leu Asn Lys Asn Asn Leu Ile Pro  
 1040 1045 1050  
 Asp Asp Arg Ala Asn Phe Tyr Pro Leu Gln Gln Thr Asn Val Tyr  
 1055 1060 1065  
 Thr Thr Thr Tyr Tyr Pro Ser Pro Leu Asn Lys His Ser Phe Arg  
 1070 1075 1080  
 Pro Glu Ala Ser Pro Gly Gln Arg Cys Phe Pro Asn Ser  
 1085 1090

<210> 8  
 <211> 141  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien  
 <400> 8

## ES 2 605 443 T3

Met Trp Val Leu Gly Ile Ala Ala Thr Phe Cys Gly Leu Phe Leu  
1 5 10 15

Leu Pro Gly Phe Ala Leu Gln Ile Gln Cys Tyr Gln Cys Glu Glu  
20 25 30

Phe Gln Leu Asn Asn Asp Cys Ser Ser Pro Glu Phe Ile Val Asn  
35 40 45

Cys Thr Val Asn Val Gln Asp Met Cys Gln Lys Glu Val Met Glu  
50 55 60

Gln Ser Ala Gly Ile Met Tyr Arg Lys Ser Cys Ala Ser Ser Ala  
65 70 75

Ala Cys Leu Ile Ala Ser Ala Gly Tyr Gln Ser Phe Cys Ser Pro  
80 85 90

Gly Lys Leu Asn Ser Val Cys Ile Ser Cys Cys Asn Thr Pro Leu  
95 100 105

Cys Asn Gly Pro Arg Pro Lys Lys Arg Gly Ser Ser Ala Ser Ala  
110 115 120

Leu Arg Pro Gly Leu Arg Thr Thr Ile Leu Phe Leu Lys Leu Ala  
125 130 135

Leu Phe Ser Ala His Cys  
140

<210> 9  
<211> 442  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapien

<400> 9

Met Gln Pro Pro Pro Ser Leu Cys Gly Arg Ala Leu Val Ala Leu  
 1 5 10 15

Val Leu Ala Cys Gly Leu Ser Arg Ile Trp Gly Glu Glu Arg Gly  
 20 25 30

Phe Pro Pro Asp Arg Ala Thr Pro Leu Leu Gln Thr Ala Glu Ile  
 35 40 45

Met Thr Pro Pro Thr Lys Thr Leu Trp Pro Lys Gly Ser Asn Ala  
 50 55 60

Ser Leu Ala Arg Ser Leu Ala Pro Ala Glu Val Pro Lys Gly Asp  
 65 70 75

Arg Thr Ala Gly Ser Pro Pro Arg Thr Ile Ser Pro Pro Pro Cys  
 80 85 90

Gln Gly Pro Ile Glu Ile Lys Glu Thr Phe Lys Tyr Ile Asn Thr  
 95 100 105

Val Val Ser Cys Leu Val Phe Val Leu Gly Ile Ile Gly Asn Ser  
 110 115 120

Thr Leu Leu Arg Ile Ile Tyr Lys Asn Lys Cys Met Arg Asn Gly  
 125 130 135

Pro Asn Ile Leu Ile Ala Ser Leu Ala Leu Gly Asp Leu Leu His  
 140 145 150

Ile Val Ile Asp Ile Pro Ile Asn Val Tyr Lys Leu Leu Ala Glu  
 155 160 165

Asp Trp Pro Phe Gly Ala Glu Met Cys Lys Leu Val Pro Phe Ile  
 170 175 180

Gln Lys Ala Ser Val Gly Ile Thr Val Leu Ser Leu Cys Ala Leu  
 185 190 195

Ser Ile Asp Arg Tyr Arg Ala Val Ala Ser Trp Ser Arg Ile Lys  
 200 205 210

Gly Ile Gly Val Pro Lys Trp Thr Ala Val Glu Ile Val Leu Ile  
 215 220 225

Trp Val Val Ser Val Val Leu Ala Val Pro Glu Ala Ile Gly Phe  
 230 235 240

Asp Ile Ile Thr Met Asp Tyr Lys Gly Ser Tyr Leu Arg Ile Cys

## ES 2 605 443 T3

245	250	255
Leu Leu His Pro Val Gln Lys Thr Ala Phe Met Gln Phe Tyr Lys 260	265	270
Thr Ala Lys Asp Trp Trp Leu Phe Ser Phe Tyr Phe Cys Leu Pro 275	280	285
Leu Ala Ile Thr Ala Phe Phe Tyr Thr Leu Met Thr Cys Glu Met 290	295	300
Leu Arg Lys Lys Ser Gly Met Gln Ile Ala Leu Asn Asp His Leu 305	310	315
Lys Gln Arg Arg Glu Val Ala Lys Thr Val Phe Cys Leu Val Leu 320	325	330
Val Phe Ala Leu Cys Trp Leu Pro Leu His Leu Ser Arg Ile Leu 335	340	345
Lys Leu Thr Leu Tyr Asn Gln Asn Asp Pro Asn Arg Cys Glu Leu 350	355	360
Leu Ser Phe Leu Leu Val Leu Asp Tyr Ile Gly Ile Asn Met Ala 365	370	375
Ser Leu Asn Ser Cys Ile Asn Pro Ile Ala Leu Tyr Leu Val Ser 380	385	390
Lys Arg Phe Lys Asn Cys Phe Lys Ser Cys Leu Cys Cys Trp Cys 395	400	405
Gln Ser Phe Glu Glu Lys Gln Ser Leu Glu Glu Lys Gln Ser Cys 410	415	420
Leu Lys Phe Lys Ala Asn Asp His Gly Tyr Asp Asn Phe Arg Ser 425	430	435
Ser Asn Lys Tyr Ser Ser Ser 440		

<210> 10  
<211> 783  
<212> PRT  
<213> Homo sapien

<400> 10

ES 2 605 443 T3

Met	Ser	Gly	Gly	His	Gln	Leu	Gln	Leu	Ala	Ala	Leu	Trp	Pro	Trp
1					5				10				15	
Leu	Leu	Met	Ala	Thr	Leu	Gln	Ala	Gly	Phe	Gly	Arg	Thr	Gly	Leu
					20				25				30	
Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	Glu	Ser	Glu	Arg	Ser	Ala	Glu	Gln	Lys
					35				40				45	
Ala	Ile	Ile	Arg	Val	Ile	Pro	Leu	Lys	Met	Asp	Pro	Thr	Gly	Lys
					50				55				60	
Leu	Asn	Leu	Thr	Leu	Glu	Gly	Val	Phe	Ala	Gly	Val	Ala	Glu	Ile
					65				70				75	

Thr Pro Ala Glu Gly Lys Leu Met Gln Ser His Pro Leu Tyr Leu  
                   80                  85                  90  
  
 Cys Asn Ala Ser Asp Asp Asp Asn Leu Glu Pro Gly Phe Ile Ser  
                   95                  100                  105  
  
 Ile Val Lys Leu Glu Ser Pro Arg Arg Ala Pro Arg Pro Cys Leu  
                   110                  115                  120  
  
 Ser Leu Ala Ser Lys Ala Arg Met Ala Gly Glu Arg Gly Ala Ser  
                   125                  130                  135  
  
 Ala Val Leu Phe Asp Ile Thr Glu Asp Arg Ala Ala Glu Gln  
                   140                  145                  150  
  
 Leu Gln Gln Pro Leu Gly Leu Thr Trp Pro Val Val Leu Ile Trp  
                   155                  160                  165  
  
 Gly Asn Asp Ala Glu Lys Leu Met Glu Phe Val Tyr Lys Asn Gln  
                   170                  175                  180  
  
 Lys Ala His Val Arg Ile Glu Leu Lys Glu Pro Pro Ala Trp Pro  
                   185                  190                  195  
  
 Asp Tyr Asp Val Trp Ile Leu Met Thr Val Val Gly Thr Ile Phe  
                   200                  205                  210  
  
 Val Ile Ile Leu Ala Ser Val Leu Arg Ile Arg Cys Arg Pro Arg  
                   215                  220                  225  
  
 His Ser Arg Pro Asp Pro Leu Gln Gln Arg Thr Ala Trp Ala Ile  
                   230                  235                  240  
  
 Ser Gin Leu Ala Thr Arg Arg Tyr Gln Ala Ser Cys Arg Gln Ala  
                   245                  250                  255  
  
 Arg Gly Glu Trp Pro Asp Ser Gly Ser Ser Cys Ser Ser Ala Pro  
                   260                  265                  270  
  
 Val Cys Ala Ile Cys Leu Glu Glu Phe Ser Glu Gly Gln Glu Leu  
                   275                  280                  285  
  
 Arg Val Ile Ser Cys Leu His Glu Phe His Arg Asn Cys Val Asp  
                   290                  295                  300  
  
 Pro Trp Leu His Gln His Arg Thr Cys Pro Leu Cys Val Phe Asn  
                   305                  310                  315  
  
 Ile Thr Glu Gly Asp Ser Phe Ser Gln Ser Leu Gly Pro Ser Arg  
                   320                  325                  330  
  
 Ser Tyr Gln Glu Pro Gly Arg Arg Leu His Leu Ile Arg Gln His  
                   335                  340                  345  
  
 Pro Gly His Ala His Tyr His Leu Pro Ala Ala Tyr Leu Leu Gly  
                   350                  355                  360  
  
 Pro Ser Arg Ser Ala Val Ala Arg Pro Pro Arg Pro Gly Pro Phe  
                   365                  370                  375

## ES 2 605 443 T3

Leu Pro Ser Gln Glu Pro Gly Met Gly Pro Arg His His Arg Phe  
                   380                     385                 390  
 Pro Arg Ala Ala His Pro Arg Ala Pro Gly Glu Gln Gln Arg Leu  
                   395                     400                 405  
 Ala Gly Ala Gln His Pro Tyr Ala Gln Gly Trp Gly Met Ser His  
                   410                     415                 420  
 Leu Gln Ser Thr Ser Gln His Pro Ala Ala Cys Pro Val Pro Leu  
                   425                     430                 435  
 Arg Arg Ala Arg Pro Pro Asp Ser Ser Gly Ser Gly Glu Ser Tyr  
                   440                     445                 450  
 Cys Thr Glu Arg Ser Gly Tyr Leu Ala Asp Gly Pro Ala Ser Asp  
                   455                     460                 465  
 Ser Ser Ser Gly Pro Cys His Gly Ser Ser Ser Asp Ser Val Val  
                   470                     475                 480  
 Asn Cys Thr Asp Ile Ser Leu Gln Gly Val His Gly Ser Ser Ser  
                   485                     490                 495  
 Thr Phe Cys Ser Ser Leu Ser Ser Asp Phe Asp Pro Leu Val Tyr  
                   500                     505                 510  
 Cys Ser Pro Lys Gly Asp Pro Gln Arg Val Asp Met Gln Pro Ser  
                   515                     520                 525  
 Val Thr Ser Arg Pro Arg Ser Leu Asp Ser Val Val Pro Thr Gly  
                   530                     535                 540  
 Glu Thr Gln Val Ser Ser His Val His Tyr His Arg His Arg His  
                   545                     550                 555  
 His His Tyr Lys Lys Arg Phe Gln Trp His Gly Arg Lys Pro Gly  
                   560                     565                 570  
 Pro Glu Thr Gly Val Pro Gln Ser Arg Pro Pro Ile Pro Arg Thr  
                   575                     580                 585  
 Gln Pro Gln Pro Glu Pro Pro Ser Pro Asp Gln Gln Val Thr Gly  
                   590                     595                 600  
 Ser Asn Ser Ala Ala Pro Ser Gly Arg Leu Ser Asn Pro Gln Cys  
                   605                     610                 615  
 Pro Arg Ala Leu Pro Glu Pro Ala Pro Gly Pro Val Asp Ala Ser  
                   620                     625                 630  
 Ser Ile Cys Pro Ser Thr Ser Ser Leu Phe Asn Leu Gln Lys Ser  
                   635                     640                 645  
 Ser Leu Ser Ala Arg His Pro Gln Arg Lys Arg Arg Gly Gly Pro  
                   650                     655                 660  
 Ser Glu Pro Thr Pro Gly Ser Arg Pro Gln Asp Ala Thr Val His  
                   665                     670                 675  
 Pro Ala Cys Gln Ile Phe Pro His Tyr Thr Pro Ser Val Ala Tyr

## ES 2 605 443 T3

680	685	690
Pro Trp Ser Pro Glu Ala His Pro Leu Ile Cys Gly Pro Pro Gly		
695	700	705
Leu Asp Lys Arg Leu Leu Pro Glu Thr Pro Gly Pro Cys Tyr Ser		
710	715	720
Asn Ser Gln Pro Val Trp Leu Cys Leu Thr Pro Arg Gln Pro Leu		
725	730	735
Glu Pro His Pro Pro Gly Glu Gly Pro Ser Glu Trp Ser Ser Asp		
740	745	750
Thr Ala Glu Gly Arg Pro Cys Pro Tyr Pro His Cys Gln Val Leu		
755	760	765
Ser Ala Gln Pro Gly Ser Glu Glu Leu Glu Glu Leu Cys Glu		
770	775	780
Gln Ala Val		

5  
<210> 11  
<211> 490  
<212> PRT  
<213> Homo sapien  
<400> 11

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

## ES 2 605 443 T3

Tyr Ile Cys Ser Asn Asn Ile Gln Ala Arg Gln Gln Val Ile Glu  
                          170                         175                 180

Leu Ala Arg Gln Leu Asn Phe Ile Pro Ile Asp Leu Gly Ser Leu  
                          185                         190                 195

Ser Ser Ala Arg Glu Ile Glu Asn Leu Pro Leu Arg Leu Phe Thr  
                          200                         205                 210

Leu Trp Arg Gly Pro Val Val Ala Ile Ser Leu Ala Thr Phe  
                          215                         220                 225

Phe Phe Leu Tyr Ser Phe Val Arg Asp Val Ile His Pro Tyr Ala  
                          230                         235                 240

Arg Asn Gln Gln Ser Asp Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Glu Ile Val  
                          245                         250                 255

Asn Lys Thr Leu Pro Ile Val Ala Ile Thr Leu Leu Ser Leu Val  
                          260                         265                 270

Tyr Leu Ala Gly Leu Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Leu Tyr Tyr Gly  
                          275                         280                 285

Thr Lys Tyr Arg Arg Phe Pro Pro Trp Leu Glu Thr Trp Leu Gln  
                          290                         295                 300

Cys Arg Lys Gln Leu Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Met Val  
                          305                         310                 315

His Val Ala Tyr Ser Leu Cys Leu Pro Met Arg Arg Ser Glu Arg  
                          320                         325                 330

Tyr Leu Phe Leu Asn Met Ala Tyr Gln Gln Val His Ala Asn Ile  
                          335                         340                 345

Glu Asn Ser Trp Asn Glu Glu Glu Val Trp Arg Ile Glu Met Tyr  
                          350                         355                 360

Ile Ser Phe Gly Ile Met Ser Leu Gly Leu Leu Ser Leu Leu Ala  
                          365                         370                 375

Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asn Ala Leu Asn Trp Arg Glu  
                          380                         385                 390

Phe Ser Phe Ile Gln Ser Thr Leu Gly Tyr Val Ala Leu Leu Ile  
                          395                         400                 405

Ser Thr Phe His Val Leu Ile Tyr Gly Trp Lys Arg Ala Phe Glu  
                          410                         415                 420

Glu Glu Tyr Tyr Arg Phe Tyr Thr Pro Pro Asn Phe Val Leu Ala  
                          425                         430                 435

Leu Val Leu Pro Ser Ile Val Ile Leu Gly Lys Ile Ile Leu Phe  
                          440                         445                 450

Leu Pro Cys Ile Ser Gln Lys Leu Lys Arg Ile Lys Lys Gly Trp  
                          455                         460                 465

ES 2 605 443 T3

Glu Lys Ser Gln Phe Leu Glu Glu Gly Ile Gly Gly Thr Ile Pro  
470 475 480

His Val Ser Pro Glu Arg Val Thr Val Met  
485 490

<210> 12

<211> 1214

5 <212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 12

## ES 2 605 443 T3

Met	Val	Val	Pro	Glu	Lys	Glu	Gln	Ser	Trp	Ile	Pro	Lys	Ile	Phe
1				5					10					15
Lys	Lys	Lys	Thr	Cys	Thr	Thr	Phe	Ile	Val	Asp	Ser	Thr	Asp	Pro
				20					25					30
Gly	Gly	Thr	Leu	Cys	Gln	Cys	Gly	Arg	Pro	Arg	Thr	Ala	His	Pro
				35				40						45
Ala	Val	Ala	Met	Glu	Asp	Ala	Phe	Gly	Ala	Ala	Val	Val	Thr	Val
				50					55					60
Trp	Asp	Ser	Asp	Ala	His	Thr	Thr	Glu	Lys	Pro	Thr	Asp	Ala	Tyr
				65				70						75
Gly	Glu	Leu	Asp	Phe	Thr	Gly	Ala	Gly	Arg	Lys	His	Ser	Asn	Phe
				80				85						90
Leu	Arg	Leu	Ser	Asp	Arg	Thr	Asp	Pro	Ala	Ala	Val	Tyr	Ser	Leu
				95				100						105
Val	Thr	Arg	Thr	Trp	Gly	Phe	Arg	Ala	Pro	Asn	Leu	Val	Val	Ser
				110				115						120
Val	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Pro	Val	Leu	Gln	Thr	Trp	Leu	Gln
				125				130						135
Asp	Leu	Leu	Arg	Arg	Gly	Leu	Val	Arg	Ala	Ala	Gln	Ser	Thr	Gly
				140				145						150
Ala	Trp	Ile	Val	Thr	Gly	Gly	Leu	His	Thr	Gly	Ile	Gly	Arg	His
				155				160						165
Val	Gly	Val	Ala	Val	Arg	Asp	His	Gln	Met	Ala	Ser	Thr	Gly	Gly
				170				175						180
Thr	Lys	Val	Val	Ala	Met	Gly	Val	Ala	Pro	Trp	Gly	Val	Val	Arg
				185				190						195
Asn	Arg	Asp	Thr	Leu	Ile	Asn	Pro	Lys	Gly	Ser	Phe	Pro	Ala	Arg
				200				205						210
Tyr	Arg	Trp	Arg	Gly	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Val	Gln	Phe	Pro	Leu
				215				220						225
Asp	Tyr	Asn	Tyr	Ser	Ala	Phe	Phe	Leu	Val	Asp	Asp	Gly	Thr	His
				230				235						240
Gly	Cys	Leu	Gly	Gly	Glu	Asn	Arg	Phe	Arg	Leu	Arg	Leu	Glu	Ser

	245	250	255
Tyr Ile Ser Gln Gln Lys Thr Gly Val Gly Gly Thr Gly Ile Asp			
260	265		270
Ile Pro Val Leu Leu Leu Ile Asp Gly Asp Glu Lys Met Leu			
275	280		285
Thr Arg Ile Glu Asn Ala Thr Gln Ala Gln Leu Pro Cys Leu Leu			
290	295		300
Val Ala Gly Ser Gly Gly Ala Ala Asp Cys Leu Ala Glu Thr Leu			
305	310		315
Glu Asp Thr Leu Ala Pro Gly Ser Gly Gly Ala Arg Gln Gly Glu			
320	325		330
Ala Arg Asp Arg Ile Arg Arg Phe Phe Pro Lys Gly Asp Leu Glu			
335	340		345
Val Leu Gln Ala Gln Val Glu Arg Ile Met Thr Arg Lys Glu Leu			
350	355		360
Leu Thr Val Tyr Ser Ser Glu Asp Gly Ser Glu Glu Phe Glu Thr			
365	370		375
Ile Val Leu Lys Ala Leu Val Lys Ala Cys Gly Ser Ser Glu Ala			
380	385		390
Ser Ala Tyr Leu Asp Glu Leu Arg Leu Ala Val Ala Trp Asn Arg			
395	400		405
Val Asp Ile Ala Gln Ser Glu Leu Phe Arg Gly Asp Ile Gln Trp			
410	415		420
Arg Ser Phe His Leu Glu Ala Ser Leu Met Asp Ala Leu Leu Asn			
425	430		435
Asp Arg Pro Glu Phe Val Arg Leu Leu Ile Ser His Gly Leu Ser			
440	445		450
Leu Gly His Phe Leu Thr Pro Met Arg Leu Ala Gln Leu Tyr Ser			
455	460		465
Ala Ala Pro Ser Asn Ser Leu Ile Arg Asn Leu Leu Asp Gln Ala			
470	475		480
Ser His Ser Ala Gly Thr Lys Ala Pro Ala Leu Lys Gly Gly Ala			
485	490		495
Ala Glu Leu Arg Pro Pro Asp Val Gly His Val Leu Arg Met Leu			
500	505		510
Leu Gly Lys Met Cys Ala Pro Arg Tyr Pro Ser Gly Gly Ala Trp			
515	520		525
Asp Pro His Pro Gly Gln Gly Phe Gly Glu Ser Met Tyr Leu Leu			
530	535		540
Ser Asp Lys Ala Thr Ser Pro Leu Ser Leu Asp Ala Gly Leu Gly			
545	550		555

## ES 2 605 443 T3

Gln Ala Pro Trp Ser Asp Leu Leu Leu Trp Ala Leu Leu Leu Asn  
                   560                  565                  570  
 Arg Ala Gln Met Ala Met Tyr Phe Trp Glu Met Gly Ser Asn Ala  
                   575                  580                  585  
 Val Ser Ser Ala Leu Gly Ala Cys Leu Leu Leu Arg Val Met Ala  
                   590                  595                  600  
 Arg Leu Glu Pro Asp Ala Glu Glu Ala Ala Arg Arg Lys Asp Leu  
                   605                  610                  615  
 Ala Phe Lys Phe Glu Gly Met Gly Val Asp Leu Phe Gly Glu Cys  
                   620                  625                  630  
 Tyr Arg Ser Ser Glu Val Arg Ala Ala Arg Leu Leu Leu Arg Arg  
                   635                  640                  645  
 Cys Pro Leu Trp Gly Asp Ala Thr Cys Leu Gln Leu Ala Met Gln  
                   650                  655                  660  
 Ala Asp Ala Arg Ala Phe Phe Ala Gln Asp Gly Val Gln Ser Leu  
                   665                  670                  675  
 Leu Thr Gln Lys Trp Trp Gly Asp Met Ala Ser Thr Thr Pro Ile  
                   680                  685                  690  
 Trp Ala Leu Val Leu Ala Phe Phe Cys Pro Pro Leu Ile Tyr Thr  
                   695                  700                  705  
 Arg Leu Ile Thr Phe Arg Lys Ser Glu Glu Glu Pro Thr Arg Glu  
                   710                  715                  720  
 Glu Leu Glu Phe Asp Met Asp Ser Val Ile Asn Gly Glu Gly Pro  
                   725                  730                  735  
 Val Gly Thr Ala Asp Pro Ala Glu Lys Thr Pro Leu Gly Val Pro  
                   740                  745                  750  
 Arg Gln Ser Gly Arg Pro Gly Cys Cys Gly Gly Arg Cys Gly Gly  
                   755                  760                  765  
 Arg Arg Cys Leu Arg Arg Trp Phe His Phe Trp Gly Ala Pro Val  
                   770                  775                  780  
 Thr Ile Phe Met Gly Asn Val Val Ser Tyr Leu Leu Phe Leu Leu  
                   785                  790                  795  
 Leu Phe Ser Arg Val Leu Leu Val Asp Phe Gln Pro Ala Pro Pro  
                   800                  805                  810  
 Gly Ser Leu Glu Leu Leu Leu Tyr Phe Trp Ala Phe Thr Leu Leu  
                   815                  820                  825  
 Cys Glu Glu Leu Arg Gln Gly Leu Ser Gly Gly Gly Ser Leu  
                   830                  835                  840  
 Ala Ser Gly Gly Pro Gly Pro Gly His Ala Ser Leu Ser Gln Arg  
                   845                  850                  855

## ES 2 605 443 T3

Leu Arg Leu Tyr Leu Ala Asp Ser Trp Asn Gln Cys Asp Leu Val  
 860 865 870  
 Ala Leu Thr Cys Phe Leu Leu Gly Val Gly Cys Arg Leu Thr Pro  
 875 880 885  
 Gly Leu Tyr His Leu Gly Arg Thr Val Leu Cys Ile Asp Phe Met  
 890 895 900  
 Val Phe Thr Val Arg Leu Leu His Ile Phe Thr Val Asn Lys Gln  
 905 910 915  
 Leu Gly Pro Lys Ile Val Ile Val Ser Lys Met Met Lys Asp Val  
 920 925 930  
 Phe Phe Phe Leu Phe Phe Leu Gly Val Trp Leu Val Ala Tyr Gly  
 935 940 945  
 Val Ala Thr Glu Gly Leu Leu Arg Pro Arg Asp Ser Asp Phe Pro  
 950 955 960  
 Ser Ile Leu Arg Arg Val Phe Tyr Arg Pro Tyr Leu Gln Ile Phe  
 965 970 975  
 Gly Gln Ile Pro Gln Glu Asp Met Asp Val Ala Leu Met Glu His  
 980 985 990  
 Ser Asn Cys Ser Ser Glu Pro Gly Phe Trp Ala His Pro Pro Gly  
 995 1000 1005  
 Ala Gln Ala Gly Thr Cys Val Ser Gln Tyr Ala Asn Trp Leu Val  
 1010 1015 1020  
 Val Leu Leu Leu Val Ile Phe Leu Leu Val Ala Asn Ile Leu Leu  
 1025 1030 1035  
 Val Asn Leu Leu Ile Ala Met Phe Ser Tyr Thr Phe Gly Lys Val  
 1040 1045 1050  
 Gln Gly Asn Ser Asp Leu Tyr Trp Lys Ala Gln Arg Tyr Arg Leu  
 1055 1060 1065  
 Ile Arg Glu Phe His Ser Arg Pro Ala Leu Ala Pro Pro Phe Ile  
 1070 1075 1080  
 Val Ile Ser His Leu Arg Leu Leu Arg Gln Leu Cys Arg Arg  
 1085 1090 1095  
 Pro Arg Ser Pro Gln Pro Ser Ser Pro Ala Leu Glu His Phe Arg  
 1100 1105 1110  
 Val Tyr Leu Ser Lys Glu Ala Glu Arg Lys Leu Leu Thr Trp Glu  
 1115 1120 1125  
 Ser Val His Lys Glu Asn Phe Leu Leu Ala Arg Ala Arg Asp Lys  
 1130 1135 1140  
 Arg Glu Ser Asp Ser Glu Arg Leu Lys Arg Thr Ser Gln Lys Val  
 1145 1150 1155  
 Asp Leu Ala Leu Lys Gln Leu Gly His Ile Arg Glu Tyr Glu Gln

## ES 2 605 443 T3

1160	1165	1170
------	------	------

Arg Leu Lys Val Leu Glu Arg Glu Val Gln Gln Cys Ser Arg Val	1175	1180
---	------	------

1185
------

Leu Gly Trp Val Ala Glu Ala Leu Ser Arg Ser Ala Leu Leu Pro	1190	1195
---	------	------

1200
------

Pro Gly Gly Pro Pro Pro Asp Leu Pro Gly Ser Lys Asp	1205	1210
---	------	------

5                   <210> 13  
                   <211> 188  
                   <212> PRT  
                   <213> Homo sapien

<400> 13

Met Asp Cys Arg Lys Met Ala Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp	1	5
---	---	---

15
----

Ile Met Ala Ile Ser Lys Val Phe Glu Leu Gly Leu Val Ala Gly	20	25
---	----	----

30
----

Leu Gly His Gln Glu Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Tyr Leu Ala	35	40
---	----	----

45
----

Phe Arg Asp Asp Ser Ile Trp Pro Gln Glu Glu Pro Ala Ile Arg	50	55
---	----	----

60
----

Pro Arg Ser Ser Gln Arg Val Pro Pro Met Gly Ile Gln His Ser	65	70
---	----	----

75
----

Lys Glu Leu Asn Arg Thr Cys Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Met	80	85
---	----	----

90
----

Leu Gly Ser Phe Cys Ala Cys Pro Pro Ser Phe Tyr Gly Arg Asn	95	100
---	----	-----

105
-----

Cys Glu His Asp Val Arg Lys Glu Asn Cys Gly Ser Val Pro His	110	115
---	-----	-----

120
-----

Asp Thr Trp Leu Pro Lys Lys Cys Ser Leu Cys Lys Cys Trp His	125	130
---	-----	-----

135
-----

Gly Gln Leu Arg Cys Phe Pro Gln Ala Phe Leu Pro Gly Cys Asp	140	145
---	-----	-----

150
-----

Gly Leu Val Met Asp Glu His Leu Val Ala Ser Arg Thr Pro Glu	155	160
---	-----	-----

165
-----

Leu Pro Pro Ser Ala Arg Thr Thr Phe Met Leu Val Gly Ile	170	175
---	-----	-----

180
-----

Cys Leu Ser Ile Gln Ser Tyr Tyr	185
---------------------------------	-----

10

<210> 14  
   <211> 1033  
   <212> PRT

## ES 2 605 443 T3

&lt;213&gt; Homo sapien

&lt;400&gt; 14

Met	Gly	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Gly	Val	Phe	Leu	Ala	Leu	Val	Ala
1				5				10					15	
Pro	Gly	Val	Leu	Gly	Ile	Ser	Cys	Gly	Ser	Pro	Pro	Pro	Ile	Leu
		20						25					30	
Asn	Gly	Arg	Ile	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Pro	Ile	Ala	Val	Gly	Thr
			35					40					45	
Val	Ile	Arg	Tyr	Ser	Cys	Ser	Gly	Thr	Phe	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu
		50						55					60	
Lys	Ser	Leu	Leu	Cys	Ile	Thr	Lys	Asp	Lys	Val	Asp	Gly	Thr	Trp
			65					70					75	
Asp	Lys	Pro	Ala	Pro	Lys	Cys	Glu	Tyr	Phe	Asn	Lys	Tyr	Ser	Ser
			80					85					90	
Cys	Pro	Glu	Pro	Ile	Val	Pro	Gly	Gly	Tyr	Lys	Ile	Arg	Gly	Ser
		95						100					105	
Thr	Pro	Tyr	Arg	His	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	Phe	Ala	Cys	Lys	Thr
		110						115					120	
Asn	Phe	Ser	Met	Asn	Gly	Asn	Lys	Ser	Val	Trp	Cys	Gln	Ala	Asn
			125					130					135	
Asn	Met	Trp	Gly	Pro	Thr	Arg	Leu	Pro	Thr	Cys	Val	Ser	Val	Phe
		140						145					150	
Pro	Leu	Glu	Cys	Pro	Ala	Leu	Pro	Met	Ile	His	Asn	Gly	His	His
		155						160					165	
Thr	Ser	Glu	Asn	Val	Gly	Ser	Ile	Ala	Pro	Gly	Leu	Ser	Val	Thr
		170						175					180	
Tyr	Ser	Cys	Glu	Ser	Gly	Tyr	Leu	Leu	Val	Gly	Glu	Lys	Ile	Ile
		185						190					195	
Asn	Cys	Leu	Ser	Ser	Gly	Lys	Trp	Ser	Ala	Val	Pro	Pro	Thr	Cys
			200					205					210	
Glu	Gly	Ala	Arg	Cys	Lys	Ser	Leu	Gly	Arg	Phe	Pro	Asn	Gly	Lys
		215						220					225	
Val	Lys	Glu	Pro	Pro	Ile	Leu	Arg	Val	Gly	Val	Thr	Ala	Asn	Phe
		230						235					240	
Phe	Cys	Asp	Glu	Gly	Tyr	Arg	Leu	Gln	Gly	Pro	Pro	Ser	Ser	Arg
		245						250					255	
Cys	Val	Ile	Ala	Gly	Gln	Gly	Val	Ala	Trp	Thr	Lys	Met	Pro	Val
		260						265					270	
Cys	Glu	Glu	Ile	Phe	Cys	Pro	Ser	Pro	Pro	Ile	Leu	Asn	Gly	
		275						280					285	
Arg	His	Ile	Gly	Asn	Ser	Leu	Ala	Asn	Val	Ser	Tyr	Gly	Ser	Ile
		290						295					300	

## ES 2 605 443 T3

Val Thr Tyr Thr Cys Asp Pro Asp Pro Glu Glu Gly Val Asn Phe  
 305 310 315  
 Ile Leu Ile Gly Glu Ser Thr Leu Arg Cys Thr Val Asp Ser Gln  
 320 325 330  
 Lys Thr Gly Thr Trp Ser Gly Pro Ala Pro Arg Cys Glu Leu Ser  
 335 340 345  
 Thr Ser Ala Val Gln Cys Pro His Pro Gln Ile Leu Arg Gly Arg  
 350 355 360  
 Met Val Ser Gly Gln Lys Asp Arg Tyr Thr Tyr Asn Asp Thr Val  
 365 370 375  
 Ile Phe Ala Cys Met Phe Gly Phe Thr Leu Lys Gly Ser Lys Gln  
 380 385 390  
 Ile Arg Cys Asn Ala Gln Gly Thr Trp Glu Pro Ser Ala Pro Val  
 395 400 405  
 Cys Glu Lys Glu Cys Gln Ala Pro Pro Asn Ile Leu Asn Gly Gln  
 410 415 420  
 Lys Glu Asp Arg His Met Val Arg Phe Asp Pro Gly Thr Ser Ile  
 425 430 435  
 Lys Tyr Ser Cys Asn Pro Gly Tyr Val Leu Val Gly Glu Glu Ser  
 440 445 450  
 Ile Gln Cys Thr Ser Glu Gly Val Trp Thr Pro Pro Val Pro Gln  
 455 460 465  
 Cys Lys Val Ala Ala Cys Glu Ala Thr Gly Arg Gln Leu Leu Thr  
 470 475 480  
 Lys Pro Gln His Gln Phe Val Arg Pro Asp Val Asn Ser Ser Cys  
 485 490 495  
 Gly Glu Gly Tyr Lys Leu Ser Gly Ser Val Tyr Gln Glu Cys Gln  
 500 505 510  
 Gly Thr Ile Pro Trp Phe Met Glu Ile Arg Leu Cys Lys Glu Ile  
 515 520 525  
 Thr Cys Pro Pro Pro Val Ile Tyr Asn Gly Ala His Thr Gly  
 530 535 540  
 Ser Ser Leu Glu Asp Phe Pro Tyr Gly Thr Thr Val Thr Tyr Thr  
 545 550 555  
 Cys Asn Pro Gly Pro Glu Arg Gly Val Glu Phe Ser Leu Ile Gly  
 560 565 570  
 Glu Ser Thr Ile Arg Cys Thr Ser Asn Asp Gln Glu Arg Gly Thr  
 575 580 585  
 Trp Ser Gly Pro Ala Pro Leu Cys Lys Leu Ser Leu Leu Ala Val  
 590 595 600  
 Gln Cys Ser His Val His Ile Ala Asn Gly Tyr Lys Ile Ser Gly

## ES 2 605 443 T3

605	610	615
Lys Glu Ala Pro Tyr Phe Tyr Asn Asp	Thr Val Thr Phe Lys Cys	
620	625	630
Tyr Ser Gly Phe Thr Leu Lys Gly Ser	Ser Gln Ile Arg Cys Lys	
635	640	645
Ala Asp Asn Thr Trp Asp Pro Glu Ile	Pro Val Cys Glu Lys Glu	
650	655	660
Thr Cys Gln His Val Arg Gln Ser Leu	Gln Glu Leu Pro Ala Gly	
665	670	675
Ser Arg Val Glu Leu Val Asn Thr Ser	Cys Gln Asp Gly Tyr Gln	
680	685	690
Leu Thr Gly His Ala Tyr Gln Met Cys	Gln Asp Ala Glu Asn Gly	
695	700	705
Ile Trp Phe Lys Lys Ile Pro Leu Cys	Lys Val Ile His Cys His	
710	715	720
Pro Pro Pro Val Ile Val Asn Gly Lys	His Thr Gly Met Met Ala	
725	730	735
Glu Asn Phe Leu Tyr Gly Asn Glu Val	Ser Tyr Glu Cys Asp Gln	
740	745	750
Gly Phe Tyr Leu Leu Gly Glu Lys Lys	Leu Gln Cys Arg Ser Asp	
755	760	765
Ser Lys Gly His Gly Ser Trp Ser Gly	Pro Ser Pro Gln Cys Leu	
770	775	780
Arg Ser Pro Pro Val Thr Arg Cys Pro	Asn Pro Glu Val Lys His	
785	790	795
Gly Tyr Lys Leu Asn Lys Thr His Ser	Ala Tyr Ser His Asn Asp	
800	805	810
Ile Val Tyr Val Asp Cys Asn Pro Gly	Phe Ile Met Asn Gly Ser	
815	820	825
Arg Val Ile Arg Cys His Thr Asp Asn	Thr Trp Val Pro Gly Val	
830	835	840
Pro Thr Cys Ile Lys Lys Ala Phe Ile	Gly Cys Pro Pro Pro Pro	
845	850	855
Lys Thr Pro Asn Gly Asn His Thr Gly	Gly Asn Ile Ala Arg Phe	
860	865	870
Ser Pro Gly Met Ser Ile Leu Tyr Ser	Cys Asp Gln Gly Tyr Leu	
875	880	885
Leu Val Gly Glu Ala Leu Leu Cys Thr	His Glu Gly Thr Trp	
890	895	900
Ser Gln Pro Ala Pro His Cys Lys Glu	Val Asn Cys Ser Ser Pro	
905	910	915

ES 2 605 443 T3

Ala Asp Met Asp Gly Ile Gln Lys Gly Leu Glu Pro Arg Lys Met  
920 925 930

Tyr Gln Tyr Gly Ala Val Val Thr Leu Glu Cys Glu Asp Gly Tyr  
935 940 945

Met Leu Glu Gly Ser Pro Gln Ser Gln Cys Gln Ser Asp His Gln  
950 955 960

Trp Asn Pro Pro Leu Ala Val Cys Arg Ser Arg Ser Leu Ala Pro  
965 970 975

Val Leu Cys Gly Ile Ala Ala Gly Leu Ile Leu Leu Thr Phe Leu  
980 985 990

Ile Val Ile Thr Leu Tyr Val Ile Ser Lys His Arg Glu Arg Asn  
995 1000 1005

Tyr Tyr Thr Asp Thr Ser Gln Lys Glu Ala Phe His Leu Glu Ala  
1010 1015 1020

Arg Glu Val Tyr Ser Val Asp Pro Tyr Asn Pro Ala Ser  
1025 1030

5

<210> 15  
<211> 229  
<212> PRT  
<213> Homo sapien  
  
<400> 15

## ES 2 605 443 T3

Met	Ala	Arg	Leu	Ala	Leu	Ser	Pro	Val	Pro	Ser	His	Trp	Met	Val
1					5				10				15	
Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Ala	Glu	Pro	Val	Pro	Ala	Ala	Arg
					20				25				30	
Ser	Glu	Asp	Arg	Tyr	Arg	Asn	Pro	Lys	Gly	Ser	Ala	Cys	Ser	Arg
					35				40				45	
Ile	Trp	Gln	Ser	Pro	Arg	Phe	Ile	Ala	Arg	Lys	Arg	Gly	Phe	Thr
.					50				55				60	
Val	Lys	Met	His	Cys	Tyr	Met	Asn	Ser	Ala	Ser	Gly	Asn	Val	Ser
					65				70				75	
Trp	Leu	Trp	Lys	Gln	Glu	Met	Asp	Glu	Asn	Pro	Gln	Gln	Leu	Lys
					80				85				90	
Leu	Glu	Lys	Gly	Arg	Met	Glu	Glu	Ser	Gln	Asn	Glu	Ser	Leu	Ala
					95				100				105	
Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Gly	Ile	Arg	Phe	Glu	Asp	Asn	Gly	Ile	Tyr
					110				115				120	
Phe	Cys	Gln	Gln	Lys	Cys	Asn	Asn	Thr	Ser	Glu	Val	Tyr	Gln	Gly
					125				130				135	
Cys	Gly	Thr	Glu	Leu	Arg	Val	Met	Gly	Phe	Ser	Thr	Leu	Ala	Gln
					140				145				150	
Leu	Lys	Gln	Arg	Asn	Thr	Leu	Lys	Asp	Gly	Ile	Ile	Met	Ile	Gln
					155				160				165	
Thr	Leu	Leu	Ile	Ile	Leu	Phe	Ile	Ile	Val	Pro	Ile	Phe	Leu	Leu
					170				175				180	
Leu	Asp	Lys	Asp	Asp	Ser	Lys	Ala	Gly	Met	Glu	Glu	Asp	His	Thr
					185				190				195	
Tyr	Glu	Gly	Leu	Asp	Ile	Asp	Gln	Thr	Ala	Thr	Tyr	Glu	Asp	Ile
.					200				205				210	
Val	Thr	Leu	Arg	Thr	Gly	Glu	Val	Lys	Trp	Ser	Val	Gly	Glu	His
					215				220				225	
<b>Pro Gly Gln Glu</b>														

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 508

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapien

&lt;400&gt; 16

## ES 2 605 443 T3

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

## ES 2 605 443 T3

185	190	195
His Val Gln Arg Ile Pro Ile Ser Asn Val Ser Leu Glu Ile Arg		
200	205	210
Ala Pro Gly Gly Gln Val Thr Glu Gly Gln Lys Leu Ile Leu Leu		
215	220	225
Cys Ser Val Ala Gly Gly Thr Gly Asn Val Thr Phe Ser Trp Tyr		
230	235	240
Arg Glu Ala Thr Gly Thr Ser Met Gly Lys Lys Thr Gln Arg Ser		
245	250	255
Leu Ser Ala Glu Leu Glu Ile Pro Ala Val Lys Glu Ser Asp Ala		
260	265	270
Gly Lys Tyr Tyr Cys Arg Ala Asp Asn Gly His Val Pro Ile Gln		
275	280	285
Ser Lys Val Val Asn Ile Pro Val Arg Ile Pro Val Ser Arg Pro		
290	295	300
Val Leu Thr Leu Arg Ser Pro Gly Ala Gln Ala Ala Val Gly Asp		
305	310	315
Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro Pro Ile		
320	325	330
Leu Tyr Gln Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Asn Ser Ser		
335	340	345
Ala Pro Ser Gly Gly Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Ala		
350	355	360
Glu His Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asn Asn Gly Leu Gly		
365	370	375
Ala Gln Cys Ser Glu Ala Val Pro Val Ser Ile Ser Gly Pro Asp		
380	385	390
Gly Tyr Arg Arg Asp Leu Met Thr Ala Gly Val Leu Trp Gly Leu		
395	400	405
Phe Gly Val Leu Gly Phe Thr Gly Val Ala Leu Leu Leu Tyr Ala		
410	415	420
Leu Phe His Lys Ile Ser Gly Glu Ser Ser Ala Thr Asn Glu Pro		
425	430	435
Arg Gly Ala Ser Arg Pro Asn Pro Gln Glu Phe Thr Tyr Ser Ser		
440	445	450
Pro Thr Pro Asp Met Glu Glu Leu Gln Pro Val Tyr Val Asn Val		
455	460	465
Gly Ser Val Asp Val Asp Val Val Tyr Ser Gln Val Trp Ser Met		
470	475	480
Gln Gln Pro Glu Ser Ser Ala Asn Ile Arg Thr Leu Leu Glu Asn		
485	490	495

Lys Asp Ser Gln Val Ile Tyr Ser Ser Val Lys Lys Ser  
500 . 505

5 <210> 17  
<211> 1255  
<212> PRT  
<213> Homo sapien  
  
<400> 17

## ES 2 605 443 T3

Met	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Cys	Arg	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu
1					5					10				15
Leu	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr	Asp
						20				25				30
Met	Lys	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met
					35				40					45
Leu	Arg	His	Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu
					50				55					60
Glu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln
					65				70					75
Asp	Ile	Gln	Glu	Val	Gln	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln
					80				85					90
Val	Arg	Gln	Val	Pro	Leu	Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr
						95			100					105
Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Asn	Tyr	Ala	Le <sup>U</sup>	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly
					110				115					120
Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr	Pro	Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly
					125				130					135
Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys
					140				145					150
Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg	Asn	Pro	Gln	Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp
					155				160					165
Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile	Phe	His	Lys	Asn	Asn	Gln	Leu	Ala
					170				175					180
Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg	Ala	Cys	His	Pro	Cys
					185				190					195
Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp	Gly	Glu	Ser	Ser	Glu
					200				205					210
Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Ala
					215				220					225
Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Gln	Cys
					230				235					240
Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Cys
					245				250					255

## ES 2 605 443 T3

Leu His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala  
                  260                     265                 270  
 Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro  
                  275                     280                 285  
 Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro  
                  290                     295                 300  
 Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys  
                  305                     310                 315  
 Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg  
                  320                     325                 330  
 Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu  
                  335                     340                 345  
 Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn  
                  350                     355                 360  
 Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala  
                  365                     370                 375  
 Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala  
                  380                     385                 390  
 Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu  
                  395                     400                 405  
 Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro  
                  410                     415                 420  
 Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile  
                  425                     430                 435  
 Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile  
                  440                     445                 450  
 Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu  
                  455                     460                 465  
 Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val  
                  470                     475                 480  
 Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His  
                  485                     490                 495  
 Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala  
                  500                     505                 510  
 Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro  
                  515                     520                 525  
 Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys  
                  530                     535                 540  
 Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val  
                  545                     550                 555  
 Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln

## ES 2 605 443 T3

560	565	570
Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val		
575	580	585
Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys		
590	595	600
Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys		
605	610	615
Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys		
620	625	630
Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu		
635	640	645
Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val Val Gly		
650	655	660
Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Ile		
665	670	675
Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg Leu		
680	685	690
Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala		
695	700	705
Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu		
710	715	720
Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr		
725	730	735
Lys Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val		
740	745	750
Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys		
755	760	765
Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro		
770	775	780
Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln		
785	790	795
Leu Val Thr Gln Leu Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val		
800	805	810
Arg Glu Asn Arg Gly Arg Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp		
815	820	825
Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg		
830	835	840
Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Ser		
845	850	855
Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Leu		
860	865	870

## ES 2 605 443 T3

Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp Gly Gly Lys Val Pro  
 875 880 885  
 Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg Arg Arg Phe Thr  
 890 895 900  
 His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu  
 905 910 915  
 Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg Glu  
 920 925 930  
 Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro  
 935 940 945  
 Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met  
 950 955 960  
 Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu  
 965 970 975  
 Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln  
 980 985 990  
 Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr  
 995 1000 1005  
 Arg Ser Leu Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala  
 1010 1015 1020  
 Glu Glu Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro  
 1025 1030 1035  
 Ala Pro Gly Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser  
 1040 1045 1050  
 Ser Thr Arg Ser Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro  
 1055 1060 1065  
 Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly  
 1070 1075 1080  
 Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala  
 1085 1090 1095  
 Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln  
 1100 1105 1110  
 Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp  
 1115 1120 1125  
 Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val  
 1130 1135 1140  
 Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly  
 1145 1150 1155  
 Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro  
 1160 1165 1170

ES 2 605 443 T3

Lys Thr Léu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe  
1175 1180 1185

Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln  
1190 1195 1200

Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Ala Phe Ser Pro  
1205 1210 1215

Ala Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg  
1220 1225 1230

Gly Ala Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn  
1235 1240 1245

Pro Glu Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro Val  
1250 1255

<210> 18  
<211> 344  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapien  
<400> 18

## ES 2 605 443 T3

Met Gly Pro Pro Ser Ala Pro Pro Cys Arg Leu His Val Pro Trp  
1 5 10 15

Lys Glu Val Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro  
20 25 30

Pro Thr Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val  
35 40 45

Ala Glu Gly Lys Glu Val Leu Leu Ala His Asn Leu Pro Gln  
50 55 60

Asn Arg Ile Gly Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly  
65 70 75

Asn Ser Leu Ile Val Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr  
80 85 90

Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala  
95 100 105

Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr  
110 115 120

Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr  
125 130 135

Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser  
140 145 150

Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe  
155 160 165

Thr Cys Glu Pro Glu Val Gln Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val  
170 175 180

Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn

## ES 2 605 443 T3

185	190	195
Gly Asn Met Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Lys Arg Asn Asp Ala		
200	205	210
Gly Ser Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Ala Ser Ala Asn Arg		
215	220	225
Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Val Pro		
230	235	240
Thr Ile Ser Pro Ser Lys Ala Asn Tyr Arg Pro Gly Glu Asn Leu		
245	250	255
Asn Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser		
260	265	270
Trp Phe Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe		
275	280	285
Ile Pro Asn Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln		
290	295	300
Ala His Asn Ser Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Met		
305	310	315
Ile Thr Val Ser Gly Ser Ala Pro Val Leu Ser Ala Val Ala Thr		
320	325	330
Val Gly Ile Thr Ile Gly Val Leu Ala Arg Val Ala Leu Ile		
335	340	

5

<210> 19  
 <211> 411  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien  
 <400> 19

ES 2 605 443 T3

Met	Trp	Ser	Gly	Trp	Trp	Leu	Trp	Pro	Leu	Val	Ala	Val	Cys	Thr
1				5					10				15	
Ala	Asp	Phe	Phe	Arg	Asp	Glu	Ala	Glu	Arg	Ile	Met	Arg	Asp	Ser
				20				25				30		
Pro	Val	Ile	Asp	Gly	His	Asn	Asp	Leu	Pro	Trp	Gln	Leu	Leu	Asp
					35				40			45		
Met	Phe	Asn	Asn	Arg	Leu	Gln	Asp	Glu	Arg	Ala	Asn	Leu	Thr	Thr
				50				55				60		
Leu	Ala	Gly	Thr	His	Thr	Asn	Ile	Pro	Lys	Leu	Arg	Ala	Gly	Phe
				65				70				75		
Val	Gly	Gly	Gln	Phe	Trp	Ser	Val	Tyr	Thr	Pro	Cys	Asp	Thr	Gln
				80				85				90		
Asn	Lys	Asp	Ala	Val	Arg	Arg	Thr	Leu	Glu	Gln	Met	Asp	Val	Val
				95				100				105		
His	Arg	Met	Cys	Arg	Met	Tyr	Pro	Glu	Thr	Phe	Leu	Tyr	Val	Thr
					110			115				120		

## ES 2 605 443 T3

Ser Ser Ala Gly Ile Arg Gln Ala Phe Arg Glu Gly Lys Val Ala  
                   125                  130                  135  
 Ser Leu Ile Gly Val Glu Gly Gly His Ser Ile Asp Ser Ser Leu  
                   140                  145                  150  
 Gly Val Leu Arg Ala Leu Tyr Gln Leu Gly Met Arg Tyr Leu Thr  
                   155                  160                  165  
 Leu Thr His Ser Cys Asn Thr Pro Trp Ala Asp Asn Trp Leu Val  
                   170                  175                  180  
 Asp Thr Gly Asp Ser Glu Pro Gln Ser Gln Gly Leu Ser Pro Phe  
                   185                  190                  195  
 Gly Gln Arg Val Val Lys Glu Leu Asn Arg Leu Gly Val Leu Ile  
                   200                  205                  210  
 Asp Leu Ala His Val Ser Val Ala Thr Met Lys Ala Thr Leu Gln  
                   215                  220                  225  
 Leu Ser Arg Ala Pro Val Ile Phe Ser His Ser Ser Ala Tyr Ser  
                   230                  235                  240  
 Val Cys Ala Ser Arg Arg Asn Val Pro Asp Asp Val Leu Arg Leu  
                   245                  250                  255  
 Val Lys Gln Thr Asp Ser Leu Val Met Val Asn Phe Tyr Asn Asn  
                   260                  265                  270  
 Tyr Ile Ser Cys Thr Asn Lys Ala Asn Leu Ser Gln Val Ala Asp  
                   275                  280                  285  
 His Leu Asp His Ile Lys Glu Val Ala Gly Ala Arg Ala Val Gly  
                   290                  295                  300  
 Phe Gly Gly Asp Phe Asp Gly Val Pro Arg Val Pro Glu Gly Leu  
                   305                  310                  315  
 Glu Asp Val Ser Lys Tyr Pro Asp Leu Ile Ala Glu Leu Leu Arg  
                   320                  325                  330  
 Arg Asn Trp Thr Glu Ala Glu Val Lys Gly Ala Leu Ala Asp Asn  
                   335                  340                  345  
 Leu Leu Arg Val Phe Glu Ala Val Glu Gln Ala Ser Asn Leu Thr  
                   350                  355                  360  
 Gln Ala Pro Glu Glu Glu Pro Ile Pro Leu Asp Gln Leu Gly Gly  
                   365                  370                  375  
 Ser Cys Arg Thr His Tyr Gly Tyr Ser Ser Gly Ala Ser Ser Leu  
                   380                  385                  390  
 His Arg His Trp Gly Leu Leu Leu Ala Ser Leu Ala Pro Leu Val  
                   395                  400                  405  
 Leu Cys Leu Ser Leu Leu  
                   410

5

<210> 20  
<211> 553  
<212> PRT  
<213> Homo sapien

<400> 20

## ES 2 605 443 T3

Met	Arg	Ala	Pro	Gly	Arg	Pro	Ala	Leu	Arg	Pro	Leu	Pro	Leu	Pro
1				5					10				15	
Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Pro	Trp	Gly	Arg	Ala	Val
							20			25			30	
Pro	Cys	Val	Ser	Gly	Gly	Leu	Pro	Lys	Pro	Ala	Asn	Ile	Thr	Phe
				35				40					45	
Leu	Ser	Ile	Asn	Met	Lys	Asn	Val	Leu	Gln	Trp	Thr	Pro	Pro	Glu
				50					55				60	
Gly	Leu	Gln	Gly	Val	Lys	Val	Thr	Tyr	Thr	Val	Gln	Tyr	Phe	Ile
				65				70				75		
Tyr	Gly	Gln	Lys	Lys	Trp	Leu	Asn	Lys	Ser	Glu	Cys	Arg	Asn	Ile
				80				85				90		
Asn	Arg	Thr	Tyr	Cys	Asp	Leu	Ser	Ala	Glu	Thr	Ser	Asp	Tyr	Glu
				95					100				105	
His	Gln	Tyr	Tyr	Ala	Lys	Val	Lys	Ala	Ile	Trp	Gly	Thr	Lys	Cys
				110				115				120		
Ser	Lys	Trp	Ala	Glu	Ser	Gly	Arg	Phe	Tyr	Pro	Phe	Leu	Glu	Thr
				125				130				135		
Gln	Ile	Gly	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Leu	Thr	Thr	Asp	Glu	Lys	Ser
				140				145				150		
Ile	Ser	Val	Val	Leu	Thr	Ala	Pro	Glu	Lys	Trp	Lys	Arg	Asn	Pro
				155				160				165		
Glu	Asp	Leu	Pro	Val	Ser	Met	Gln	Gln	Ile	Tyr	Ser	Asn	Leu	Lys
				170				175				180		
Tyr	Asn	Val	Ser	Val	Leu	Asn	Thr	Lys	Ser	Asn	Arg	Thr	Trp	Ser
				185				190				195		
Gln	Cys	Val	Thr	Asn	His	Thr	Leu	Val	Leu	Thr	Trp	Leu	Glu	Pro
				200				205				210		
Asn	Thr	Leu	Tyr	Cys	Val	His	Val	Glu	Ser	Phe	Val	Pro	Gly	Pro
				215				220				225		
Pro	Arg	Arg	Ala	Gln	Pro	Ser	Glu	Lys	Gln	Cys	Ala	Arg	Thr	Leu
				230				235				240		
Lys	Asp	Gln	Ser	Ser	Glu	Phe	Lys	Ala	Lys	Ile	Ile	Phe	Trp	Tyr
				245				250				255		
Val	Leu	Pro	Ile	Ser	Ile	Thr	Val	Phe	Leu	Phe	Ser	Val	Met	Gly
				260				265				270		
Tyr	Ser	Ile	Tyr	Arg	Tyr	Ile	His	Val	Gly	Lys	Glu	Lys	His	Pro

## ES 2 605 443 T3

275	280	285
Ala Asn Leu Ile Leu Ile Tyr Gly Asn Glu Phe Asp Lys Arg Phe		
290	295	300
Phe Val Pro Ala Glu Lys Ile Val Ile Asn Phe Ile Thr Leu Asn		
305	310	315
Ile Ser Asp Asp Ser Lys Ile Ser His Gln Asp Met Ser Leu Leu		
320	325	330
Gly Lys Ser Ser Asp Val Ser Ser Leu Asn Asp Pro Gln Pro Ser		
335	340	345
Gly Asn Leu Arg Pro Pro Gln Glu Glu Glu Val Lys His Leu		
350	355	360
Gly Tyr Ala Ser His Leu Met Glu Ile Phe Cys Asp Ser Glu Glu		
365	370	375
Asn Thr Glu Gly Thr Ser Phe Thr Gln Gln Glu Ser Leu Ser Arg		
380	385	390
Thr Ile Pro Pro Asp Lys Thr Val Ile Glu Tyr Glu Tyr Asp Val		
395	400	405
Arg Thr Thr Asp Ile Cys Ala Gly Pro Glu Glu Gln Glu Leu Ser		
410	415	420
Leu Gln Glu Glu Val Ser Thr Gln Gly Thr Leu Leu Glu Ser Gln		
425	430	435
Ala Ala Leu Ala Val Leu Gly Pro Gln Thr Leu Gln Tyr Ser Tyr		
440	445	450
Thr Pro Gln Leu Gln Asp Leu Asp Pro Leu Ala Gln Glu His Thr		
455	460	465
Asp Ser Glu Glu Gly Pro Glu Glu Glu Pro Ser Thr Thr Leu Val		
470	475	480
Asp Trp Asp Pro Gln Thr Gly Arg Leu Cys Ile Pro Ser Leu Ser		
485	490	495
Ser Phe Asp Gln Asp Ser Glu Gly Cys Glu Pro Ser Glu Gly Asp		
500	505	510
Gly Leu Gly Glu Glu Gly Leu Leu Ser Arg Leu Tyr Glu Glu Pro		
515	520	525
Ala Pro Asp Arg Pro Pro Gly Glu Asn Glu Thr Tyr Leu Met Gln		
530	535	540
Phe Met Glu Glu Trp Gly Leu Tyr Val Gln Met Glu Asn		
545	550	

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 911

&lt;212&gt; PRT

<213> Homo sapien

<400> 21

## ES 2 605 443 T3

Met Ala Gln Leu Phe Leu Pro Leu Leu Ala Ala Leu Val Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Gln Ala Pro Ala Ala Leu Ala Asp Val Leu Glu Gly Asp Ser Ser  
 20 25 30  
 Glu Asp Arg Ala Phe Arg Val Arg Ile Ala Gly Asp Ala Pro Leu  
 35 40 45  
 Gln Gly Val Leu Gly Gly Ala Leu Thr Ile Pro Cys His Val His  
 50 55 60  
 Tyr Leu Arg Pro Pro Pro Ser Arg Arg Ala Val Leu Gly Ser Pro  
 65 70 75  
 Arg Val Lys Trp Thr Phe Leu Ser Arg Gly Arg Glu Ala Glu Val  
 80 85 90  
 Leu Val Ala Arg Gly Val Arg Val Lys Val Asn Glu Ala Tyr Arg  
 95 100 105  
 Phe Arg Val Ala Leu Pro Ala Tyr Pro Ala Ser Leu Thr Asp Val  
 110 115 120  
 Ser Leu Ala Leu Ser Glu Leu Arg Pro Asn Asp Ser Gly Ile Tyr  
 125 130 135  
 Arg Cys Glu Val Gln His Gly Ile Asp Asp Ser Ser Asp Ala Val  
 140 145 150  
 Glu Val Lys Val Lys Gly Val Val Phe Leu Tyr Arg Glu Gly Ser  
 155 160 165  
 Ala Arg Tyr Ala Phe Ser Phe Ser Gly Ala Gln Glu Ala Cys Ala  
 170 175 180  
 Arg Ile Gly Ala His Ile Ala Thr Pro Glu Gln Leu Tyr Ala Ala  
 185 190 195  
 Tyr Leu Gly Gly Tyr Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Ser Asp  
 200 205 210  
 Gln Thr Val Arg Tyr Pro Ile Gln Thr Pro Arg Glu Ala Cys Tyr  
 215 220 225  
 Gly Asp Met Asp Gly Phe Pro Gly Val Arg Asn Tyr Gly Val Val  
 230 235 240  
 Asp Pro Asp Asp Leu Tyr Asp Val Tyr Cys Tyr Ala Glu Asp Leu  
 245 250 255  
 Asn Gly Glu Leu Phe Leu Gly Asp Pro Pro Glu Lys Leu Thr Leu  
 260 265 270  
 Glu Glu Ala Arg Ala Tyr Cys Gln Glu Arg Gly Ala Glu Ile Ala  
 275 280 285  
 Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Ala Ala Trp Asp Gly Gly Leu Asp His  
 290 295 300

## ES 2 605 443 T3

Cys Ser Pro Gly Trp Leu Ala Asp Gly Ser Val Arg Tyr Pro Ile  
                   305                  310                  315  
 Val Thr Pro Ser Gln Arg Cys Gly Gly Leu Pro Gly Val Lys  
                   320                  325                  330  
 Thr Leu Phe Leu Phe Pro Asn Gln Thr Gly Phe Pro Asn Lys His  
                   335                  340                  345  
 Ser Arg Phe Asn Val Tyr Cys Phe Arg Asp Ser Ala Gln Pro Ser  
                   350                  355                  360  
 Ala Ile Pro Glu Ala Ser Asn Pro Ala Ser Asn Pro Ala Ser Asp  
                   365                  370                  375  
 Gly Leu Glu Ala Ile Val Thr Val Thr Glu Thr Leu Glu Glu Leu  
                   380                  385                  390  
 Gln Leu Pro Gln Glu Ala Thr Glu Ser Glu Ser Arg Gly Ala Ile  
                   395                  400                  405  
 Tyr Ser Ile Pro Ile Met Glu Asp Gly Gly Gly Ser Ser Thr  
                   410                  415                  420  
 Pro Glu Asp Pro Ala Glu Ala Pro Arg Thr Leu Leu Glu Phe Glu  
                   425                  430                  435  
 Thr Gln Ser Met Val Pro Pro Thr Gly Phe Ser Glu Glu Glu Gly  
                   440                  445                  450  
 Lys Ala Leu Glu Glu Glu Lys Tyr Glu Asp Glu Glu Glu Lys  
                   455                  460                  465  
 Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Val Glu Asp Glu Ala Leu Trp  
                   470                  475                  480  
 Ala Trp Pro Ser Glu Leu Ser Ser Pro Gly Pro Glu Ala Ser Leu  
                   485                  490                  495  
 Pro Thr Glu Pro Ala Ala Gln Glu Lys Ser Leu Ser Gin Ala Pro  
                   500                  505                  510  
 Ala Arg Ala Val Leu Gln Pro Gly Ala Ser Pro Leu Pro Asp Gly  
                   515                  520                  525  
 Glu Ser Glu Ala Ser Arg Pro Pro Arg Val His Gly Pro Pro Thr  
                   530                  535                  540  
 Glu Thr Leu Pro Thr Pro Arg Glu Arg Asn Leu Ala Ser Pro Ser  
                   545                  550                  555  
 Pro Ser Thr Leu Val Glu Ala Arg Glu Val Gly Glu Ala Thr Gly  
                   560                  565                  570  
 Gly Pro Glu Leu Ser Gly Val Pro Arg Gly Glu Ser Glu Glu Thr  
                   575                  580                  585  
 Gly Ser Ser Glu Gly Ala Pro Ser Leu Leu Pro Ala Thr Arg Ala  
                   590                  595                  600  
 Pro Glu Gly Thr Arg Glu Leu Glu Ala Pro Ser Glu Asp Asn Ser

## ES 2 605 443 T3

605	610	615
Gly Arg Thr Ala Pro Ala Gly Thr Ser Val Gln Ala Gln Pro Val		
620	625	630
Leu Pro Thr Asp Ser Ala Ser Arg Gly Gly Val Ala Val Val Pro		
635	640	645
Ala Ser Gly Asp Cys Val Pro Ser Pro Cys His Asn Gly Gly Thr		
650	655	660
Cys Leu Glu Glu Glu Glu Gly Val Arg Cys Leu Cys Leu Pro Gly		
665	670	675
Tyr Gly Gly Asp Leu Cys Asp Val Gly Leu Arg Phe Cys Asn Pro		
680	685	690
Gly Trp Asp Ala Phe Gln Gly Ala Cys Tyr Lys His Phe Ser Thr		
695	700	705
Arg Arg Ser Trp Glu Glu Ala Glu Thr Gln Cys Arg Met Tyr Gly		
710	715	720
Ala His Leu Ala Ser Ile Ser Thr Pro Glu Glu Gln Asp Phe Ile		
725	730	735
Asn Asn Arg Tyr Arg Glu Tyr Gln Trp Ile Gly Leu Asn Asp Arg		
740	745	750
Thr Ile Glu Gly Asp Phe Leu Trp Ser Asp Gly Val Pro Leu Leu		
755	760	765
Tyr Glu Asn Trp Asn Pro Gly Gln Pro Asp Ser Tyr Phe Leu Ser		
770	775	780
Gly Glu Asn Cys Val Val Met Val Trp His Asp Gln Gly Gln Trp		
785	790	795
Ser Asp Val Pro Cys Asn Tyr His Leu Ser Tyr Thr Cys Lys Met		
800	805	810
Gly Leu Val Ser Cys Gly Pro Pro Pro Glu Leu Pro Leu Ala Gln		
815	820	825
Val Phe Gly Arg Pro Arg Leu Arg Tyr Glu Val Asp Thr Val Leu		
830	835	840
Arg Tyr Arg Cys Arg Glu Gly Leu Ala Gln Arg Asn Leu Pro Leu		
845	850	855
Ile Arg Cys Gln Glu Asn Gly Arg Trp Glu Ala Pro Gln Ile Ser		
860	865	870
Cys Val Pro Arg Arg Pro Ala Arg Ala Leu His Pro Glu Glu Asp		
875	880	885
Pro Glu Gly Arg Gln Gly Arg Leu Leu Gly Arg Trp Lys Ala Leu		
890	895	900
Leu Ile Pro Pro Ser Ser Pro Met Pro Gly Pro		
905	910	

## ES 2 605 443 T3

<210> 22  
<211> 987  
<212> PRT  
<213> Homo sapien

5

&lt;400&gt; 22

Met	Ala	Leu	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu
1					5				10				15	
Leu	Ala	Ala	Val	Glu	Glu	Thr	Leu	Met	Asp	Ser	Thr	Thr	Ala	Thr
				20					25				30	
Ala	Glu	Leu	Gly	Trp	Met	Val	His	Pro	Pro	Ser	Gly	Trp	Glu	Glu
				35				40				45		
Val	Ser	Gly	Tyr	Asp	Glu	Asn	Met	Asn	Thr	Ile	Arg	Thr	Tyr	Gln
				50				55				60		
Val	Cys	Asn	Val	Phe	Glu	Ser	Ser	Gln	Asn	Asn	Trp	Leu	Arg	Thr
				65				70				75		
Lys	Phe	Ile	Arg	Arg	Arg	Gly	Ala	His	Arg	Ile	His	Val	Glu	Met
				80				85				90		
Lys	Phe	Ser	Val	Arg	Asp	Cys	Ser	Ser	Ile	Pro	Ser	Val	Pro	Gly
				95				100				105		
Ser	Cys	Lys	Glu	Thr	Phe	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Glu	Ala	Asp	Phe
				110				115				120		
Asp	Ser	Ala	Thr	Lys	Thr	Phe	Pro	Asn	Trp	Met	Glu	Asn	Pro	Trp
				125				130				135		
Val	Lys	Val	Asp	Thr	Ile	Ala	Ala	Asp	Glu	Ser	Phe	Ser	Gln	Val
				140				145				150		
Asp	Leu	Gly	Gly	Arg	Val	Met	Lys	Ile	Asn	Thr	Glu	Val	Arg	Ser
				155				160				165		
Phe	Gly	Pro	Val	Ser	Arg	Ser	Gly	Phe	Tyr	Leu	Ala	Phe	Gln	Asp
				170				175				180		
Tyr	Gly	Gly	Cys	Met	Ser	Leu	Ile	Ala	Val	Arg	Val	Phe	Tyr	Arg
				185				190				195		
Lys	Cys	Pro	Arg	Ile	Ile	Gln	Asn	Gly	Ala	Ile	Phe	Gln	Glu	Thr
				200				205				210		
Leu	Ser	Gly	Ala	Glu	Ser	Thr	Ser	Leu	Val	Ala	Ala	Arg	Gly	Ser
				215				220				225		
Cys	Ile	Ala	Asn	Ala	Glu	Glu	Val	Asp	Val	Pro	Ile	Lys	Leu	Tyr
				230				235				240		
Cys	Asn	Gly	Asp	Gly	Glu	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Arg	Cys	Met
				245				250				255		
Cys	Lys	Ala	Gly	Phe	Glu	Ala	Val	Glu	Asn	Gly	Thr	Val	Cys	Arg
				260				265				270		

## ES 2 605 443 T3

Gly Cys Pro Ser Gly Thr Phe Lys Ala Asn Gln Gly Asp Glu Ala  
 275 280 285  
 Cys Thr His Cys Pro Ile Asn Ser Arg Thr Thr Ser Glu Gly Ala  
 290 295 300  
 Thr Asn Cys Val Cys Arg Asn Gly Tyr Tyr Arg Ala Asp Leu Asp  
 305 310 315  
 Pro Leu Asp Met Pro Cys Thr Thr Ile Pro Ser Ala Pro Gln Ala  
 320 325 330  
 Val Ile Ser Ser Val Asn Glu Thr Ser Leu Met Leu Glu Trp Thr.  
 335 340 345  
 Pro Pro Arg Asp Ser Gly Gly Arg Glu Asp Leu Val Tyr Asn Ile  
 350 355 360  
 Ile Cys Lys Ser Cys Gly Ser Gly Arg Gly Ala Cys Thr Arg Cys  
 365 370 375  
 Gly Asp Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Gln Leu Gly Leu Thr Glu  
 380 385 390  
 Pro Arg Ile Tyr Ile Ser Asp Leu Leu Ala His Thr Gln Tyr Thr  
 395 400 405  
 Phe Glu Ile Gln Ala Val Asn Gly Val Thr Asp Gln Ser Pro Phe  
 410 415 420  
 Ser Pro Gln Phe Ala Ser Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala  
 425 430 435  
 Pro Ser Ala Val Ser Ile Met His Gln Val Ser Arg Thr Val Asp  
 440 445 450  
 Ser Ile Thr Leu Ser Trp Ser Gln Pro Asp Gln Pro Asn Gly Val  
 455 460 465  
 Ile Leu Asp Tyr Glu Leu Gln Tyr Tyr Glu Lys Glu Leu Ser Glu  
 470 475 480  
 Tyr Asn Ala Thr Ala Ile Lys Ser Pro Thr Asn Thr Val Thr Val  
 485 490 495  
 Gln Gly Leu Lys Ala Gly Ala Ile Tyr Val Phe Gln Val Arg Ala  
 500 505 510  
 Arg Thr Val Ala Gly Tyr Gly Arg Tyr Ser Gly Lys Met Tyr Phe  
 515 520 525  
 Gln Thr Met Thr Glu Ala Glu Tyr Gln Thr Ser Ile Gln Glu Lys  
 530 535 540  
 Leu Pro Leu Ile Ile Gly Ser Ser Ala Ala Gly Leu Val Phe Leu  
 545 550 555  
 Ile Ala Val Val Val Ile Ala Ile Val Cys Asn Arg Arg Arg Gly  
 560 565 570  
 Phe Glu Arg Ala Asp Ser Glu Tyr Thr Asp Lys Leu Gln His Tyr

## ES 2 605 443 T3

575	580	585
Thr Ser Gly His Met Thr Pro Gly Met	Lys Ile Tyr Ile Asp Pro	
590	595	600
Phe Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Glu Ala Val Arg Glu Phe Ala Lys		
605	610	615
Glu Ile Asp Ile Ser Cys Val Lys Ile Glu Gln Val Ile Gly Ala		
620	625	630
Gly Glu Phe Gly Glu Val Cys Ser Gly His Leu Lys Leu Pro Gly		
635	640	645
Lys Arg Glu Ile Phe Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Ser Gly Tyr		
650	655	660
Thr Glu Lys Gln Arg Arg Asp Phe Leu Ser Glu Ala Ser Ile Met		
665	670	675
Gly Gln Phe Asp His Pro Asn Val Ile His Leu Glu Gly Val Val		
680	685	690
Thr Lys Ser Thr Pro Val Met Ile Ile Thr Glu Phe Met Glu Asn		
695	700	705
Gly Ser Leu Asp Ser Phe Leu Arg Gln Asn Asp Gly Gln Phe Thr		
710	715	720
Val Ile Gln Leu Val Gly Met Leu Arg Gly Ile Ala Ala Gly Met		
725	730	735
Lys Tyr Leu Ala Asp Met Asn Tyr Val His Arg Asp Leu Ala Ala		
740	745	750
Arg Asn Ile Leu Val Asn Ser Asn Leu Val Cys Lys Val Ser Asp		
755	760	765
Phe Gly Leu Ser Arg Phe Leu Glu Asp Asp Thr Ser Asp Pro Thr		
770	775	780
Tyr Thr Ser Ala Leu Gly Gly Lys Ile Pro Ile Arg Trp Thr Ala		
785	790	795
Pro Glu Ala Ile Gln Tyr Arg Lys Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val		
800	805	810
Trp Ser Tyr Gly Ile Val Met Trp Glu Val Met Ser Tyr Gly Glu		
815	820	825
Arg Pro Tyr Trp Asp Met Thr Asn Gln Asp Val Ile Asn Ala Ile		
830	835	840
Glu Gln Asp Tyr Arg Leu Pro Pro Met Asp Cys Pro Ser Ala		
845	850	855
Leu His Gln Leu Met Leu Asp Cys Trp Gln Lys Asp Arg Asn His		
860	865	870
Arg Pro Lys Phe Gly Gln Ile Val Asn Thr Leu Asp Lys Met Ile		
875	880	885

ES 2 605 443 T3

Arg Asn Pro Asn Ser Leu Lys Ala Met Ala Pro Leu Ser Ser Gly  
890 895 900

Ile Asn Leu Pro Leu Leu Asp Arg Thr Ile Pro Asp Tyr Thr Ser  
905 910 915

Phe Asn Thr Val Asp Glu Trp Leu Glu Ala Ile Lys Met Gly Gln  
920 925 930

Tyr Lys Glu Ser Phe Ala Asn Ala Gly Phe Thr Ser Phe Asp Val  
935 940 945

Val Ser Gln Met Met Glu Asp Ile Leu Arg Val Gly Val Thr  
950 955 960

Leu Ala Gly His Gln Lys Lys Ile Leu Asn Ser Ile Gln Val Met  
965 970 975

Arg Ala Gln Met Asn Gln Ile Gln Ser Val Glu Val  
980 985

5

<210> 23  
<211> 282  
<212> PRT  
<213> Homo sapien

<400> 23

## ES 2 605 443 T3

Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile  
 1 5 10 15  
 Ile Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly  
 20 25 30  
 Ile Ser Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala  
 35 40 45  
 Gly Asn Ile Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro  
 50 55 60  
 Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly  
 65 70 75  
 Val Leu Gly Leu Val His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu  
 80 85 90  
 Ser Glu Gln Asp Glu Met Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala  
 95 100 105  
 Asp Gln Val Ile Val Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val  
 110 115 120  
 Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser  
 125 130 135  
 Lys Gly Lys Lys Asn Ala Asn Leu Glu Tyr Lys Thr Gly Ala Phe  
 140 145 150  
 Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn Ala Ser Ser Glu Thr  
 155 160 165  
  
 Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln Pro Thr Val Val  
 170 175 180  
 Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser Glu Val Ser  
 185 190 195  
 Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met Lys Val  
 200 205 210  
 Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser Cys  
 215 220 225  
 Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val  
 230 235 240  
 Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn  
 245 250 255  
 Ser Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp  
 260 265 270  
 Ala Leu Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys  
 275 280

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 123

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapien

## ES 2 605 443 T3

&lt;400&gt; 24

	Met Lys Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Met Ala Gly Leu Ala Leu		
1	5	10	15
	Gln Pro Gly Thr Ala Leu Leu Cys Tyr Ser Cys Lys Ala Gln Val		
	20	25	30
	Ser Asn Glu Asp Cys Leu Gln Val Glu Asn Cys Thr Gln Leu Gly		
	35	40	45
	Glu Gln Cys Trp Thr Ala Arg Ile Arg Ala Val Gly Leu Leu Thr		
	50	55	60
	Val Ile Ser Lys Gly Cys Ser Leu Asn Cys Val Asp Asp Ser Gln		
	65	70	75
	Asp Tyr Tyr Val Gly Lys Lys Asn Ile Thr Cys Cys Asp Thr Asp		
	80	85	90
	Leu Cys Asn Ala Ser Gly Ala His Ala Leu Gln Pro Ala Ala Ala		
	95	100	105
	Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala Leu Gly Leu Leu Leu Trp Gly Pro		
	110	115	120
	Gly Gln Leu		

5 &lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 236

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapien

10 &lt;400&gt; 25

Met	Pro	Gly	Ala	Met										
1														15
Leu	Pro	Ala	Gln	Glu	Ala	Ala	Lys	Leu	Tyr	His	Thr	Asn	Tyr	Val
														30
Arg	Asn	Ser	Arg	Ala	Ile	Gly	Val	Leu	Trp	Ala	Ile	Phe	Thr	Ile
					35					40				45
Cys	Phe	Ala	Ile	Val	Asn	Val	Val	Cys	Phe	Ile	Gln	Pro	Tyr	Trp
					50				55					60
Ile	Gly	Asp	Gly	Val	Asp	Thr	Pro	Gln	Ala	Gly	Tyr	Phe	Gly	Leu
					65				70					75
Phe	His	Tyr	Cys	Ile	Gly	Asn	Gly	Phe	Ser	Arg	Glu	Leu	Thr	Cys
					80				85					90
Arg	Gly	Ser	Phe	Thr	Asp	Phe	Ser	Thr	Leu	Pro	Ser	Gly	Ala	Phe
					95				100					105
Lys	Ala	Ala	Ser	Phe	Phe	Ile	Gly	Leu	Ser	Met	Met	Leu	Ile	Ile
					110				115					120
Ala	Cys	Ile	Ile	Cys	Phe	Thr	Leu	Phe	Phe	Phe	Cys	Asn	Thr	Ala
					125				130					135
Thr	Val	Tyr	Lys	Ile	Cys	Ala	Trp	Met	Gln	Leu	Thr	Ser	Ala	Ala
					140				145					150
Cys	Leu	Val	Leu	Gly	Cys	Met	Ile	Phe	Pro	Asp	Gly	Trp	Asp	Ser
					155				160					165
Asp	Glu	Val	Lys	Arg	Met	Cys	Gly	Glu	Lys	Thr	Asp	Lys	Tyr	Thr
					170				175					180
Leu	Gly	Ala	Cys	Ser	Val	Arg	Trp	Ala	Tyr	Ile	Leu	Ala	Ile	Ile
					185				190					195
Gly	Ile	Leu	Asp	Ala	Leu	Ile	Leu	Ser	Phe	Leu	Ala	Phe	Val	Leu
					200				205					210
Gly	Asn	Arg	Gln	Asp	Ser	Leu	Met	Ala	Glu	Glu	Leu	Lys	Ala	Glu
					215				220					225
Asn	Lys	Val	Leu	Leu	Ser	Gln	Tyr	Ser	Leu	Glu				
					230				235					

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 184

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapien

&lt;400&gt; 26

## ES 2 605 443 T3

Met	Arg	Arg	Gly	Pro	Arg	Ser	Leu	Arg	Gly	Arg	Asp	Ala	Pro	Ala
1														15
Pro	Thr	Pro	Cys	Val	Pro	Ala	Glu	Cys	Phe	Asp	Leu	Leu	Val	Arg
														30
His	Cys	Val	Ala	Cys	Gly	Leu	Leu	Arg	Thr	Pro	Arg	Pro	Lys	Pro
														45
Ala	Gly	Ala	Ser	Ser	Pro	Ala	Pro	Arg	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro	Gln
														60
Glu	Ser	Val	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Ala	Leu	Pro	Leu	Pro
														75
Gly	Leu	Leu	Phe	Gly	Ala	Pro	Ala	Leu	Leu	Gly	Leu	Ala	Leu	Val
														90
Leu	Ala	Leu	Val	Leu	Val	Gly	Leu	Val	Ser	Trp	Arg	Arg	Arg	Gln
														105
Arg	Arg	Leu	Arg	Gly	Ala	Ser	Ser	Ala	Glu	Ala	Pro	Asp	Gly	Asp
														120
Lys	Asp	Ala	Pro	Glu	Pro	Leu	Asp	Lys	Val	Ile	Ile	Leu	Ser	Pro
														135
Gly	Ile	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Pro	Ala	Trp	Pro	Pro	Pro	Gly	Glu
														150
Asp	Pro	Gly	Thr	Thr	Pro	Pro	Gly	His	Ser	Val	Pro	Val	Pro	Ala
														165
Thr	Glu	Leu	Gly	Ser	Thr	Glu	Leu	Val	Thr	Thr	Lys	Thr	Ala	Gly
														180
Pro	Glu	Gln	Gln											

5

<210> 27  
<211> 847  
<212> PRT  
<213> Homo sapien  
<400> 27

ES 2 605 443 T3

Met	His	Leu	Leu	Gly	Pro	Trp	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Glu	Tyr
1							5					10		15
Leu	Ala	Phe	Ser	Asp	Ser	Ser	Lys	Trp	Val	Phe	Glu	His	Pro	Glu
							20			25			30	
Thr	Leu	Tyr	Ala	Trp	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Trp	Ile	Pro	Cys	Thr
					35					40			45	
Tyr	Arg	Ala	Leu	Asp	Gly	Asp	Leu	Glu	Ser	Phe	Ile	Leu	Phe	His
							50		55			60		
Asn	Pro	Glu	Tyr	Asn	Lys	Asn	Thr	Ser	Lys	Phe	Asp	Gly	Thr	Arg
					65				70			75		
Leu	Tyr	Glu	Ser	Thr	Lys	Asp	Gly	Lys	Val	Pro	Ser	Glu	Gln	Lys
					80				85			90		
Arg	Val	Gln	Phe	Leu	Gly	Asp	Lys	Asn	Lys	Asn	Cys	Thr	Leu	Ser
								95		100		,	105	

## ES 2 605 443 T3

Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg  
                   110                  115                  120  
  
 Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn  
                   125                  130                  135  
  
 Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu  
                   140                  145                  150  
  
 Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe  
                   155                  160                  165  
  
 Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly  
                   170                  175                  180  
  
 Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile  
                   185                  190                  195  
  
 Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp  
                   200                  205                  210  
  
 Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp  
                   215                  220                  225  
  
 Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His  
                   230                  235                  240  
  
 Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val  
                   245                  250                  255  
  
 Arg Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser  
                   260                  265                  270  
  
 Asn Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser  
                   275                  280                  285  
  
 Leu Lys Lys Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr  
                   290                  295                  300  
  
 Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val  
                   305                  310                  315  
  
 Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala  
                   320                  325                  330  
  
 Pro Glu Pro Ser Thr Val Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu  
                   335                  340                  345  
  
 Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu  
                   350                  355                  360  
  
 Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly  
                   365                  370                  375  
  
 Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His  
                   380                  385                  390  
  
 Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly  
                   395                  400                  405  
  
 Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys

## ES 2 605 443 T3

410	415	420
Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met	Pro Ile Arg Glu Gly	
425	430	435
Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser		
440	445	450
Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro		
455	460	465
Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr		
470	475	480
Thr Ile Ala Cys Ala Arg Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser		
485	490	495
Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val		
500	505	510
Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val		
515	520	525
Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln		
530	535	540
Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln		
545	550	555
Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser		
560	565	570
Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp		
575	580	585
Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met		
590	595	600
Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr		
605	610	615
Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe		
620	625	630
Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg		
635	640	645
Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln		
650	655	660
Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu		
665	670	675
Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val		
680	685	690
Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys Gly		
695	700	705
Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly		
710	715	720

## ES 2 605 443 T3

Leu	Gln	Glu	Asn	Ser	Ser	Gly	Gln	Ser	Phe	Phe	Val	Arg	Asn	Lys
									725	730				735
Lys	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Leu	Ser	Glu	Gly	Pro	His	Ser	Leu	Gly
									740	745				750
Cys	Tyr	Asn	Pro	Met	Met	Glu	Asp	Gly	Ile	Ser	Tyr	Thr	Thr	Leu
									755	760				765
Arg	Phe	Pro	Glu	Met	Asn	Ile	Pro	Arg	Thr	Gly	Asp	Ala	Glu	Ser
									770	775				780
Ser	Glu	Met	Gln	Arg	Pro	Pro	Arg	Thr	Cys	Asp	Asp	Thr	Val	Thr
									785	790				795
Tyr	Ser	Ala	Leu	His	Lys	Arg	Gln	Val	Gly	Asp	Tyr	Glu	Asn	Val
									800	805				810
Ile	Pro	Asp	Phe	Pro	Glu	Asp	Glu	Gly	Ile	His	Tyr	Ser	Glu	Leu
									815	820				825
Ile	Gln	Phe	Gly	Val	Gly	Glu	Arg	Pro	Gln	Ala	Gln	Glu	Asn	Val
									830	835				840
Asp	Tyr	Val	Ile	Leu	Lys	His								
									845					

5

<210> 28  
<211> 226  
<212> PRT  
<213> Homo sapien

&lt;400&gt; 28

Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile		
1	5	10
Phe Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys		
20	25	30
Gln Ala Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser		
35	40	45
Leu Gly Glu Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn		
50	55	60
Asn Ala Asn Val Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr		
65	70	75
Trp Pro Pro Glu Phe Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr		
80	85	90
Leu Ile Ile Gln Asn Val Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val		
95	100	105
Cys Arg Val Gln Glu Gly Asn Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly		
110	115	120
Thr Tyr Leu Arg Val Arg Gln Pro Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp		
125	130	135
Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile Ile Thr Ala Glu Gly Ile		
140	145	150
Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly Thr Leu Leu Leu Phe		
155	160	165
Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu Asp Ala Gly Asp		
170	175	180
Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp		
185	190	195
Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly Thr Tyr		
200	205	210
Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu Lys		
215	220	225

Pro

<210> 29  
<211> 372  
<212> PRT  
<213> Homo sapien  
  
<400> 29

## ES 2 605 443 T3

Met Asn Tyr Pro Leu Thr Leu Glu Met Asp Leu Glu Asn Leu Glu  
1 5 10 15

Asp Leu Phe Trp Glu Leu Asp Arg Leu Asp Asn Tyr Asn Asp Thr  
20 25 30

Ser Leu Val Glu Asn His Leu Cys Pro Ala Thr Glu Gly Pro Leu  
35 40 45

Met Ala Ser Phe Lys Ala Val Phe Val Pro Val Ala Tyr Ser Leu  
50 55 60

Ile Phe Leu Leu Gly Val Ile Gly Asn Val Leu Val Leu Val Ile  
65 70 75

Leu Glu Arg His Arg Gln Thr Arg Ser Ser Thr Glu Thr Phe Leu  
80 85 90

Phe His Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu Val Phe Ile Leu Pro  
95 100 105

Phe Ala Val Ala Glu Gly Ser Val Gly Trp Val Leu Gly Thr Phe  
110 115 120

Leu Cys Lys Thr Val Ile Ala Leu His Lys Val Asn Phe Tyr Cys  
125 130 135

Ser Ser Leu Leu Ala Cys Ile Ala Val Asp Arg Tyr Leu Ala  
140 145 150

Ile Val His Ala Val His Ala Tyr Arg His Arg Arg Leu Leu Ser  
155 160 165

Ile His Ile Thr Cys Gly Thr Ile Trp Leu Val Gly Phe Leu Leu

170	175	180
<b>Ala Leu Pro Glu Ile Leu Phe Ala Lys Val Ser Gln Gly His His</b>		
185	190	195
<b>Asn Asn Ser Leu Pro Arg Cys Thr Phe Ser Gln Glu Asn Gln Ala</b>		
200	205	210
<b>Glu Thr His Ala Trp Phe Thr Ser Arg Phe Leu Tyr His Val Ala</b>		
215	220	225
<b>Gly Phe Leu Leu Pro Met Leu Val Met Gly Trp Cys Tyr Val Gly</b>		
230	235	240
<b>Val Val His Arg Leu Arg Gln Ala Gln Arg Arg Pro Gln Arg Gln</b>		
245	250	255
<b>Lys Ala Val Arg Val Ala Ile Leu Val Thr Ser Ile Phe Phe Leu</b>		
260	265	270
<b>Cys Trp Ser Pro Tyr His Ile Val Ile Phe Leu Asp Thr Leu Ala</b>		
275	280	285
<b>Arg Leu Lys Ala Val Asp Asn Thr Cys Lys Leu Asn Gly Ser Leu</b>		
290	295	300
<b>Pro Val Ala Ile Thr Met Cys Glu Phe Leu Gly Leu Ala His Cys</b>		
305	310	315
<b>Cys Leu Asn Pro Met Leu Tyr Thr Phe Ala Gly Val Lys Phe Arg</b>		
320	325	330
<b>Ser Asp Leu Ser Arg Leu Leu Thr Lys Leu Gly Cys Thr Gly Pro</b>		
335	340	345
<b>Ala Ser Leu Cys Gln Leu Phe Pro Ser Trp Arg Arg Ser Ser Leu</b>		
350	355	360
<b>Ser Glu Ser Glu Asn Ala Thr Ser Leu Thr Thr Phe</b>		
365	370	

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 273

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapien

&lt;400&gt; 30

Met	Gly	Ser	Gly	Trp	Val	Pro	Trp	Val	Val	Ala	Leu	Leu	Val	Asn
1					5				10					15
Leu	Thr	Arg	Leu	Asp	Ser	Ser	Met	Thr	Gln	Gly	Thr	Asp	Ser	Pro
					20				25					30
Glu	Asp	Phe	Val	Ile	Gln	Ala	Lys	Ala	Asp	Cys	Tyr	Phe	Thr	Asn
					35				40					45
Gly	Thr	Glu	Lys	Val	Gln	Phe	Val	Val	Arg	Phe	Ile	Phe	Asn	Leu
					50				55					60
Glu	Glu	Tyr	Val	Arg	Phe	Asp	Ser	Asp	Val	Gly	Met	Phe	Val	Ala
					65				70					75
Leu	Thr	Lys	Leu	Gly	Gln	Pro	Asp	Ala	Glu	Gln	Trp	Asn	Ser	Arg
					80				85					90
Leu	Asp	Leu	Leu	Glu	Arg	Ser	Arg	Gln	Ala	Val	Asp	Gly	Val	Cys
					95				100					105
Arg	His	Asn	Tyr	Arg	Leu	Gly	Ala	Pro	Phe	Thr	Val	Gly	Arg	Lys
					110				115					120
Val	Gln	Pro	Glu	Val	Thr	Val	Tyr	Pro	Glu	Arg	Thr	Pro	Leu	Leu
					125				130					135
His	Gln	His	Asn	Leu	Leu	His	Cys	Ser	Val	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro
					140				145					150
Gly	Asp	Ile	Lys	Ile	Lys	Trp	Phe	Leu	Asn	Gly	Gln	Glu	Glu	Arg
					155				160					165
Ala	Gly	Val	Met	Ser	Thr	Gly	Pro	Ile	Arg	Asn	Gly	Asp	Trp	Thr
					170				175					180
Phe	Gln	Thr	Val	Val	Met	Leu	Glu	Met	Thr	Pro	Glu	Leu	Gly	His
					185				190					195
Val	Tyr	Thr	Cys	Leu	Val	Asp	His	Ser	Ser	Leu	Leu	Ser	Pro	Val
					200				205					210
Ser	Val	Glu	Trp	Arg	Ala	Gln	Ser	Glu	Tyr	Ser	Trp	Arg	Lys	Met
					215				220					225
Leu	Ser	Gly	Ile	Ala	Ala	Phe	Leu	Leu	Gly	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu
					230				235					240
Val	Gly	Ile	Val	Ile	Gln	Leu	Arg	Ala	Gln	Lys	Gly	Tyr	Val	Arg
					245				250					255
Thr	Gln	Met	Ser	Gly	Asn	Glu	Val	Ser	Arg	Ala	Val	Leu	Leu	Pro
					260				265					270
Gln Ser Cys														

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 422

&lt;212&gt; PRT

ES 2 605 443 T3

<213> Homo sapien

<400> 31

Met	Gly	Gln	Ala	Gly	Cys	Lys	Gly	Leu	Cys	Leu	Ser	Leu	Phe	Asp
1					5					10				15
Tyr	Lys	Thr	Glu	Lys	Tyr	Val	Ile	Ala	Lys	Asn	Lys	Lys	Val	Gly
					20				25				30	
Leu	Leu	Tyr	Arg	Leu	Leu	Gln	Ala	Ser	Ile	Leu	Ala	Tyr	Leu	Val
						35			40				45	
Val	Trp	Val	Phe	Leu	Ile	Lys	Lys	Gly	Tyr	Gln	Asp	Val	Asp	Thr
						50			55				60	

5

## ES 2 605 443 T3

Ser Leu Gln Ser Ala Val Ile Thr Lys Val Lys Gly Val Ala Phe  
                   65                    70                    75  
 Thr Asn Thr Ser Asp Leu Gly Gln Arg Ile Trp Asp Val Ala Asp  
                   80                    85                    90  
 Tyr Val Ile Pro Ala Gln Gly Glu Asn Val Phe Phe Val Val Thr  
                   95                    100                  105  
 Asn Leu Ile Val Thr Pro Asn Gln Arg Gln Asn Val Cys Ala Glu  
                   110                    115                  120  
 Asn Glu Gly Ile Pro Asp Gly Ala Cys Ser Lys Asp Ser Asp Cys  
                   125                    130                  135  
 His Ala Gly Glu Ala Val Thr Ala Gly Asn Gly Val Lys Thr Gly  
                   140                    145                  150  
 Arg Cys Leu Arg Arg Glu Asn Leu Ala Arg Gly Thr Cys Glu Ile  
                   155                    160                  165  
 Phe Ala Trp Cys Pro Leu Glu Thr Ser Ser Arg Pro Glu Glu Pro  
                   170                    175                  180  
 Phe Leu Lys Glu Ala Glu Asp Phe Thr Ile Phe Ile Lys Asn His  
                   185                    190                  195  
 Ile Arg Phe Pro Lys Phe Asn Phe Ser Lys Ser Asn Val Met Asp  
                   200                    205                  210  
 Val Lys Asp Arg Ser Phe Leu Lys Ser Cys His Phe Gly Pro Lys  
                   215                    220                  225  
 Asn His Tyr Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Ser Val Ile Arg Trp  
                   230                    235                  240  
 Ala Gly Ser Asp Phe Gln Asp Ile Ala Leu Glu Gly Val Ile  
                   245                    250                  255  
 Gly Ile Asn Ile Glu Trp Asn Cys Asp Leu Asp Lys Ala Ala Ser  
                   260                    265                  270  
 Glu Cys His Pro His Tyr Ser Phe Ser Arg Leu Asp Asn Lys Leu  
                   275                    280                  285  
 Ser Lys Ser Val Ser Ser Gly Tyr Asn Phe Arg Phe Ala Arg Tyr  
                   290                    295                  300  
 Tyr Arg Asp Ala Ala Gly Val Glu Phe Arg Thr Leu Met Lys Ala  
                   305                    310                  315  
 Tyr Gly Ile Arg Phe Asp Val Met Val Asn Gly Lys Gly Ala Phe  
                   320                    325                  330  
 Phe Cys Asp Leu Val Leu Ile Tyr Leu Ile Lys Lys Arg Glu Phe  
                   335                    340                  345  
 Tyr Arg Asp Lys Lys Tyr Glu Glu Val Arg Gly Leu Glu Asp Ser  
                   350                    355                  360  
 Ser Gln Glu Ala Glu Asp Glu Ala Ser Gly Leu Gly Leu Ser Glu

365	370	375
-----	-----	-----

Gln Leu Thr Ser Gly Pro Gly Leu Leu Gly Met Pro Glu Gln Gln 380	385	390
--	-----	-----

Glu Leu Gln Glu Pro Pro Glu Ala Lys Arg Gly Ser Ser Ser Gln 395	400	405
--	-----	-----

Lys Gly Asn Gly Ser Val Cys Pro Gln Leu Leu Glu Pro His Arg 410	415	420
--	-----	-----

**Ser Thr**

<210> 32

<211> 359

5 <212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 32

Met Ala Glu Ala Ile Thr Tyr Ala Asp Leu Arg Phe Val Lys Ala 1	5	10	15
--	---	----	----

Pro Leu Lys Lys Ser Ile Ser Ser Arg Leu Gly Gln Asp Pro Gly 20	25	30
---	----	----

Ala Asp Asp Asp Gly Glu Ile Thr Tyr Glu Asn Val Gln Val Pro 35	40	45
---	----	----

Ala Val Leu Gly Val Pro Ser Ser Leu Ala Ser Ser Val Leu Gly 50	55	60
---	----	----

Asp Lys Ala Ala Val Lys Ser Glu Gln Pro Thr Ala Ser Trp Arg 65	70	75
---	----	----

Ala Val Thr Ser Pro Ala Val Gly Arg Ile Leu Pro Cys Arg Thr 80	85	90
---	----	----

Thr Cys Leu Arg Tyr Leu Leu Leu Gly Leu Leu Leu Thr Cys Leu 95	100	105
---	-----	-----

Leu Leu Gly Val Thr Ala Ile Cys Leu Gly Val Arg Tyr Leu Gln 110	115	120
--	-----	-----

Val Ser Gln Gln Leu Gln Gln Thr Asn Arg Val Leu Glu Val Thr 125	130	135
--	-----	-----

Asn Ser Ser Leu Arg Gln Gln Leu Arg Leu Lys Ile Thr Gln Leu 140	145	150
--	-----	-----

Gly Gln Ser Ala Glu Asp Leu Gln Gly Ser Arg Arg Glu Leu Ala 155	160	165
--	-----	-----

Gln Ser Gln Glu Ala Leu Gln Val Glu Gln Arg Ala His Gln Ala 170	175	180
--	-----	-----

Ala Glu Gly Gln Leu Gln Ala Cys Gln Ala Asp Arg Gln Lys Thr 185	190	195
--	-----	-----

Lys Glu Thr Leu Gln Ser Glu Glu Gln Gln Arg Arg Ala Leu Glu 200	205	210
--	-----	-----

Gln Lys Leu Ser Asn Met Glu Asn Arg Leu Lys Pro Phe Phe Thr  
 215 220 225  
 Cys Gly Ser Ala Asp Thr Cys Cys Pro Ser Gly Trp Ile Met His  
 230 235 240  
 Gln Lys Ser Cys Phe Tyr Ile Ser Leu Thr Ser Lys Asn Trp Gln  
 245 250 255  
 Glu Ser Gln Lys Gln Cys Glu Thr Leu Ser Ser Lys Leu Ala Thr  
 260 265 270  
 Phe Ser Glu Ile Tyr Pro Gln Ser His Ser Tyr Tyr Phe Leu Asn  
 275 280 285  
 Ser Leu Leu Pro Asn Gly Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Trp Thr Gly  
 290 295 300  
 Leu Ser Ser Asn Lys Asp Trp Lys Leu Thr Asp Asp Thr Gln Arg  
 305 310 315  
 Thr Arg Thr Tyr Ala Gln Ser Ser Lys Cys Asn Lys Val His Lys  
 320 325 330  
 Thr Trp Ser Trp Trp Thr Leu Glu Ser Glu Ser Cys Arg Ser Ser  
 335 340 345  
 Leu Pro Tyr Ile Cys Glu Met Thr Ala Phe Arg Phe Pro Asp  
 350 355

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 661

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapien

&lt;400&gt; 33

Met Ala Phe Asp Val Ser Cys Phe Phe Trp Val Val Leu Phe Ser  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Cys Lys Val Ile Thr Ser Trp Asp Gln Met Cys Ile Glu  
 20 25 30  
 Lys Glu Ala Asn Lys Thr Tyr Asn Cys Glu Asn Leu Gly Leu Ser  
 35 40 45  
 Glu Ile Pro Asp Thr Leu Pro Asn Thr Thr Glu Phe Leu Glu Phe  
 50 55 60  
 Ser Phe Asn Phe Leu Pro Thr Ile His Asn Arg Thr Phe Ser Arg  
 65 70 75  
 Leu Met Asn Leu Thr Phe Leu Asp Leu Thr Arg Cys Gln Ile Asn  
 80 85 90  
 Trp Ile His Glu Asp Thr Phe Gln Ser His His Gln Leu Ser Thr  
 95 100 105  
 Leu Val Leu Thr Gly Asn Pro Leu Ile Phe Met Ala Glu Thr Ser  
 110 115 120

## ES 2 605 443 T3

Leu Asn Gly Pro Lys Ser Leu Lys His Leu Phe Leu Ile Gln Thr  
 125 130 135  
 Gly Ile Ser Asn Leu Glu Phe Ile Pro Val His Asn Leu Glu Asn  
 140 145 150  
 Leu Glu Ser Leu Tyr Leu Gly Ser Asn His Ile Ser Ser Ile Lys  
 155 160 165  
 Phe Pro Lys Asp Phe Pro Ala Arg Asn Leu Lys Val Leu Asp Phe  
 170 175 180  
 Gln Asn Asn Ala Ile His Tyr Ile Ser Arg Glu Asp Met Arg Ser  
 185 190 195  
 Leu Glu Gln Ala Ile Asn Leu Ser Leu Asn Phe Asn Gly Asn Asn  
 200 205 210  
 Val Lys Gly Ile Glu Leu Gly Ala Phe Asp Ser Thr Val Phe Gln  
 215 220 225  
 Ser Leu Asn Phe Gly Gly Thr Pro Asn Leu Ser Val Ile Phe Asn  
 230 235 240  
 Gly Leu Gln Asn Ser Thr Thr Gln Ser Leu Trp Leu Gly Thr Phe  
 245 250 255  
 Glu Asp Ile Asp Asp Glu Asp Ile Ser Ser Ala Met Leu Lys Gly  
 260 265 270  
 Leu Cys Glu Met Ser Val Glu Ser Leu Asn Leu Gln Glu His Arg  
 275 280 285  
 Phe Ser Asp Ile Ser Ser Thr Thr Phe Gln Cys Phe Thr Gln Leu  
 290 295 300  
 Gln Glu Leu Asp Leu Thr Ala Thr His Leu Lys Gly Leu Pro Ser  
 305 310 315  
 Gly Met Lys Gly Leu Asn Leu Leu Lys Lys Leu Val Leu Ser Val  
 320 325 330  
 Asn His Phe Asp Gln Leu Cys Gln Ile Ser Ala Ala Asn Phe Pro  
 335 340 345  
 Ser Leu Thr His Leu Tyr Ile Arg Gly Asn Val Lys Lys Leu His  
 350 355 360  
 Leu Gly Val Gly Cys Leu Glu Lys Leu Gly Asn Leu Gln Thr Leu  
 365 370 375  
 Asp Leu Ser His Asn Asp Ile Glu Ala Ser Asp Cys Cys Ser Leu  
 380 385 390  
 Gln Leu Lys Asn Leu Ser His Leu Gln Thr Leu Asn Leu Ser His  
 395 400 405  
 Asn Glu Pro Leu Gly Leu Gln Ser Gln Ala Phe Lys Glu Cys Pro  
 410 415 420  
 Gln Leu Glu Leu Leu Asp Leu Ala Phe Thr Arg Leu His Ile Asn

425	430	435
Ala Pro Gln Ser Pro Phe Gln Asn Leu His Phe Leu Gln Val Leu		
440	445	450
Asn Leu Thr Tyr Cys Phe Leu Asp Thr Ser Asn Gln His Leu Leu		
455	460	465
Ala Gly Leu Pro Val Leu Arg His Leu Asn Leu Lys Gly Asn His		
470	475	480
Phe Gln Asp Gly Thr Ile Thr Lys Thr Asn Leu Leu Gln Thr Val		
485	490	495
Gly Ser Leu Glu Val Leu Ile Leu Ser Ser Cys Gly Leu Leu Ser		
500	505	510
Ile Asp Gln Gln Ala Phe His Ser Leu Gly Lys Met Ser His Val		
515	520	525
Asp Leu Ser His Asn Ser Leu Thr Cys Asp Ser Ile Asp Ser Leu		
530	535	540
Ser His Leu Lys Gly Ile Tyr Leu Asn Leu Ala Ala Asn Ser Ile		
545	550	555
Asn Ile Ile Ser Pro Arg Leu Leu Pro Ile Leu Ser Gln Gln Ser		
560	565	570
Thr Ile Asn Leu Ser His Asn Pro Leu Asp Cys Thr Cys Ser Asn		
575	580	585
Ile His Phe Leu Thr Trp Tyr Lys Glu Asn Leu His Lys Leu Glu		
590	595	600
Gly Ser Glu Glu Thr Thr Cys Ala Asn Pro Pro Ser Leu Arg Gly		
605	610	615
Val Lys Leu Ser Asp Val Lys Leu Ser Cys Gly Ile Thr Ala Ile		
620	625	630
Gly Ile Phe Phe Leu Ile Val Phe Leu Leu Leu Leu Ala Ile Leu		
635	640	645
Leu Phe Phe Ala Val Lys Tyr Leu Leu Arg Trp Lys Tyr Gln His		
650	655	660

Ile

<210> 34

<211> 429

5 <212> PRT

<213> Sarcophaga bullata

<400> 34

ES 2 605 443 T3

Met Leu Pro Arg Leu Leu Leu Ile Cys Ala Pro Leu Cys Glu  
1 5 10 15

Pro Ala Glu Leu Phe Leu Ile Ala Ser Pro Ser His Pro Thr Glu  
20 25 30

## ES 2 605 443 T3

Gly	Ser	Pro	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Lys	Met	Pro	Phe	Leu	Gln	Ser
					35				40				45	
Ser	Asp	Ala	Gln	Phe	Gln	Phe	Cys	Phe	Phe	Arg	Asp	Thr	Arg	Ala
					50				55				60	
Leu	Gly	Pro	Gly	Trp	Ser	Ser	Ser	Pro	Lys	Leu	Gln	Ile	Ala	Ala
					65				70			75		
Met	Trp	Lys	Glu	Asp	Thr	Gly	Ser	Tyr	Trp	Cys	Glu	Ala	Gln	Thr
					80				85			90		
Met	Ala	Ser	Lys	Val	Leu	Arg	Ser	Arg	Arg	Ser	Gln	Ile	Asn	Val
					95				100			105		
His	Arg	Val	Pro	Val	Ala	Asp	Val	Ser	Leu	Glu	Thr	Gln	Pro	Pro
					110				115			120		
Gly	Gly	Gln	Val	Met	Glu	Gly	Asp	Arg	Leu	Val	Leu	Ile	Cys	Ser
					125				130			135		
Val	Ala	Met	Gly	Thr	Gly	Asp	Ile	Thr	Phe	Leu	Trp	Tyr	Lys	Gly
					140				145			150		
Ala	Val	Gly	Leu	Asn	Leu	Gln	Ser	Lys	Thr	Gln	Arg	Ser	Leu	Thr
					155				160			165		
Ala	Glu	Tyr	Glu	Ile	Pro	Ser	Val	Arg	Glu	Ser	Asp	Ala	Glu	Gln
					170				175			180		
Tyr	Tyr	Cys	Val	Ala	Glu	Asn	Gly	Tyr	Gly	Pro	Ser	Pro	Ser	Gly
					185				190			195		
Leu	Val	Ser	Ile	Thr	Val	Arg	Ile	Pro	Val	Ser	Arg	Pro	Ile	Leu
					200				205			210		
Met	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ala	Gln	Ala	Ala	Val	Glu	Asp	Val	Leu
					215				220			225		
Glu	Leu	His	Cys	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Pro	Pro	Ile	Leu	Tyr
					230				235			240		
Trp	Phe	Tyr	His	Glu	Asp	Ile	Thr	Leu	Gly	Ser	Arg	Ser	Ala	Pro
					245				250			255		
Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Phe	Asn	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu	Glu	His	
					260				265			270		
Ser	Gly	Asn	Tyr	Ser	Cys	Glu	Ala	Asn	Asn	Gly	Leu	Gly	Ala	Gln
					275				280			285		
Arg	Ser	Glu	Ala	Val	Thr	Leu	Asn	Phe	Thr	Val	Pro	Thr	Gly	Ala
					290				295			300		
Arg	Ser	Asn	His	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	Ile	Glu	Gly	Leu	Leu	Ser
					305				310			315		
Thr	Leu	Gly	Pro	Ala	Thr	Val	Ala	Leu	Leu	Phe	Cys	Tyr	Gly	Leu
					320				325			330		

ES 2 605 443 T3

Lys Arg Lys Ile Gly Arg Arg Ser Ala Arg Asp Pro Leu Arg Ser  
335 340 345

Leu Pro Ser Pro Leu Pro Gln Glu Phe Thr Tyr Leu Asn Ser Pro  
350 355 360

Thr Pro Gly Gln Leu Gln Pro Ile Tyr Glu Asn Val Asn Val Val  
365 370 375

Ser Gly Asp Glu Val Tyr Ser Leu Ala Tyr Tyr Asn Gln Pro Glu  
380 385 390

Gln Glu Ser Val Ala Ala Glu Thr Leu Gly Thr His Met Glu Asp  
395 400 405

Lys Val Ser Leu Asp Ile Tyr Ser Arg Leu Arg Lys Ala Asn Ile  
410 415 420

Thr Asp Val Asp Tyr Glu Asp Ala Met  
425

5

<210> 35  
<211> 977  
<212> PRT  
<213> Homo sapien  
  
<400> 35

## ES 2 605 443 T3

Met Leu Leu Trp Val Ile Leu Leu Val Leu Ala Pro Val Ser Gly  
1 5 10 15

Gln Phe Ala Arg Thr Pro Arg Pro Ile Ile Phe Leu Gln Pro Pro  
20 25 30

Trp Thr Thr Val Phe Gln Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys  
35 40 45

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

Tyr Leu Gly Lys Glu Ile Leu Arg Glu Thr Pro Asp Asn Ile Leu  
65 70 75

Glu Val Gln Glu Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ala Gln Gly Ser  
80 85 90

Pro Leu Ser Ser Pro Val His Leu Asp Phe Ser Ser Ala Ser Leu  
95 100 105

Ile Leu Gln Ala Pro Leu Ser Val Phe Glu Gly Asp Ser Val Val  
110 115 120

Leu Arg Cys Arg Ala Lys Ala Glu Val Thr Leu Asn Asn Thr Ile  
125 130 135

Tyr Lys Asn Asp Asn Val Leu Ala Phe Leu Asn Lys Arg Thr Asp  
140 145 150

Phe His Ile Pro His Ala Cys Leu Lys Asp Asn Gly Ala Tyr Arg  
155 160 165

Cys Thr Gly Tyr Lys Glu Ser Cys Cys Pro Val Ser Ser Asn Thr

## ES 2 605 443 T3

170	175	180
Val Lys Ile Gln Val Gln Glu Pro Phe Thr Arg Pro Val Leu Arg		
185	190	195
Ala Ser Ser Phe Gln Pro Ile Ser Gly Asn Pro Val Thr Leu Thr		
200	205	210
Cys Glu Thr Gln Leu Ser Leu Glu Arg Ser Asp Val Pro Leu Arg		
215	220	225
Phe Arg Phe Phe Arg Asp Asp Gln Thr Leu Gly Leu Gly Trp Ser		
230	235	240
Leu Ser Pro Asn Phe Gln Ile Thr Ala Met Trp Ser Lys Asp Ser		
245	250	255
Gly Phe Tyr Trp Cys Lys Ala Ala Thr Met Pro His Ser Val Ile		
260	265	270
Ser Asp Ser Pro Arg Ser Trp Ile Gln Val Gln Ile Pro Ala Ser		
275	280	285
His Pro Val Leu Thr Leu Ser Pro Glu Lys Ala Leu Asn Phe Glu		
290	295	300
Gly Thr Lys Val Thr Leu His Cys Glu Thr Gln Glu Asp Ser Leu		
305	310	315
Arg Thr Leu Tyr Arg Phe Tyr His Glu Gly Val Pro Leu Arg His		
320	325	330
Lys Ser Val Arg Cys Glu Arg Gly Ala Ser Ile Ser Phe Ser Leu		
335	340	345
Thr Thr Glu Asn Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp Asn Gly		
350	355	360
Leu Gly Ala Lys Pro Ser Lys Ala Val Ser Leu Ser Val Thr Val		
365	370	375
Pro Val Ser His Pro Val Leu Asn Leu Ser Ser Pro Glu Asp Leu		
380	385	390
Ile Phe Glu Gly Ala Lys Val Thr Leu His Cys Glu Ala Gln Arg		
395	400	405
Gly Ser Leu Pro Ile Leu Tyr Gln Phe His His Glu Asp Ala Ala		
410	415	420
Leu Glu Arg Arg Ser Ala Asn Ser Ala Gly Gly Val Ala Ile Ser		
425	430	435
Phe Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys Thr Ala		
440	445	450
Asp Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Lys Ala Val Ser Leu Ser		
455	460	465
Ile Thr Val Pro Val Ser His Pro Val Leu Thr Leu Ser Ser Ala		
470	475	480

## ES 2 605 443 T3

Glu Ala Leu Thr Phe Glu Gly Ala Thr Val Thr Leu His Cys Glu  
                   485                  490                  495  
 Val Gln Arg Gly Ser Pro Gln Ile Leu Tyr Gln Phe Tyr His Glu  
                   500                  505                  510  
 Asp Met Pro Leu Trp Ser Ser Ser Thr Pro Ser Val Gly Arg Val  
                   515                  520                  525  
 Ser Phe Ser Phe Ser Leu Thr Glu Gly His Ser Gly Asn Tyr Tyr  
                   530                  535                  540  
 Cys Thr Ala Asp Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Glu Val Val  
                   545                  550                  555  
 Ser Leu Phe Val Thr Val Pro Val Ser Arg Pro Ile Leu Thr Leu  
                   560                  565                  570  
 Arg Val Pro Arg Ala Gln Ala Val Val Gly Asp Leu Leu Glu Leu  
                   575                  580                  585  
 His Cys Glu Ala Pro Arg Gly Ser Pro Pro Ile Leu Tyr Trp Phe  
                   590                  595                  600  
 Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Ser Ser Ser Ala Pro Ser Gly  
                   605                  610                  615  
 Gly Glu Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly  
                   620                  625                  630  
 Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asn Asn Gly Leu Val Ala Gln His Ser  
                   635                  640                  645  
 Asp Thr Ile Ser Leu Ser Val Ile Val Pro Val Ser Arg Pro Ile  
                   650                  655                  660  
 Leu Thr Phe Arg Ala Pro Arg Ala Gln Ala Val Val Gly Asp Leu  
                   665                  670                  675  
 Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Ser Pro Ile Leu  
                   680                  685                  690  
 Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Lys Ile Ser Ala  
                   695                  700                  705  
 Pro Ser Gly Gly Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Thr Glu  
                   710                  715                  720  
 His Ser Gly Ile Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Pro Glu Ala  
                   725                  730                  735  
 Gln Arg Ser Glu Met Val Thr Leu Lys Val Ala Val Pro Val Ser  
                   740                  745                  750  
 Arg Pro Val Leu Thr Leu Arg Ala Pro Gly Thr His Ala Ala Val  
                   755                  760                  765  
 Gly Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro  
                   770                  775                  780

Leu	Ile	Leu	Tyr	Arg	Phe	Phe	His	Glu	Asp	Val	Thr	Leu	Gly	Asn
				785				790					795	
Arg	Ser	Ser	Pro	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Leu	Asn	Leu	Ser	Leu	Thr
				800				805					810	
Ala	Glu	His	Ser	Gly	Asn	Tyr	Ser	Cys	Glu	Ala	Asp	Asn	Gly	Leu
					815			820					825	
Gly	Ala	Gln	Arg	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	Gly	Leu
				830				835					840	
Thr	Ala	Asn	Arg	Ser	Gly	Pro	Phe	Ala	Thr	Gly	Val	Ala	Gly	Gly
					845				850				855	
Leu	Leu	Ser	Ile	Ala	Gly	Leu	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Tyr
					860				865				870	
Cys	Trp	Leu	Ser	Arg	Lys	Ala	Gly	Arg	Lys	Pro	Ala	Ser	Asp	Pro
				875				880					885	
Ala	Arg	Ser	Pro	Pro	Asp	Ser	Asp	Ser	Gln	Glu	Pro	Thr	Tyr	His
					890				895				900	
Asn	Val	Pro	Ala	Trp	Glu	Glu	Leu	Gln	Pro	Val	Tyr	Thr	Asn	Ala
					905			910					915	
Asn	Pro	Arg	Gly	Glu	Asn	Val	Val	Tyr	Ser	Glu	Val	Arg	Ile	Ile
					920			925					930	
Gln	Glu	Lys	Lys	Lys	His	Ala	Val	Ala	Ser	Asp	Pro	Arg	His	Leu
					935			940					945	
Arg	Asn	Lys	Gly	Ser	Pro	Ile	Ile	Tyr	Ser	Glu	Val	Lys	Val	Ala
					950				955				960	
Ser	Thr	Pro	Val	Ser	Gly	Ser	Leu	Phe	Leu	Ala	Ser	Ser	Ala	Pro
					965				970				975	
His Arg														

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo unido covalentemente a uno o más restos de fármaco, teniendo el compuesto la Fórmula Ic:

5



Ic

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

10

Ab es un anticuerpo que se une a HER2;

A es una unidad Bastidor,

a es 0 o 1,

cada W es independientemente una unidad de aminoácido,

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

15

Y es una unidad Espaciadora, e

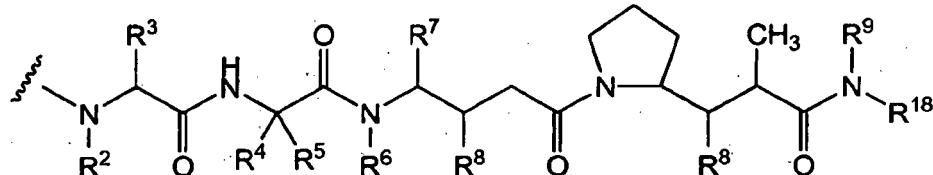
y es 0, 1 o 2,

en la que

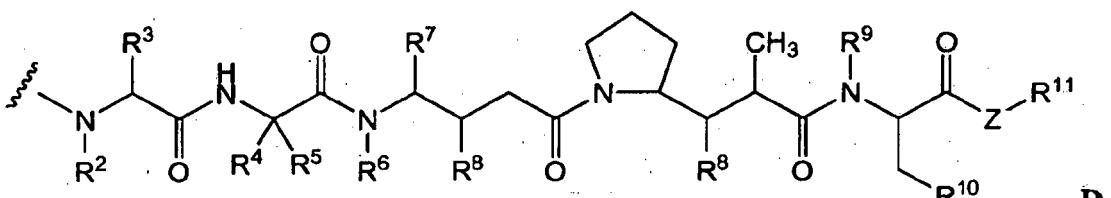
p varía de 1 a 20, y

D es un resto de fármaco seleccionado entre las Fórmulas D<sub>E</sub> y D<sub>F</sub>:

20

**D<sub>E</sub>**

y

**D<sub>F</sub>**

25

en las que la línea ondulada de D<sub>E</sub> y D<sub>F</sub> indica el sitio de unión covalente a A, W o Y, e independientemente en cada ubicación:

30

R<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>,

R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>4</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>5</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y metilo;

35

o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> conjuntamente forman un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>- en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre el grupo que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6;

R<sup>6</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

40

R<sup>7</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>9</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

45

R<sup>10</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en arilo y heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>;

Z es O, S, NH o NR<sup>12</sup>, en el que R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

50

R<sup>11</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, arilo, heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup> y -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>;

m es un número entero que varía entre 1-1000;

R<sup>13</sup> es alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>14</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

cada aparición de R<sup>15</sup> es independientemente H, COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

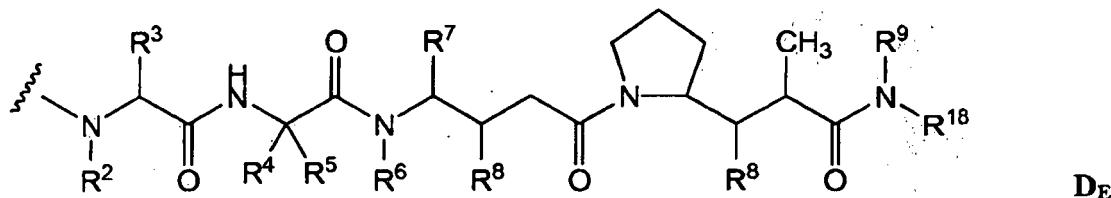
cada aparición de R<sup>16</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH;

R<sup>18</sup> se selecciona entre -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-arilo, -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); y -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-(carbociclo

$C_3-C_8$ ); y  
n es un número entero que varía de 0 a 6.

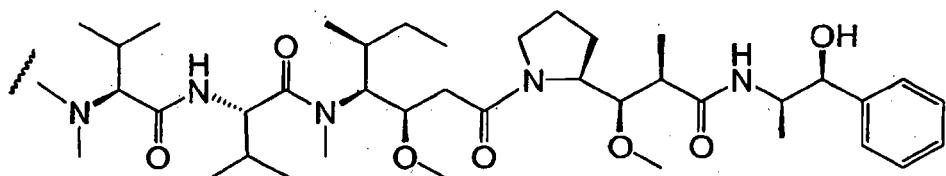
2. El compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 en el que D es la Fórmula D<sub>E</sub>:

5



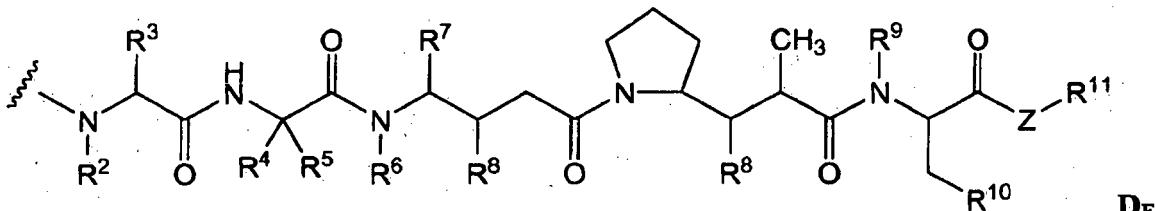
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 3. El compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 2 en el que la Fórmula D<sub>E</sub> tiene la fórmula:



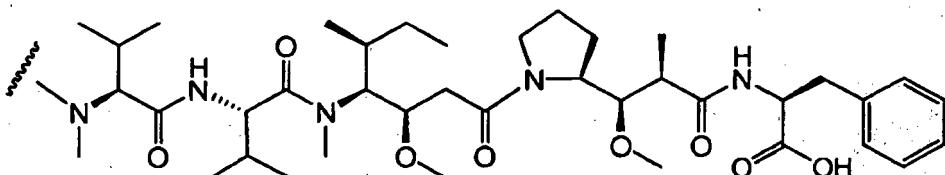
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 4. El compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en el que D es la Fórmula D<sub>F</sub>:



20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. El compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 4 en el que la Fórmula D<sub>F</sub> tiene la fórmula:



25

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. El compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el anticuerpo está unido al resto de fármaco a través de un resto de cisteína del anticuerpo.

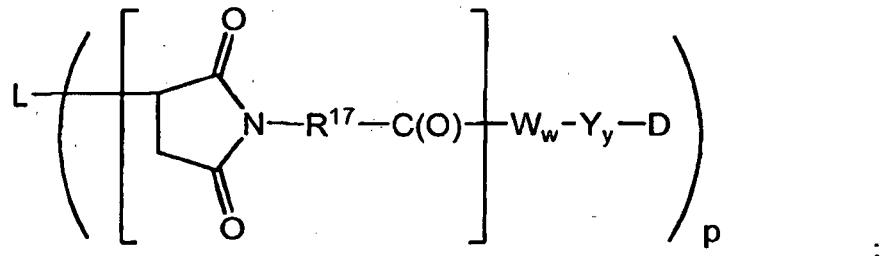
30

7. El compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que p es de 1 a 4.

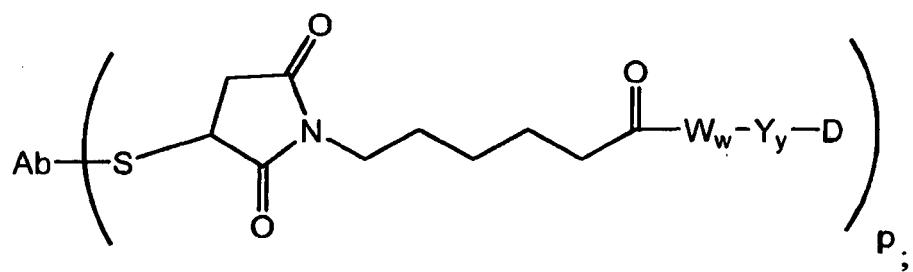
35

8. El compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 en donde el compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco se selecciona entre el grupo que consiste en:

a)

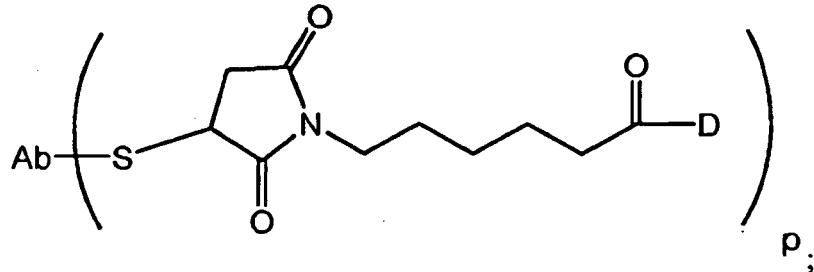


en la que L es un anticuerpo y R<sup>17</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-, -arileno-, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-arileno-, - arilen-alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> -, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub> y -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>;- y r es un número entero que varía de 1 a 10;



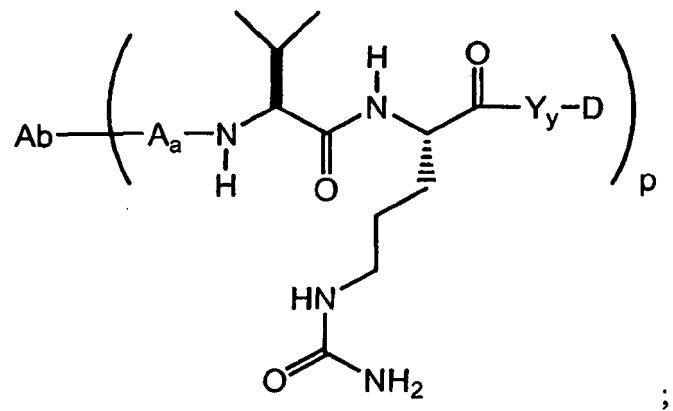
10

c)



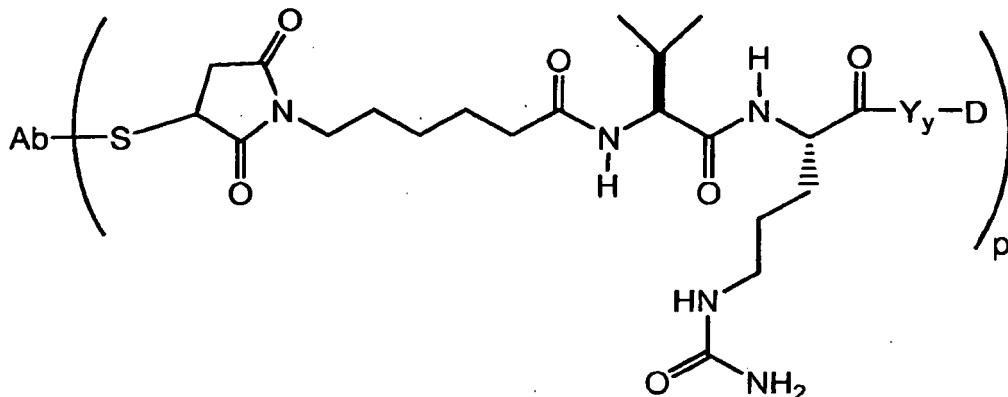
15

d)



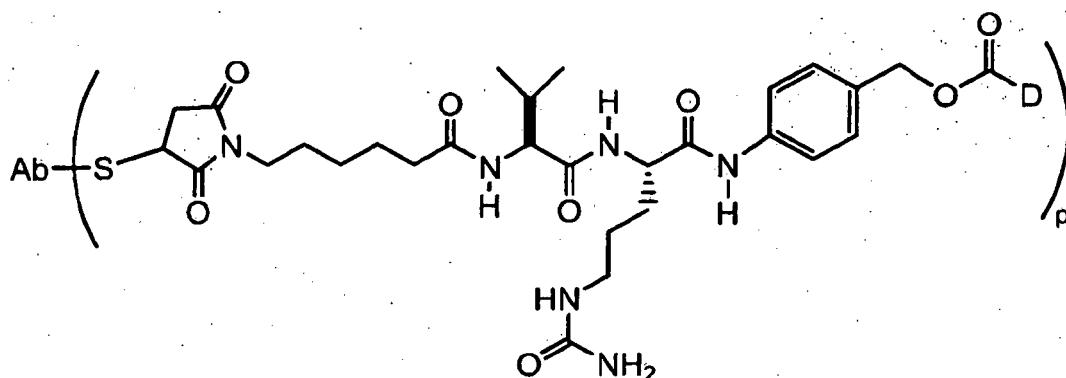
20

e)



5

y



10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

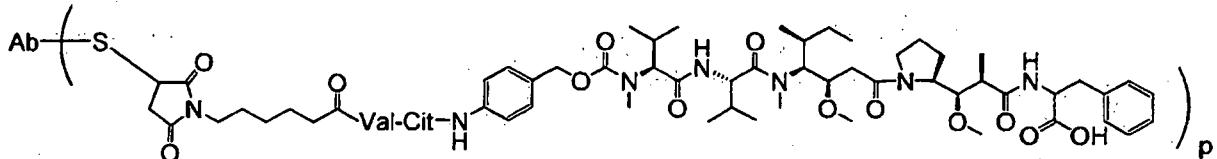
9. El compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que W<sub>w</sub> es -valina-citrulina-.

15 10. El compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que se une específicamente al dominio extracelular de un receptor HER2 e inhibe el crecimiento de células tumorales que sobreexpresan el receptor HER2.

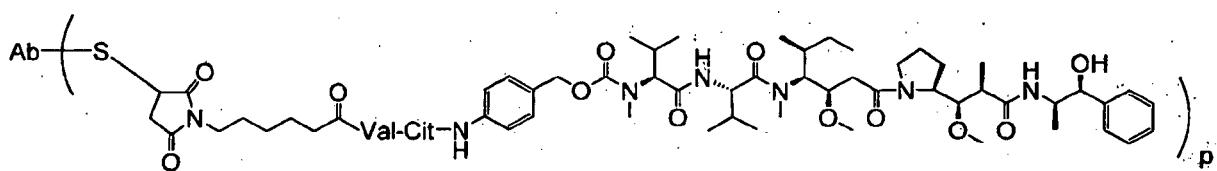
20 11. El compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el anticuerpo se selecciona entre un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo químérico, un anticuerpo humanizado y un fragmento de anticuerpo.

25 12. El compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 11 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el anticuerpo es huMAb4D5-8 (trastuzumab).

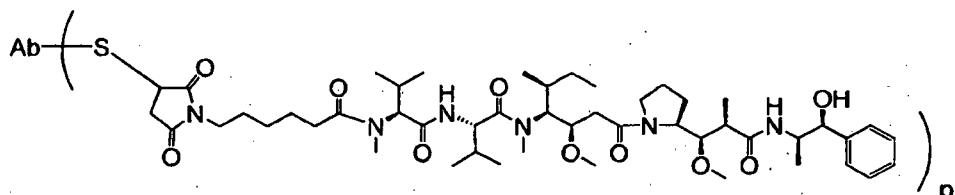
13. El compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 seleccionado entre las fórmulas:



Ab-MC-vc-PAB-MMAF

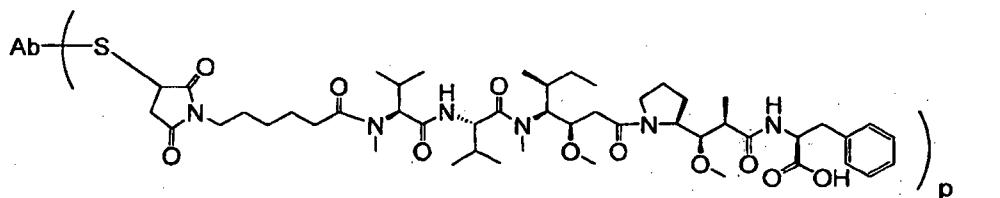


Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE

5 y



Ab-MC-MMAF

10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que Val es valina y Cit es citrulina.

14. El compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 13 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el anticuerpo es huMAb4D5-8 (trastuzumab).

15. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

20 16. Un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en el tratamiento de un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de estómago, cáncer de endometrio, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de vejiga.

25 17. Un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en combinación con una cantidad eficaz de un agente adicional seleccionado entre el grupo que consiste en un agente anticáncer, un agente inmunosupresor y un agente antiinfeccioso para su uso en el tratamiento de un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de estómago, cáncer de endometrio, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de vejiga.

30 18. Uso de un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de estómago, cáncer de endometrio, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer de páncreas, cáncer de próstata o cáncer de vejiga.

35 19. Uso de un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en la fabricación de un medicamento para su uso en combinación con una cantidad eficaz de un agente adicional seleccionado entre el grupo que consiste en un agente anticáncer, un agente inmunosupresor y un agente antiinfeccioso para el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de estómago, cáncer de endometrio, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer de páncreas, cáncer de próstata o cáncer de vejiga.

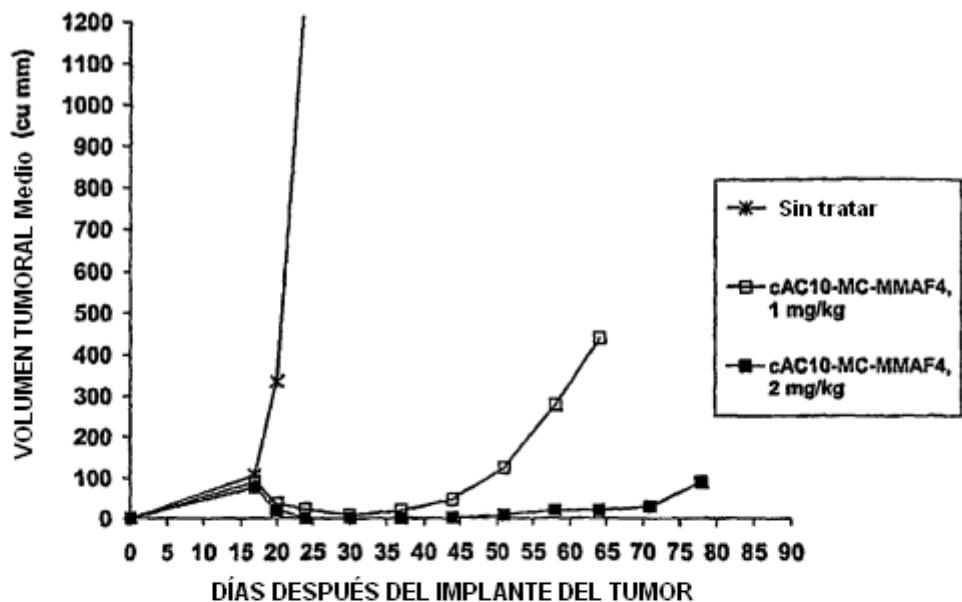


FIGURA 1

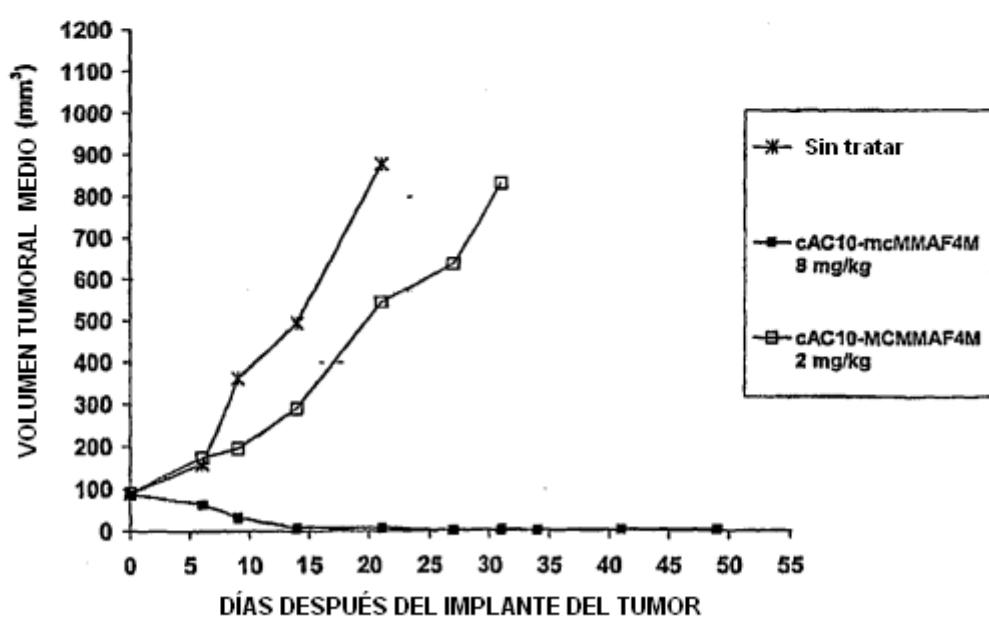


FIGURA 2

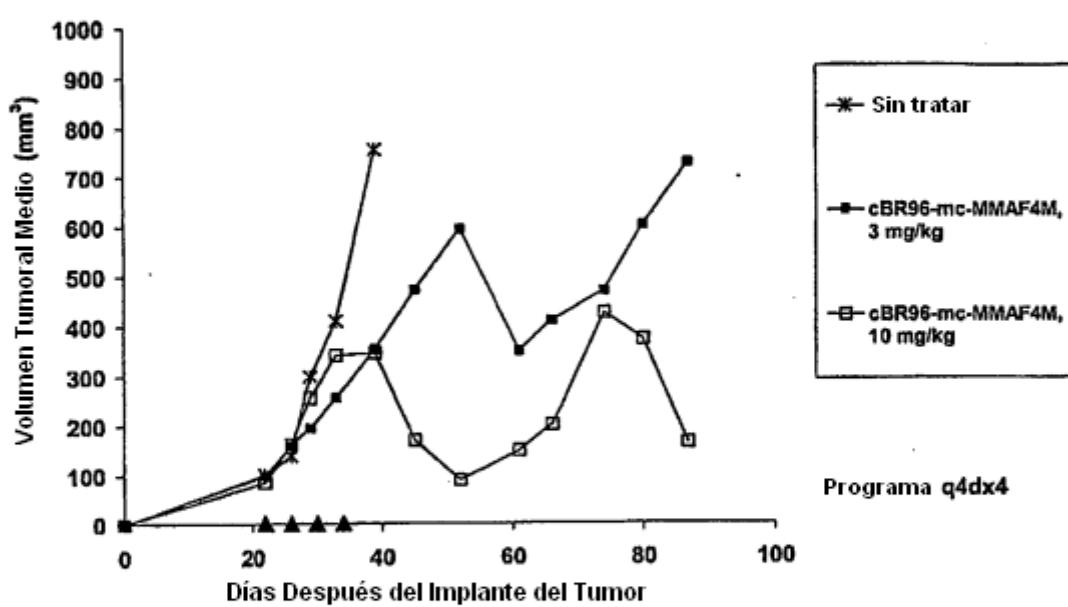
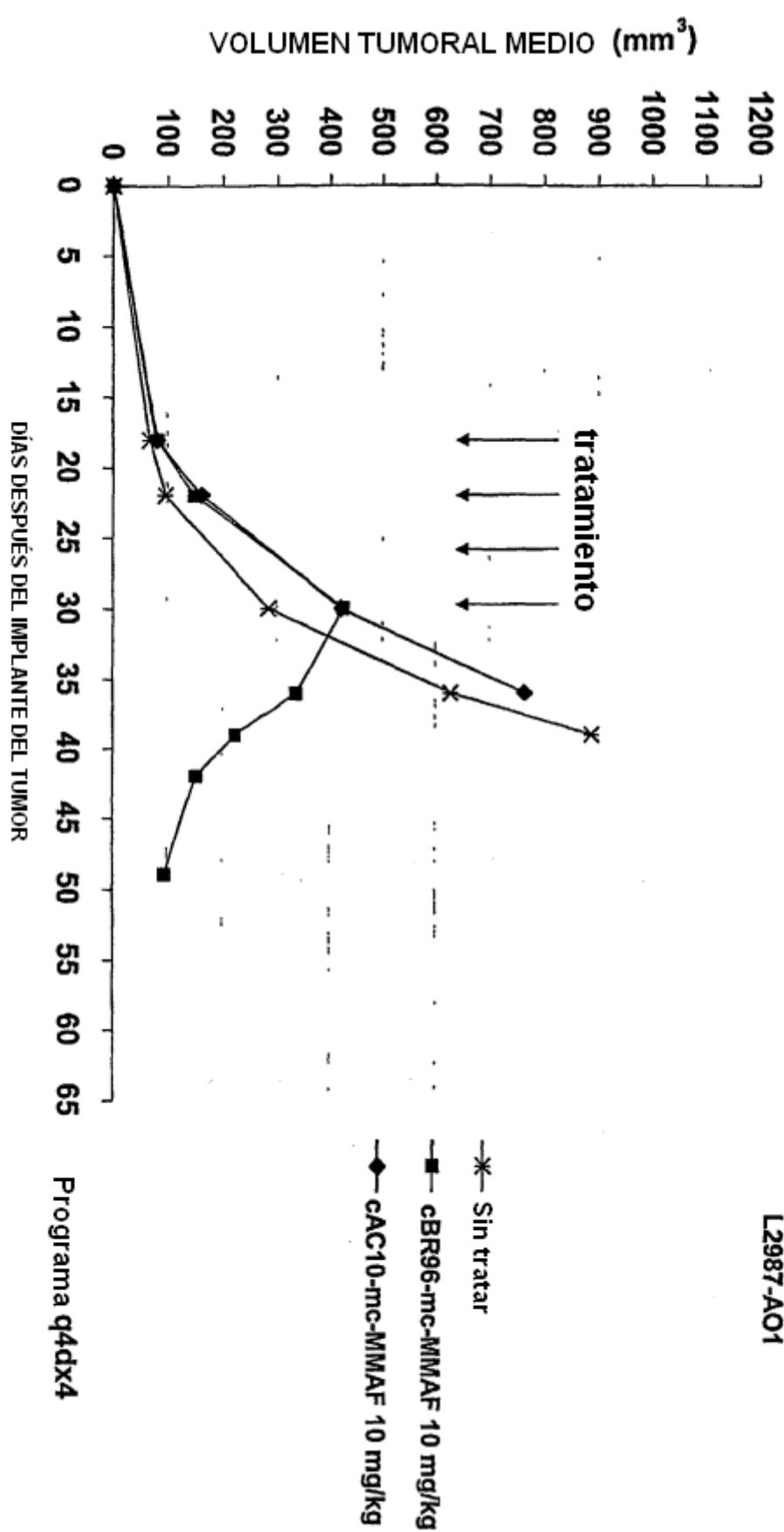


FIGURA 3a

**Eficacia de mAb-mc-MMAF en Carcinoma de Pulmón L2987**

L2987-A01



**Figura 3b**

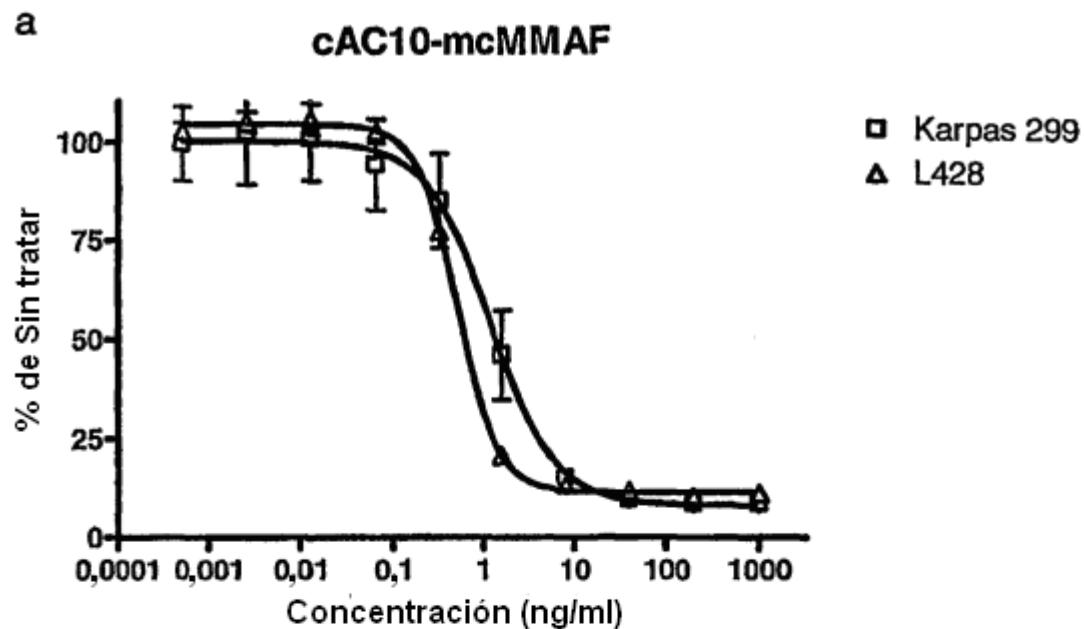


FIGURA 4a

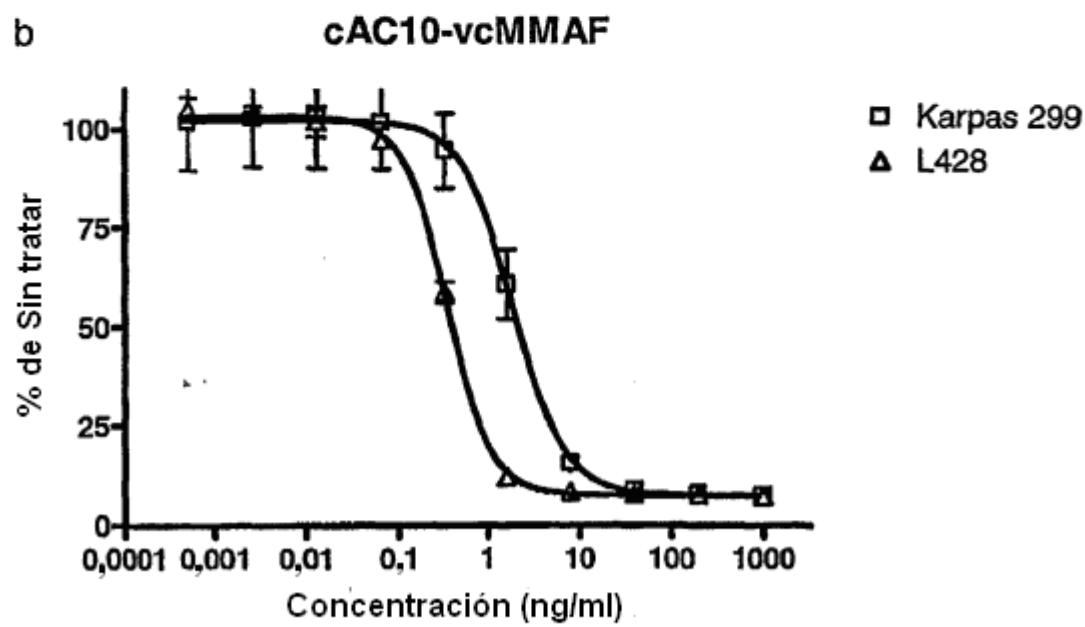


FIGURA 4b

a      **Actividad de cBR96-mcMMAF**

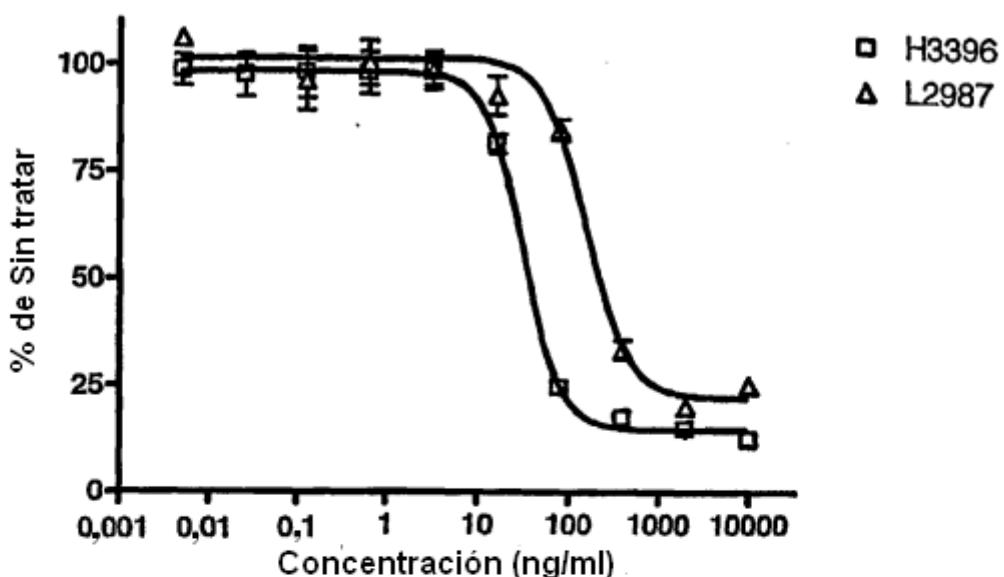


FIGURA 5a

b      **Actividad de cBR96-vcMMAF**

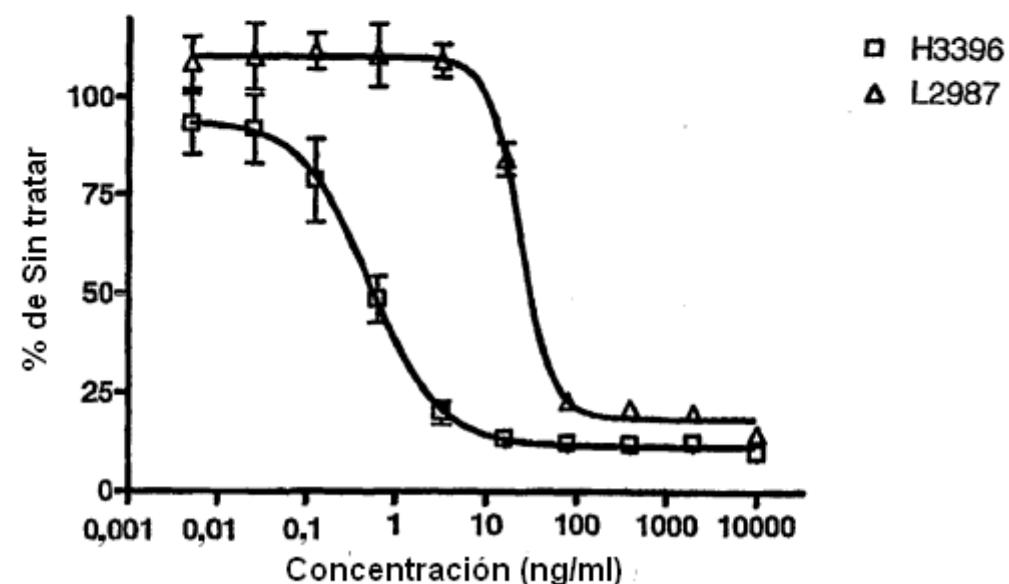


FIGURA 5b

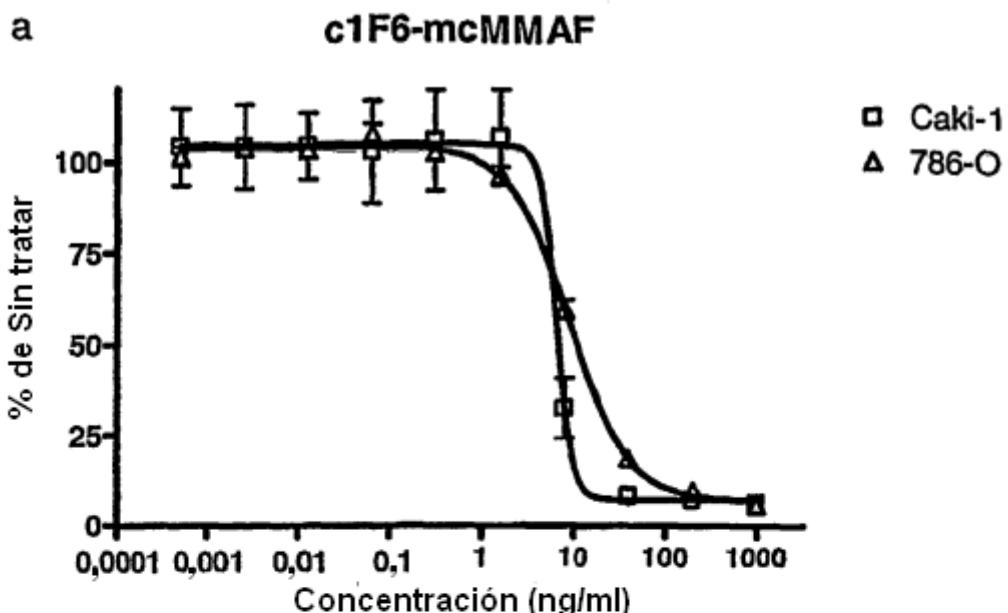


FIGURA 6a

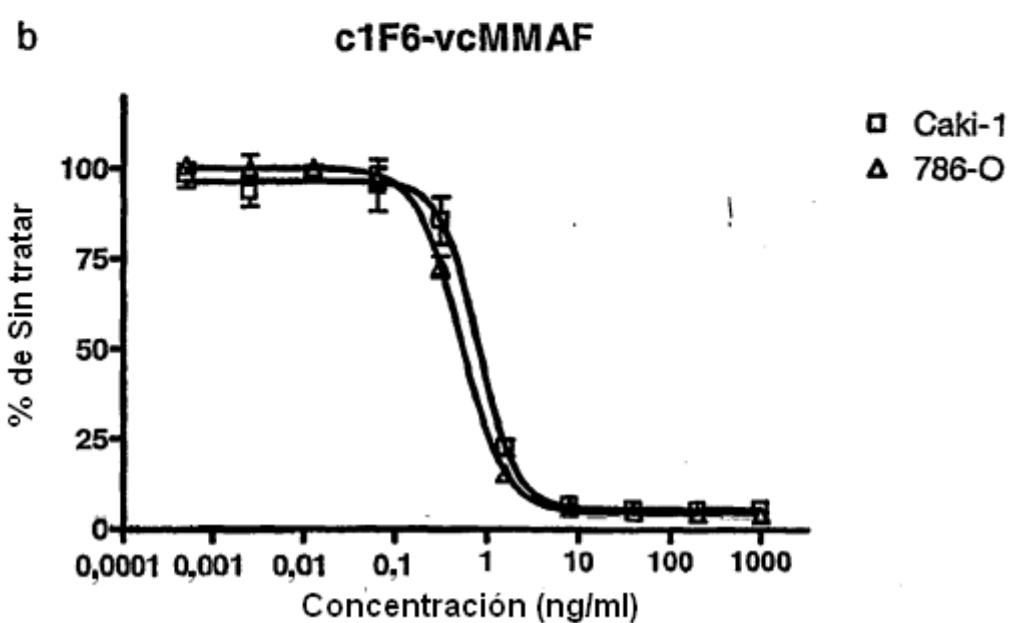
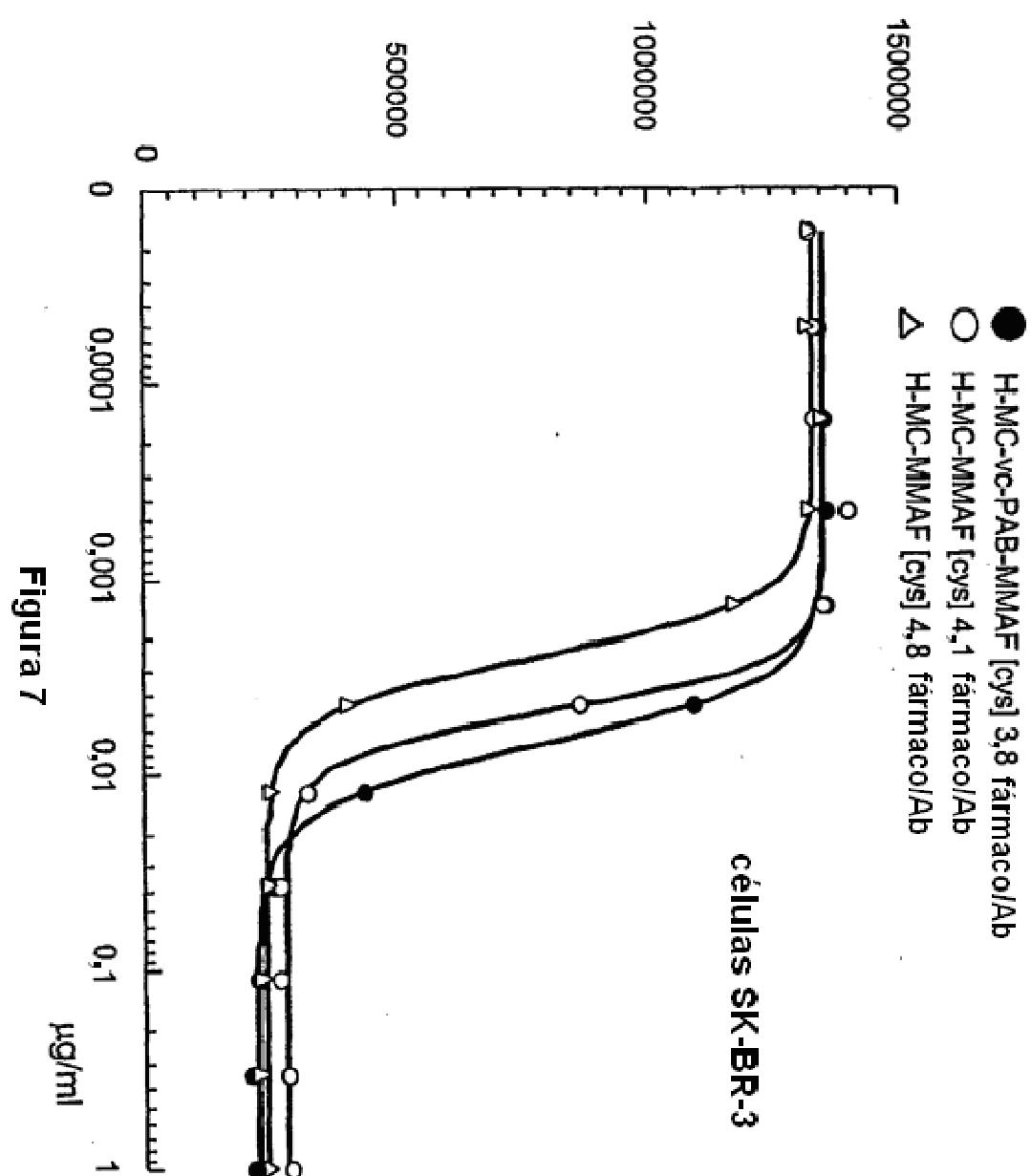
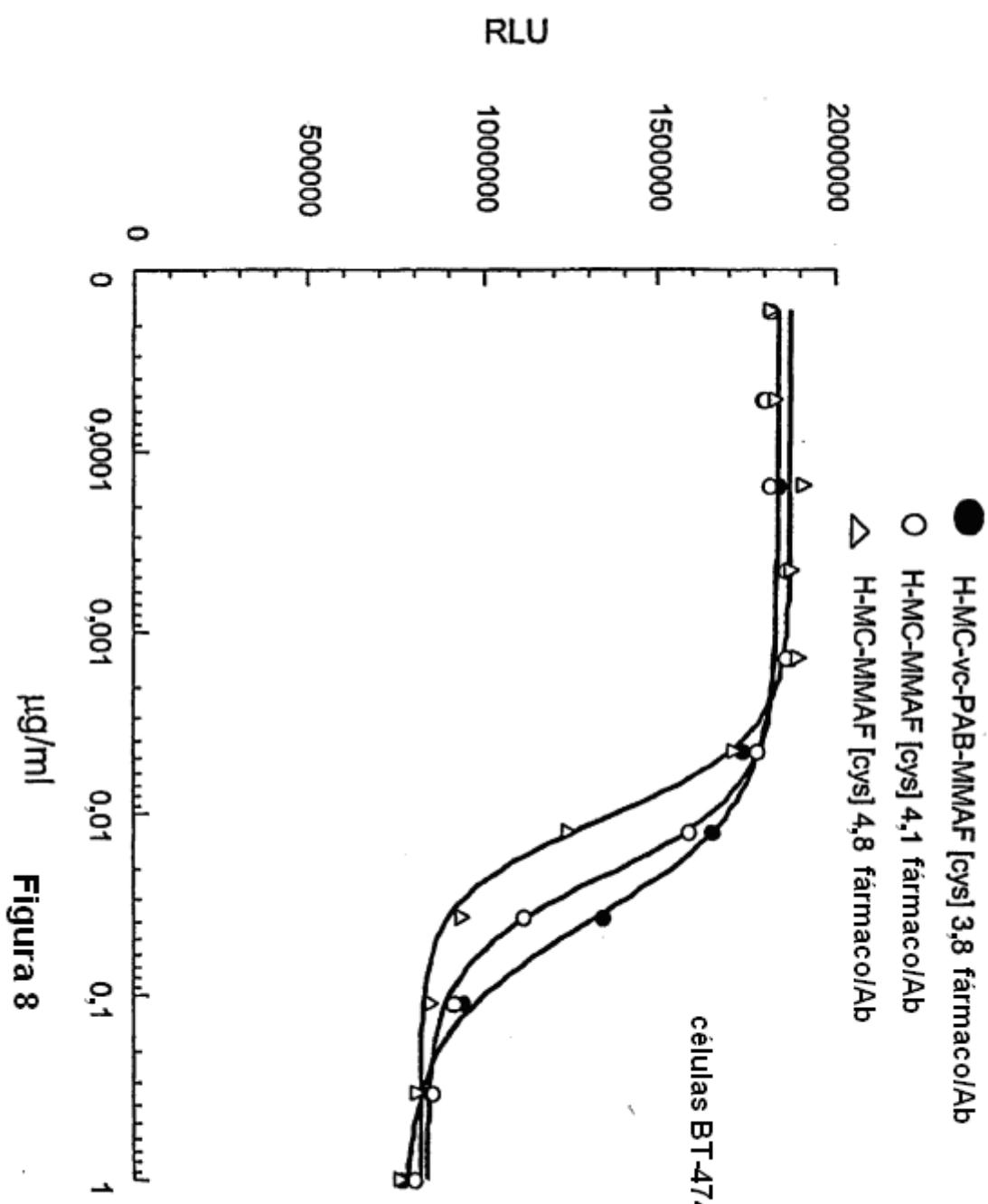


FIGURA 6b

## Unidades Relativas de Luminiscencia (RLU)

**Figura 7**



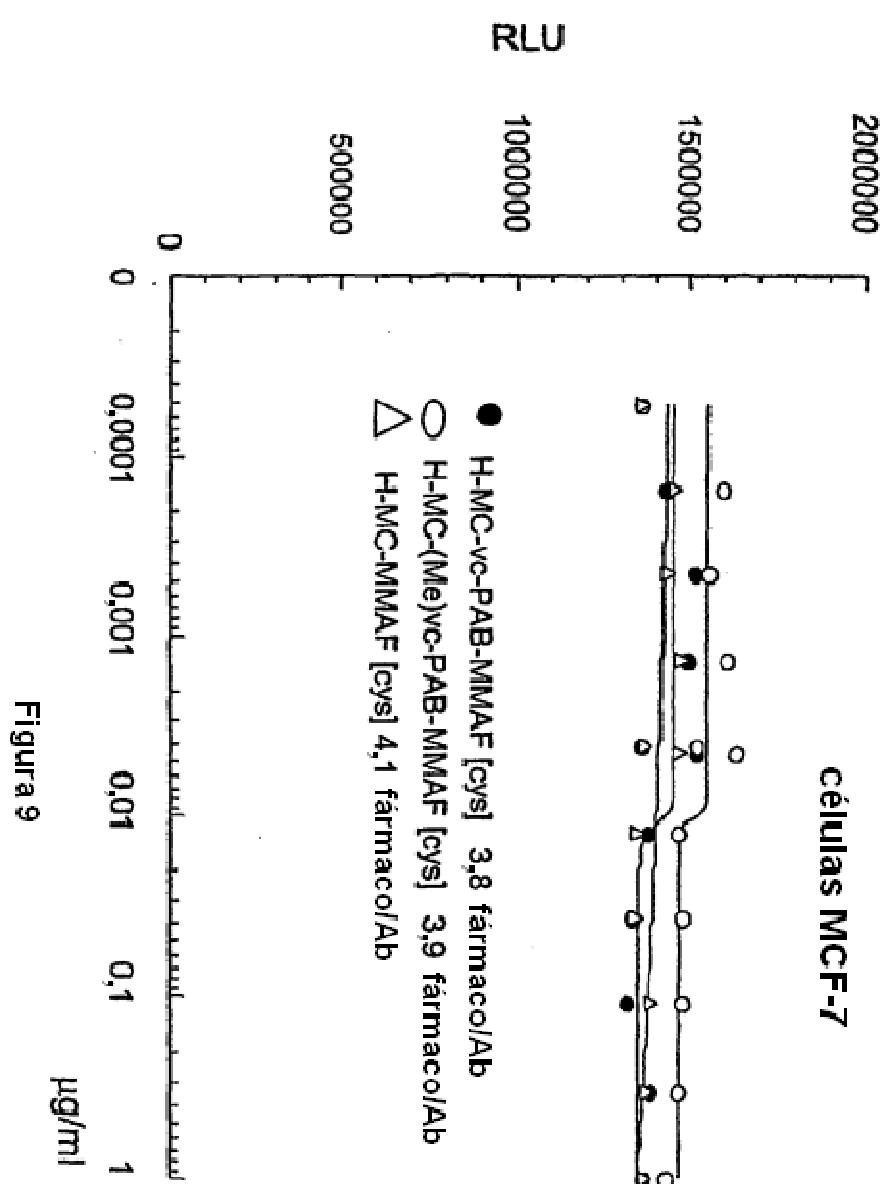
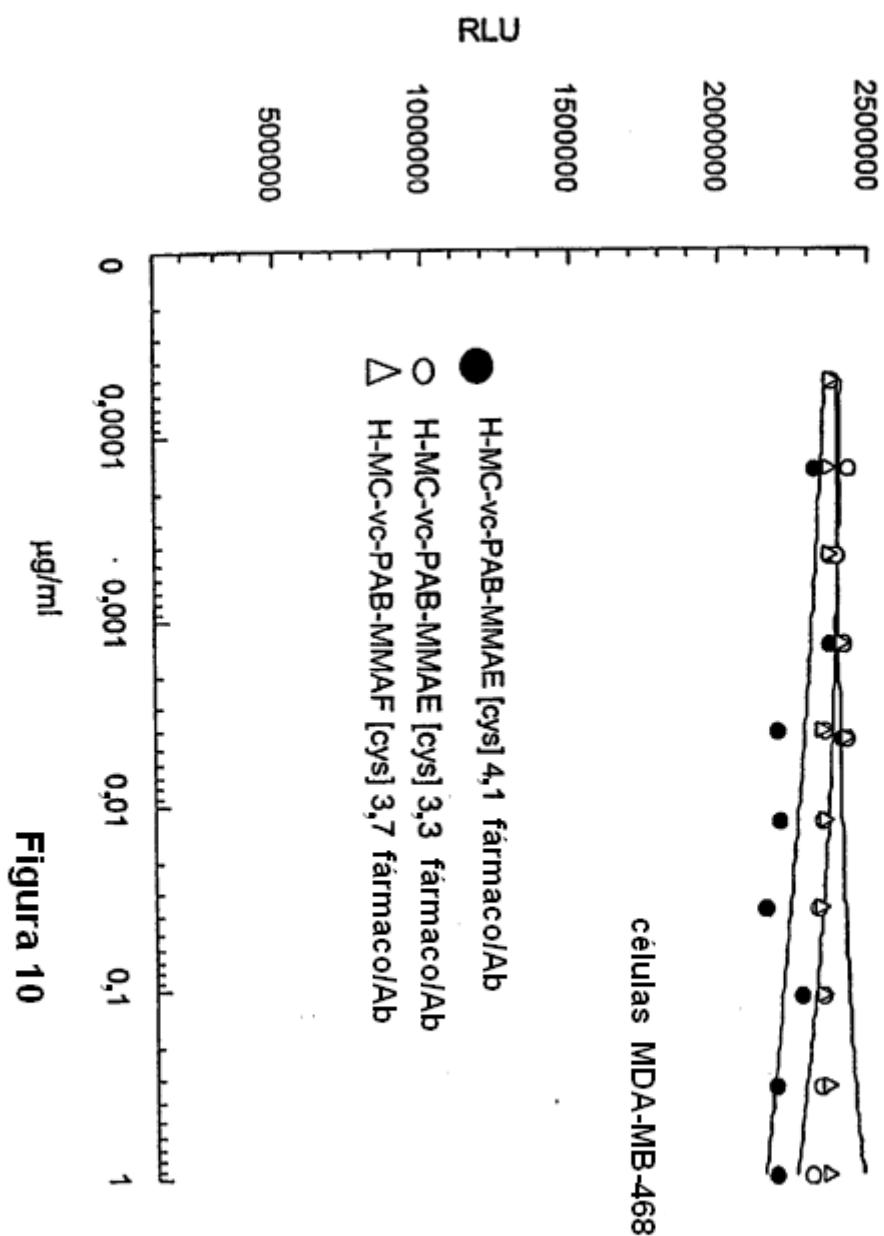
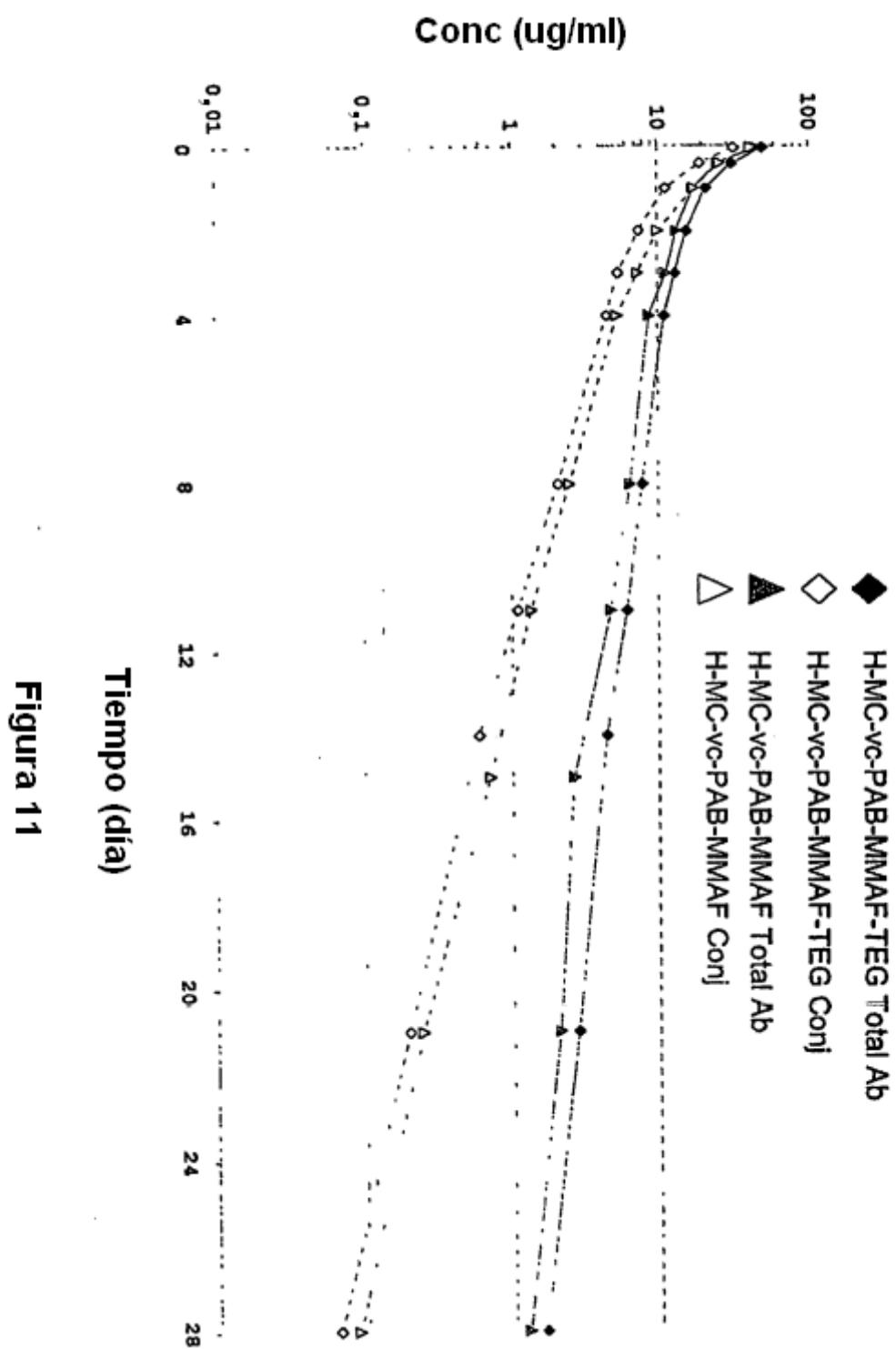
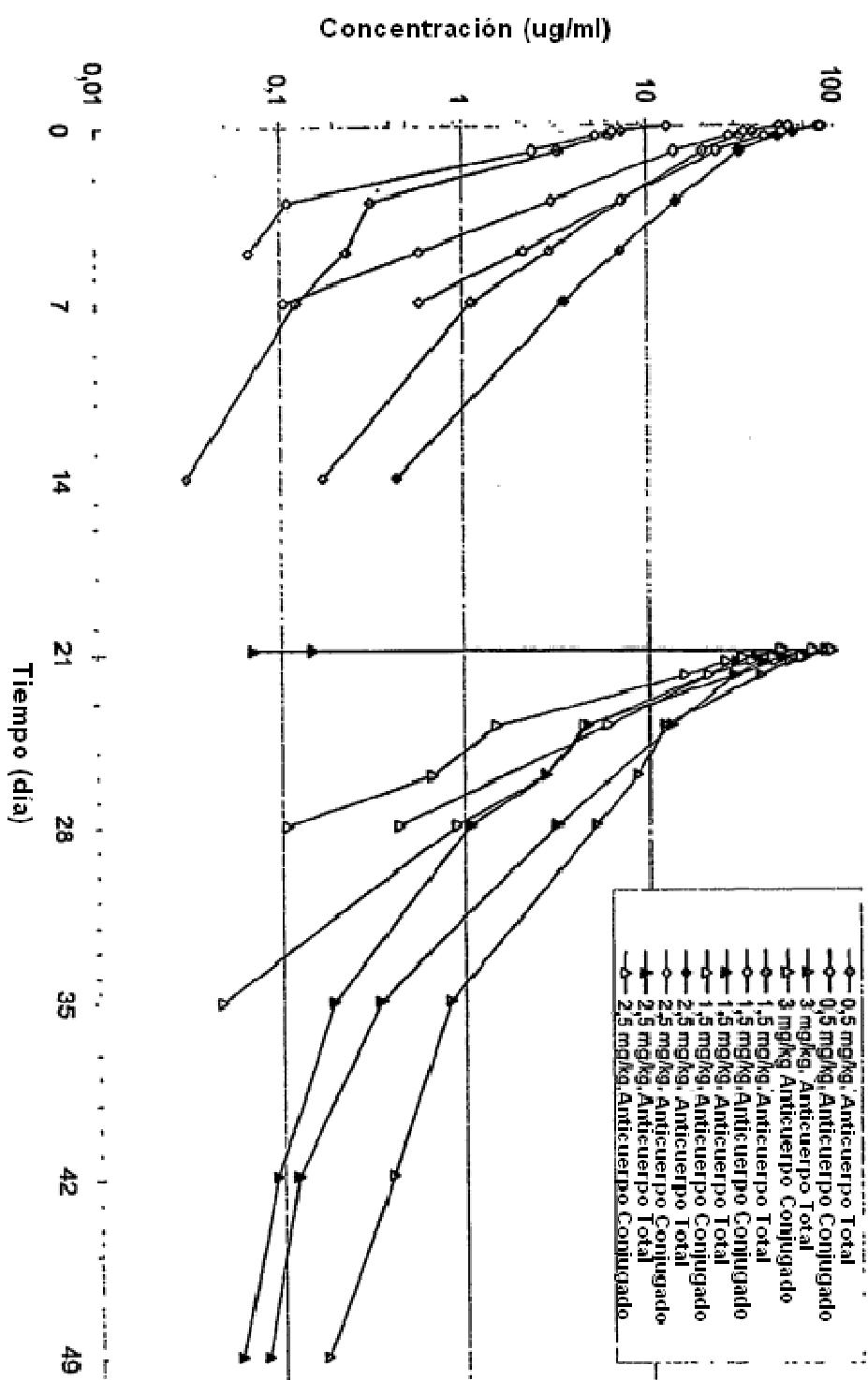


Figura 9

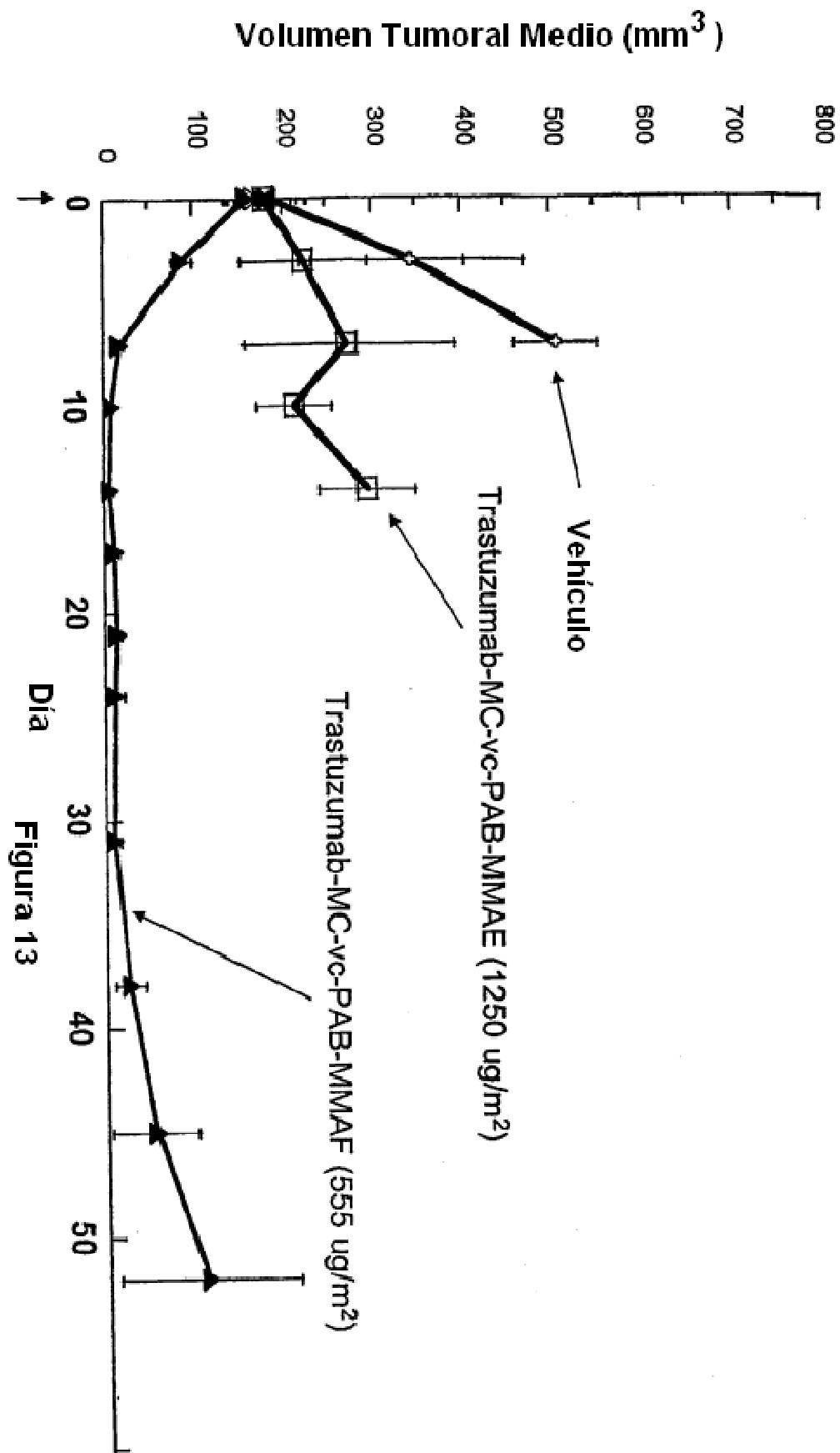
**Figura 10**

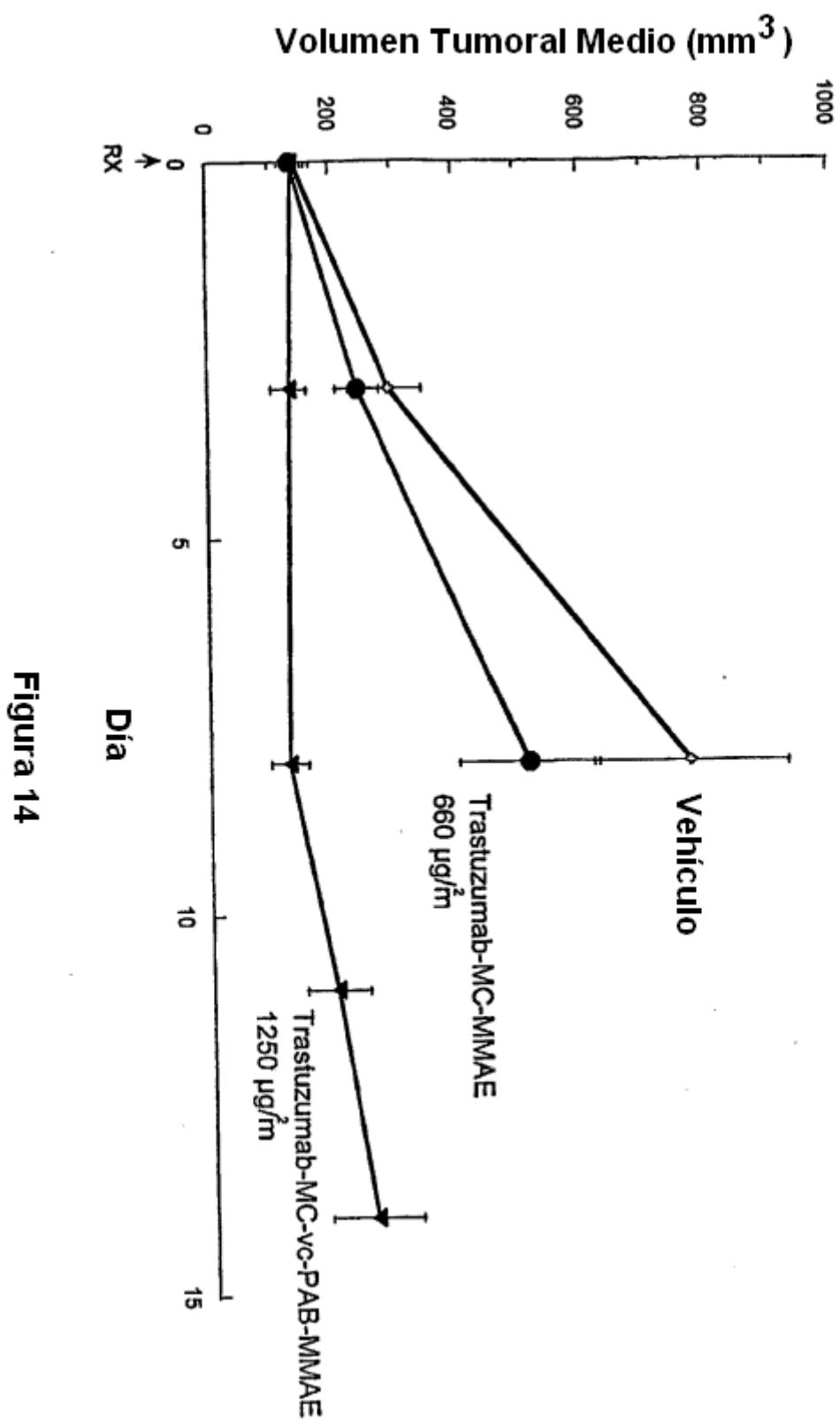
**Figura 11**

**H-MC-vc-PAB-MMAE en monos Cynomolgus**

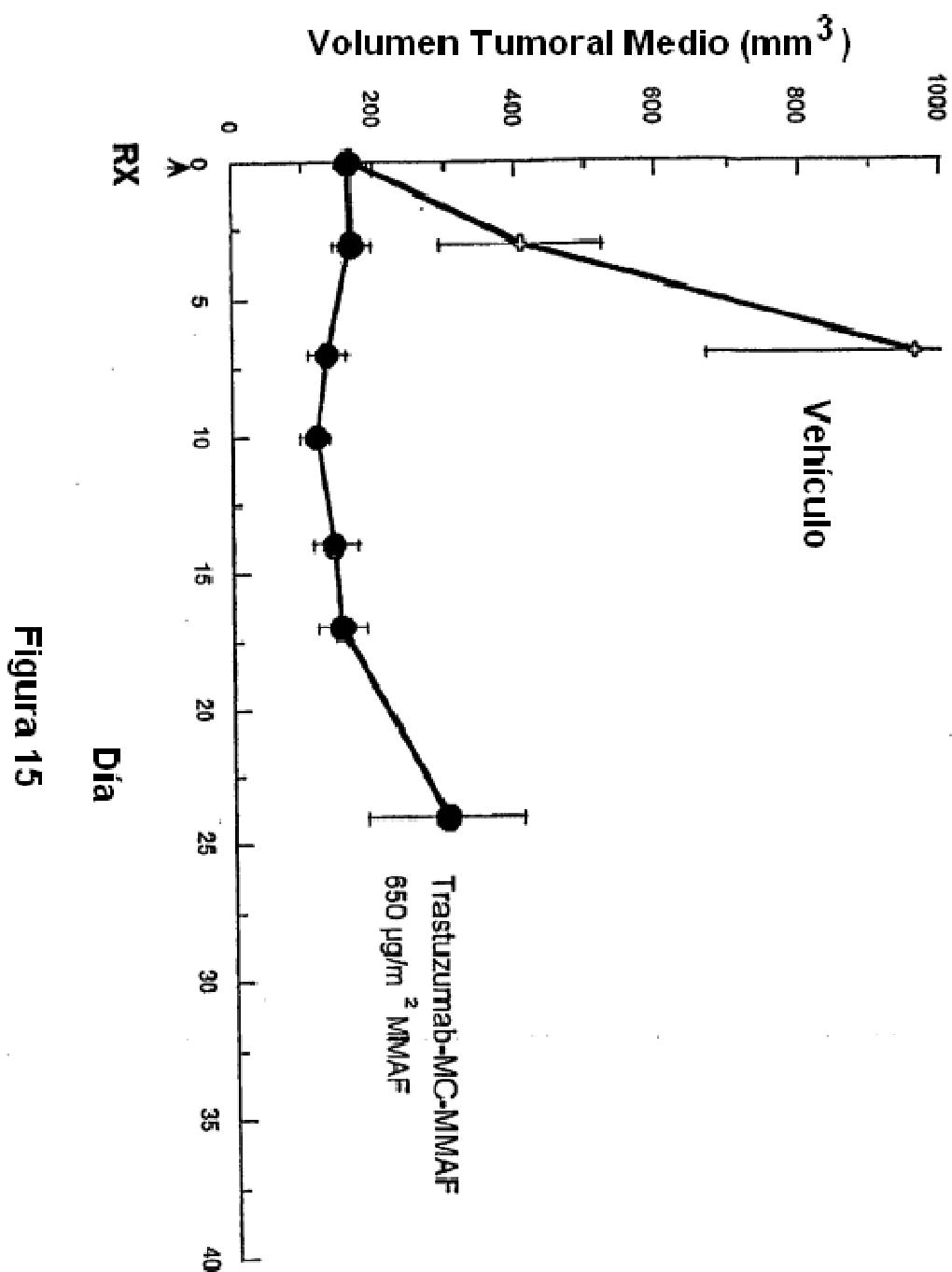


**Figura 12**

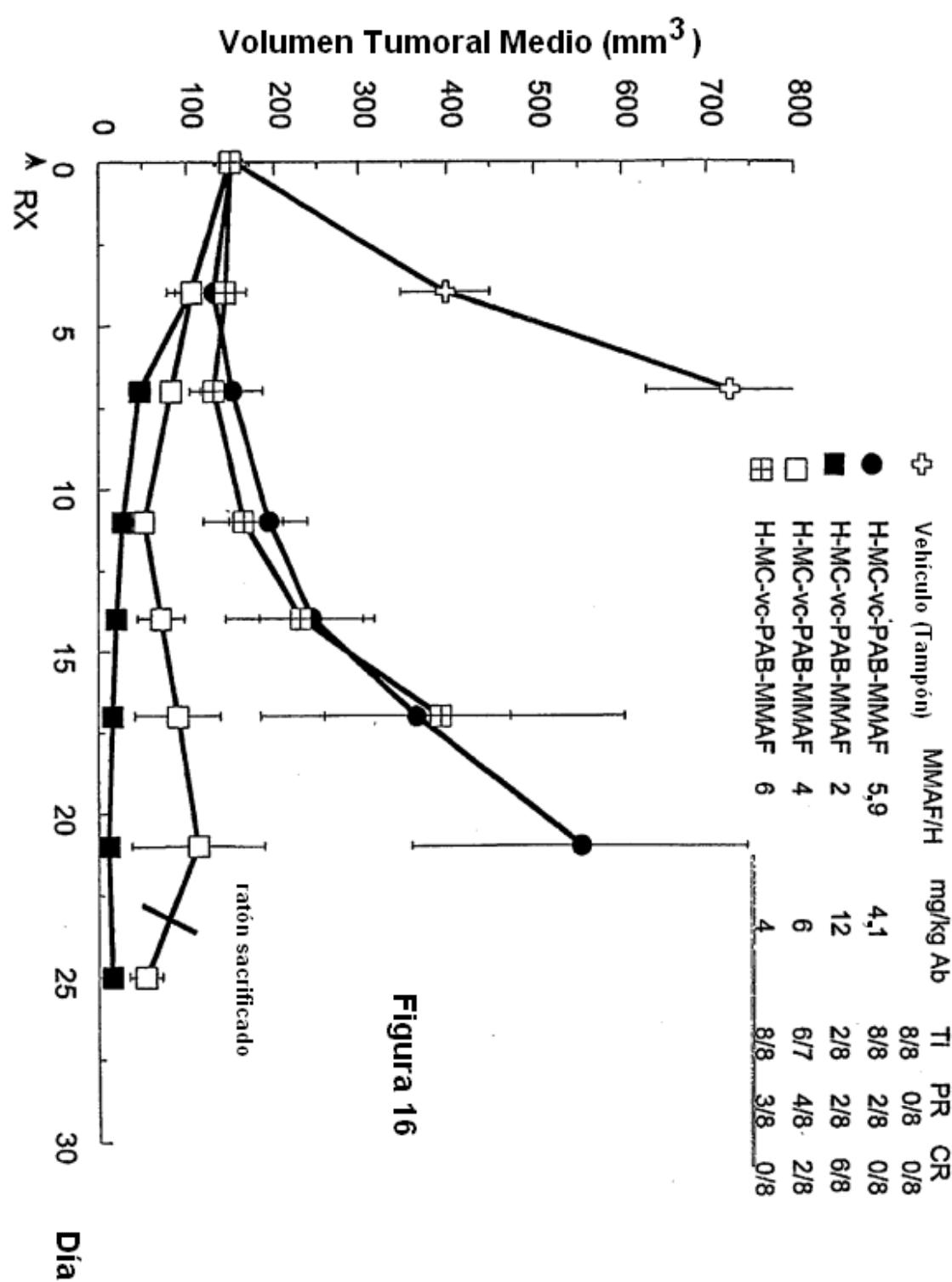




**Figura 14**



**Figura 15**



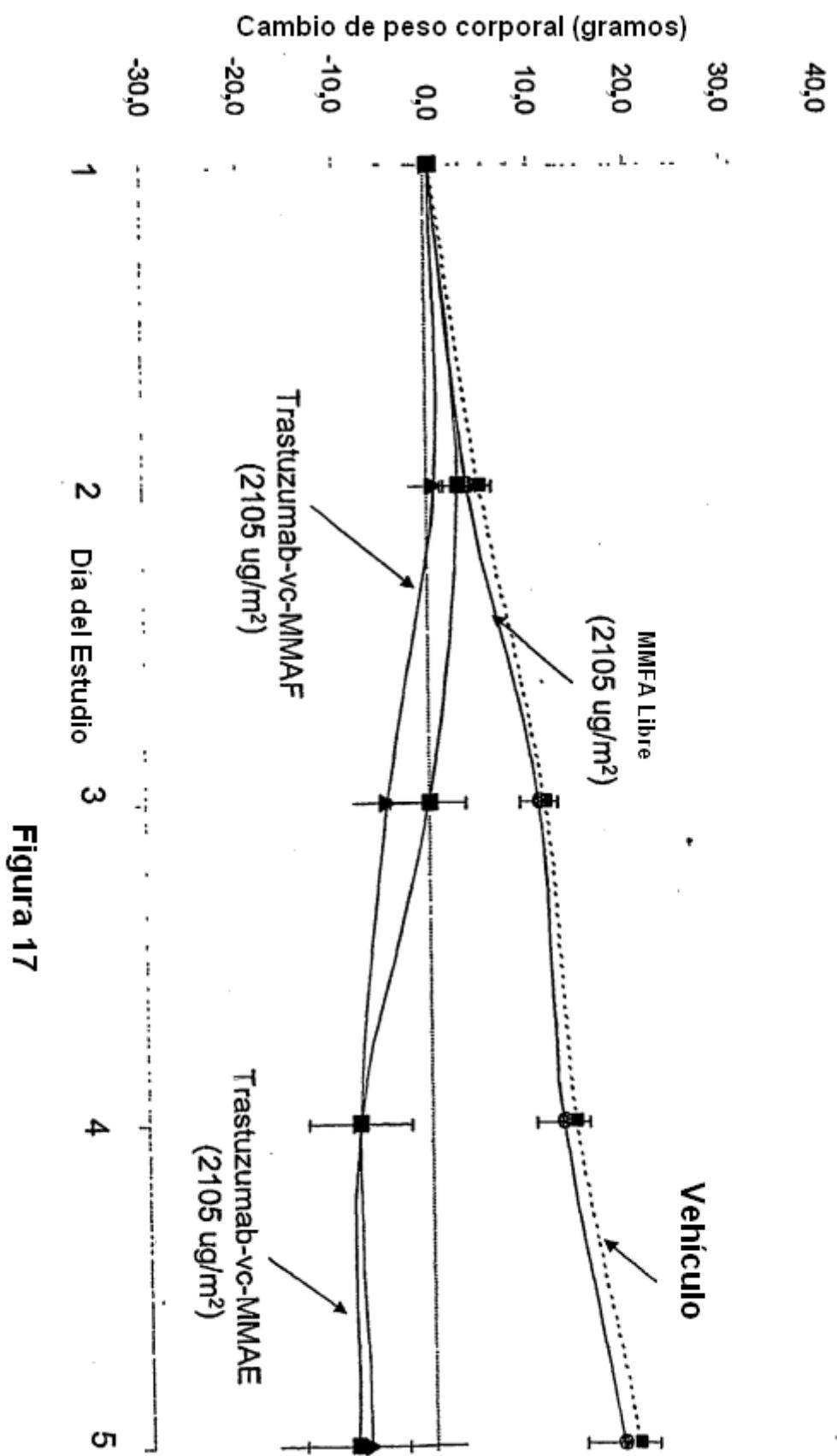
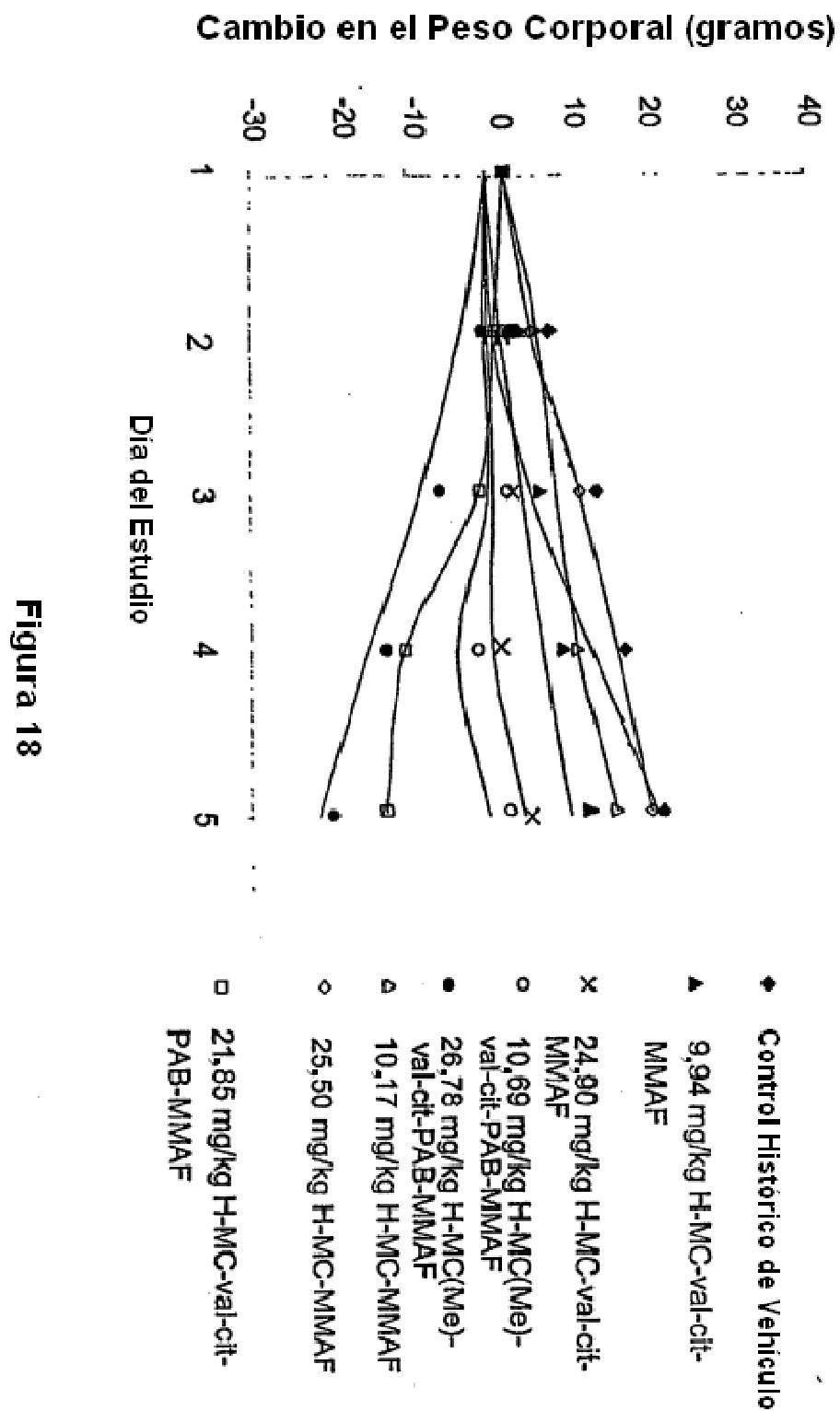
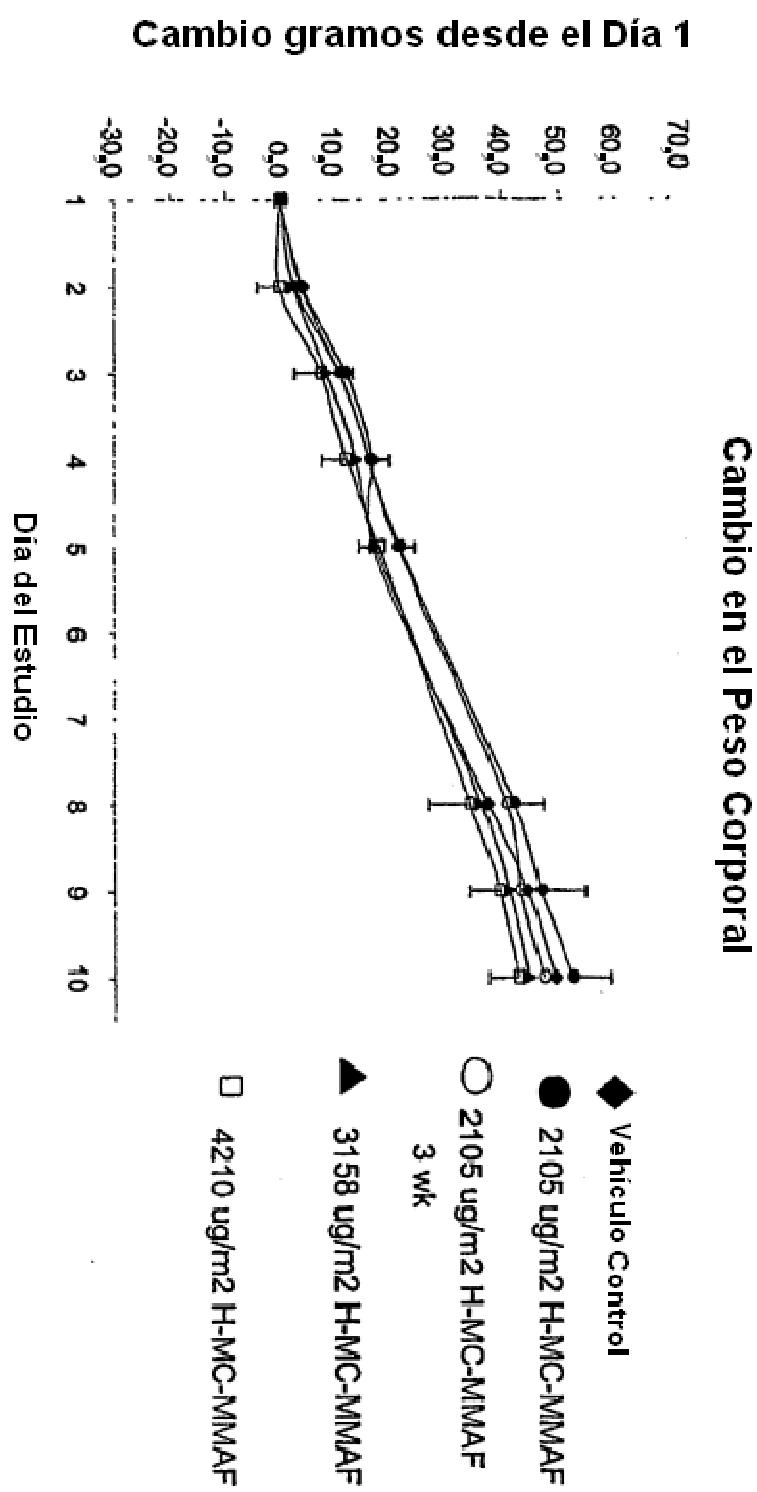


Figura 17

**Figura 18**

**Figura 19**