

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 645**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2011 PCT/US2011/024055**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2011 WO11097627**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2011 E 11740529 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2533804**

54 Título: **Conjugados de fármaco y anticuerpo (ADC) que se unen a proteínas 161P2F10B**

30 Prioridad:

08.02.2010 US 302489 P

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

21.05.2018

73 Titular/es:

**AGENSYS, INC. (100.0%)
1800 Stewart Street
Santa Monica, CA 90404, US**

72 Inventor/es:

**TORGOV, MICHAEL;
MORRISON, ROBERT KENDALL;
JAKOBOVITS, AYA;
GUDAS, JEAN y
AN, ZILI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 668 645 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 fármaco y anticuerpo (ADC) que se unen a proteínas 161P2F10B

Campo de la invención

5 La invención descrita en la presente se refiere a conjugados de fármaco y anticuerpo ("antibody drug conjugates", ADC) que se unen a proteínas denominadas 161P2F10B. La invención se refiere además a métodos y composiciones de pronóstico, profilácticos y terapéuticos útiles en el tratamiento de cánceres.

Antecedentes de la invención

10 El cáncer es la segunda causa principal de muerte en seres humanos, después de la enfermedad coronaria. En el mundo, millones de personas mueren de cáncer al año. Solo en EE. UU., tal como indica the American Cancer Society, el cáncer provoca la muerte de más de medio millón de personas al año, diagnosticándose 1,2 millones de casos nuevos anuales. Aunque las muertes como consecuencia de enfermedades cardíacas han disminuido significativamente, las provocadas por cáncer en general están aumentando. Se ha predicho que a principios del siguiente siglo, el cáncer será la principal causa de muerte.

15 En todo el mundo, varios cánceres destacan como los principales que provocan la muerte. Con muy pocas excepciones, la enfermedad metastásica que surge de un carcinoma es mortal. Además, incluso en aquellos pacientes de cáncer que inicialmente sobreviven a sus cánceres primarios, la experiencia habitual demuestra que sus vidas se alteran notablemente. Muchos pacientes con cáncer sufren una fuerte ansiedad que surge de saber que existe una probabilidad de recurrencia o de que el tratamiento no funcione. Muchos pacientes con cáncer sufren un debilitamiento físico después del tratamiento. Además, muchos pacientes con cáncer sufren una recurrencia.

20 Aunque ciertos marcadores que han sido previamente identificados, tales como PSA, PSM, PCTA y 161P2F10B, han facilitado los intentos de diagnosticar y tratar el cáncer de próstata, es necesario identificar más marcadores y dianas terapéuticas para el cáncer de próstata y cánceres relacionados para mejorar aún más el diagnóstico y la terapia.

25 En la actualidad, el cáncer de células renales ("Renal Cell Cancer", RCC) es la décima causa principal de muerte por cáncer en EE. UU. Se calcula que 51.190 personas serán diagnosticadas al año con carcinoma de células renales en EE. UU. y aproximadamente 12.890 personas murieron como consecuencia de la enfermedad en 2007 (American Cancer Society). Históricamente, el tratamiento se ha centrado principalmente en una nefrectomía, seguida de una inmunoterapia no específica y, a veces, terapia de radiación (Hauke, 2006). La inmunoterapia no específica incluye el tratamiento con las citoquinas interleuquina-2 o interferón- α , como agentes individuales o en combinación.

30 Después de la extirpación quirúrgica, 20-30% de los pacientes desarrollan enfermedad metastásica dentro de 1-3 años, a menudo en el pulmón (Motzer, *et al.*, 2006). La mediana de la supervivencia para pacientes con enfermedad metastásica es de aproximadamente 13 meses (Cohen y McGovern, 2005).

35 Desde 2005, seis (6) agentes han sido aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer de células renales avanzado. Estos avances incluyen varios agentes que se dirigen a las vías específicas implicadas en el cáncer de células renales. Estos agentes incluyen sorafenib (Nexavar®, aprobado por la FDA en diciembre de 2005), sunitinib (Sutent®, aprobado por la FDA en enero de 2006), temsirolimus (Torisel®, aprobado por la FDA en mayo de 2007), everolimus (Afinitor®, aprobado por la FDA en marzo de 2009), bevacizumab (Avastin® en combinación con interferón- α , aprobado por la FDA en agosto de 2009) y pazopanib (Votrient®, aprobado por la FDA en octubre de 2009). Sin embargo, a pesar de los avances en el tratamiento, el cáncer de células renales metastásico sigue siendo incurable y solo se ha aprobado el temsirolimus basándose en una ventaja en la supervivencia global.

40

45 Además, el carcinoma hepatocelular (es decir, cáncer de hígado) es el responsable del 80-90% de todos los cánceres de hígado. Este tipo de cáncer de hígado aparece con más frecuencia en hombres que en mujeres. Habitualmente se observa en personas de 50-60 años. En general, el tratamiento del cáncer de hígado es una cirugía agresiva o un trasplante de hígado, que puede tratar con éxito tumores pequeños o de crecimiento lento si se diagnostican pronto. Sin embargo, pocos pacientes son diagnosticados pronto. Los tratamientos de quimioterapia y radiación habitualmente no son eficaces. Sin embargo, estas terapias se utilizan para encoger tumores, de modo que la cirugía tenga más probabilidades de tener éxito. El tosilato de sorafenib (Nexavar®) está ahora disponible para los pacientes con cáncer de hígado. La prognosis para pacientes con cáncer de hígado habitualmente es mala, puesto que solo 10-20% de los carcinomas hepatocelulares pueden retirarse empleando cirugía. Por consiguiente,

50 es necesario desarrollar un agente que se emplee para tratar el cáncer de hígado.

55 Se está tomando en cuenta la utilidad terapéutica de anticuerpos monoclonales (mAb) (G. Kohler y C. Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975)). Los anticuerpos monoclonales ahora han sido aprobados como terapias en el trasplante, el cáncer, las enfermedades infecciosas, las enfermedades cardiovasculares y la inflamación. Diferentes isotipos tienen diferentes funciones efectoras. Estas diferencias en la función se reflejan en estructuras tridimensionales diferenciadas para los diversos isotipos de inmunoglobulinas (P. M. Alzari, *et al.*, *Annual Rev. Immunol.*, 6:555-580 (1988)).

Debido a que los ratones resultan convenientes para la inmunización y reconocen como extraños a la mayoría de los antígenos humanos, los mAb contra dianas humanas con potencial terapéutico generalmente han tenido un origen murino. Sin embargo, los mAb murinos presentan desventajas inherentes como productos terapéuticos humanos. Requieren una dosificación más frecuente, puesto que los mAb tienen una semivida en la circulación en seres humanos más corta que los anticuerpos humanos. De forma más crucial, la administración repetida de anticuerpos murinos al sistema inmunológico humano provoca que el sistema inmunológico humano responda reconociendo a la proteína de ratón como extraña y generando una respuesta de anticuerpos humanos antirratón ("human anti-mouse antibody", HAMA). Esta respuesta de HAMA puede provocar una reacción alérgica y la rápida eliminación del anticuerpo murino del sistema, haciendo que el tratamiento con el anticuerpo murino sea inútil. Para evitar dichos efectos, se han intentado crear sistemas inmunológicos humanos dentro de ratones.

Los intentos iniciales pretendían crear ratones transgénicos capaces de responder a antígenos con anticuerpos que contenían secuencias humanas (véase Bruggemann, *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 86:6709-6713 (1989)), pero se vieron limitados por la cantidad de ADN que puede ser mantenido de forma estable en los vehículos de clonación disponibles. El uso de vectores de clonación de cromosoma artificial de levadura ("yeast artificial chromosome", YAC) abrió el camino para introducir grandes fragmentos de línea germinal de un locus Ig humano en mamíferos transgénicos. Fundamentalmente, se introdujeron en ratones un gran número de genes de la región V, D y J humanos dispuestos con el mismo espaciado que se encuentra en el genoma humano y las regiones constantes humanas empleando YAC. Una de estas razas de ratones transgénicos se conoce como ratón Xenomouse® y está disponible en el mercado en Amgen Fremont, Inc. (Fremont CA).

Los documentos WO06/105488 y WO03/040340 describen anticuerpos anti-161P2F10B y su uso para suscitar una respuesta inmunológica, así como su uso en el tratamiento del cáncer renal y hepático.

Doronina *et al.* (*Bioconjugate Chemistry*, 17(1):114-124 (2006)) describen el uso de la monometil auristatina F (MMAF) conjugada con anticuerpos monoclonales. El documento WO08/100805 proporciona anticuerpos que se unen a Robo4, y analiza el uso de MMAF en conjugados de fármaco-anticuerpo.

25 **Sumario de la invención**

La invención proporciona conjugados de fármaco y anticuerpo ("antibody drug conjugates", ADC) que se unen a proteínas 161P2F10B. En algunas realizaciones, la invención comprende anticuerpos totalmente humanos conjugados con un agente terapéutico.

La invención proporciona además diversas composiciones inmunogénicas o terapéuticas, tales como conjugados de fármaco y anticuerpo, y estrategias para tratar cánceres, tales como los cánceres de tejidos listados en la tabla I.

La presente invención se refiere a:

[1] Un conjugado de fármaco y anticuerpo que comprende un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a una proteína 161P2F10B que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, y en el que el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la región V_H de SEQ ID NO:7, desde 20 a 142, y la región V_L de SEQ ID NO:8, desde 20 a 127, y en el que dicho anticuerpo se conjuga con monometil auristatina F (MMAF) empleando un conector.

[2] El conjugado de fármaco y anticuerpo de [1], en el que el fragmento de unión al antígeno es un fragmento Fab, F(ab')₂ o Fv.

[3] El conjugado de fármaco y anticuerpo de [1], en el que el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano.

[4] El conjugado de fármaco y anticuerpo de [1], que se produce de modo recombinante.

[5] Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de fármaco y anticuerpo de [1] en una forma de dosis unitaria humana.

[6] La composición farmacéutica de [5], en la que la composición es para el tratamiento del cáncer.

[7] La composición farmacéutica de [6], en la que el cáncer es un cáncer renal o un cáncer hepático.

[8] El conjugado de fármaco y anticuerpo de [1] para su uso en terapia. También, el conjugado de fármaco y anticuerpo de [1] para su uso en un método para inhibir el crecimiento de células de cáncer en un sujeto, que comprende:

administrar a dicho sujeto un conjugado de fármaco y anticuerpo de [1].

[9] Un método para transportar un agente citotóxico o un agente de diagnóstico a una célula, que comprende:

proporcionar MMAF conjugados con un anticuerpo, o con uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a una proteína 161P2F10B que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, y en el

que el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la región V_H de SEQ ID NO:7, desde 20 a 142, y la región V_L de SEQ ID NO:8, desde 20 a 127, para formar un conjugado de fármaco y anticuerpo; y

exponer la célula al conjugado de fármaco y anticuerpo o de fragmento y fármaco.

5 [10] El conjugado de fármaco y anticuerpo de [1] para su uso en un método para tratar un tumor en un mamífero, que comprende tratar el mamífero con una cantidad eficaz de un conjugado de fármaco y anticuerpo de [1].

[11] El conjugado de fármaco y anticuerpo de [1] para su uso en un método para reducir el crecimiento tumoral en un mamífero, que comprende tratar el mamífero con una cantidad eficaz de una combinación del conjugado de fármaco y anticuerpo de [1] y radiación.

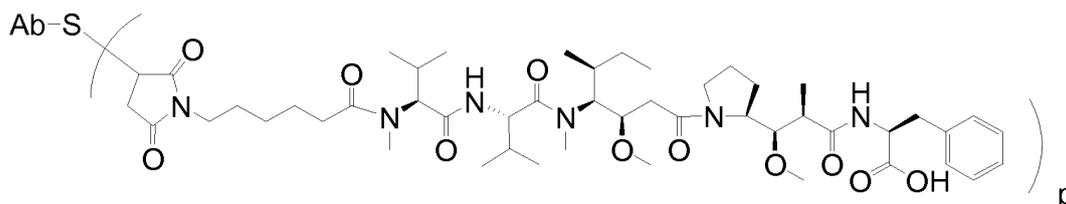
10 [12] El conjugado de fármaco y anticuerpo de [1] para su uso en un método para reducir el crecimiento tumoral en un mamífero, que comprende tratar el mamífero con una cantidad eficaz de una combinación del conjugado de fármaco y anticuerpo de [1] y un agente quimioterapéutico.

[13] El conjugado de fármaco y anticuerpo de [1] para su uso en un método para reducir el crecimiento tumoral en un mamífero, que comprende tratar el mamífero con una cantidad eficaz de una combinación del conjugado de fármaco y anticuerpo de [1] y un fármaco o una terapia biológicamente activa.

15 [14] El conjugado de fármaco y anticuerpo de [1] para su uso en un método para tratar el cáncer en un mamífero, que comprende tratar el mamífero con una cantidad eficaz de una combinación del conjugado de fármaco y anticuerpo de [1] y un agente quimioterapéutico.

20 [15] Un conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC), en el que el ADC tiene la fórmula L-(LU-D)_p, en la que: (a) L es el anticuerpo que comprende un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a una proteína 161P2F10B que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, y en el que el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la región V_H de SEQ ID NO:7, desde 20 a 142, y la región V_L de SEQ ID NO:8, desde 20 a 127; (b) LU es un conector; (c) D es un resto de fármaco, en el que el fármaco es monometil auristatina F (MMAF); (d) p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12.

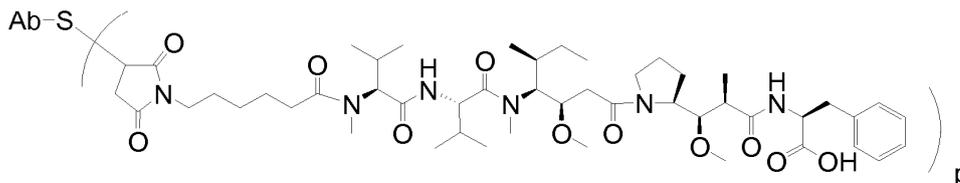
25 [16] Un conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC), en el que el ADC tiene la siguiente fórmula, en la que Ab-S es el anticuerpo que comprende un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a una proteína 161P2F10B que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, y en el que el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la región V_H de SEQ ID NO:7, desde 20 a 142, y la región V_L de SEQ ID NO:8, desde 20 a 127; y p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12.



30 [17] Un conjugado de fármaco y anticuerpo que comprende un anticuerpo que se une específicamente a una proteína 161P2F10B que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, y en el que el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID NO:7, desde 20 a 468, y la cadena ligera de SEQ ID NO:8, desde 20 a 233, y en el que dicho anticuerpo está conjugado con monometil auristatina F (MMAF).

35 [18] Un conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC), en el que el ADC tiene la fórmula L-(LU-D)_p, en la que: (a) L es el anticuerpo que comprende un anticuerpo que se une específicamente a una proteína 161P2F10B que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, y en el que el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID NO:7, desde 20 a 468, y la cadena ligera de SEQ ID NO:8, desde 20 a 233; (b) LU es un conector; (c) D es un resto de fármaco, en el que el fármaco es monometil auristatina F (MMAF); (d) p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12.

40 [19] Un conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC), en el que el ADC tiene la siguiente fórmula, en la que Ab-S es el anticuerpo que comprende un anticuerpo que se une específicamente a una proteína 161P2F10B que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, y en el que el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID NO:7, desde 20 a 468, y la cadena ligera de SEQ ID NO:8, desde 20 a 233; y p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12.



Breve descripción de la figuras

Figura 1. En la figura 1 se muestra la secuencia de ADNc y de aminoácidos de 161P2F10B. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 44-2671 e incluye el codón de fin.

Figura 2. Secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de anticuerpos de 161P2F10B.

- 5 Figura 2A. La secuencia de ADNc y de aminoácidos de la cadena pesada de H16-7.8. La secuencia conductora está subrayada y la región variable de cadena pesada está doblemente subrayada. El subrayado discontinuo muestra la región constante de IgG2 humana.

- 10 Figura 2B. La secuencia de ADNc y de aminoácidos de la cadena ligera de H16-7.8. La secuencia conductora está subrayada y la región variable de cadena ligera está doblemente subrayada. El subrayado discontinuo muestra la región constante kappa de Ig humana.

Figura 3. Secuencias de aminoácidos de anticuerpos de 161P2F10B.

Figura 3A. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de H16-7.8. La secuencia conductora está subrayada y la región variable de cadena pesada está doblemente subrayada. El subrayado discontinuo muestra la región constante de IgG2 humana.

- 15 Figura 3B. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de H16-7.8. La secuencia conductora está subrayada y la región variable de cadena ligera está doblemente subrayada. El subrayado discontinuo muestra la región constante kappa de Ig humana.

Figura 4. Alineamiento de anticuerpos H16-7.8 con una línea germinal humana.

Figura 4A. Alineamiento de la cadena pesada de H16-7.8 con la línea germinal humana VH4-31/D5-12/JH6.

- 20 Figura 4B. Alineamiento de la cadena ligera de H16-7.8 con la línea germinal humana A26/JK1.

- Figura 5. Expresión recombinante de H16-7.8 en células CHO. Las secuencias de cadena pesada y ligera de H16-7.8 se clonaron en vectores de expresión. Los vectores se transfectaron en células CHO. Células 3T3-control y 3T3-161P2F10B se tiñeron con H16-7.8 procedente de células de hibridoma o CHO. La unión se detectó mediante citometría de flujo. Los resultados demuestran que se segrega H16-7.8 expresado recombinantemente en células CHO y que se une específicamente a 161P2F10B en la superficie celular.
- 25

- Figura 6. Unión a células y afinidad de H16-7.8 y H16-7.8mcMMAF. Se ensayaron H16-7.8 y H16-7.8mcMMAF para la afinidad de unión a 161P2F10B expresado endógenamente sobre células Ku812. Brevemente, once (11) diluciones de H16-7.8 o H16-7.8mcMMAF se incubaron con células Ku812 (50.000 células por pocillo) durante la noche a 4 °C a una concentración final de 160 nM a 0,0001 nM. Al final de la incubación, las células se lavaron y se incubaron con anticuerpo de detección anti-IgG-PE durante 45 min a 4 °C. Después de lavar los anticuerpos de detección no unidos, las células se analizaron mediante FACS. Se obtuvieron los valores de intensidad de fluorescencia promedio ("Mean Fluorescence Intensity", MFI) (véase la tabla IV). Los valores de MFI se introdujeron en el programa informático Graphpad Prism y se analizaron empleando la ecuación de un único sitio de unión (hipérbola) de $Y = B_{max} * X / (K_d + X)$ para generar las curvas de saturación de H16-7.8 o H16-7.8mcMMAF mostradas en la figura 6. B_{max} es el valor de MFI en la unión máxima de H16-7.8 o H16-7.8mcMMAF a 161P2F10B; K_d es la afinidad de unión de H16-7.8 o H16-7.8mcMMAF, que es la concentración de H16-7.8 o H16-7.8mcMMAF necesaria para alcanzar la unión semimáxima. La afinidad calculada (K_d) de H16-7.8 y H16-7.8mcMMAF es de 0,06 nM y 0,19 nM, respectivamente, a 161P2F10B expresado endógenamente sobre la superficie de células Ku812.
- 30
- 35

- Figura 7. Unión de H16-7.8 y H16-7.8mcMMAF a células de cáncer renal. Células UGK-3 humanas (células de cáncer renal de células claras derivadas de paciente) y células RXF-393 (células de cáncer renal de células claras) se tiñeron con 10 µg/ml de H16-7.8 nativo, H16-7.8mcMMAF, o una IgG2 humana de control de isotipo y se evaluaron mediante FACS. Los resultados de la figura 7 (paneles a la izquierda) demuestran una tinción intensa de las dos células de tumor renal diferentes con H16-7.8 (líneas grises), pero no con el MAb control (histogramas oscuros). Los paneles a la derecha muestra una tinción intensa similar de las mismas células de tumor renal con H16-7.8mcMMAF (líneas grises) (figura 7; paneles a la derecha). Estos resultados demuestran que H16-7.8 y H16-7.8mcMMAF se unen al antígeno de 161P2F10B nativo expresado sobre la superficie de células de cáncer humano. La conjugación del H16-7.8 nativo para generar H16-7.8mcMMAF no altera su unión sobre la superficie celular al antígeno de 161P2F10B nativo expresado sobre la superficie de células de cáncer humano.
- 40
- 45

Figura 8. Citotoxicidad celular por H16-7.8mcMMAF. Se cultivaron en placa 2000 células KU812 viables por triplicado en el día 0 y se dejó que se recuperasen durante la noche. Al día siguiente se añadieron diluciones 1:4 en serie de diferentes lotes de H16-7.8mcMMAF o un MAb control conjugado con mcMMAF para conseguir las concentraciones finales. Se dejó que las células incubasen durante seis (6) días, tras lo cual se añadieron 20 µl de azul Alamar a cada pocillo. Las placas se incubaron durante cuatro (4) horas más y se leyó la intensidad de fluorescencia en un lector de placas fluorescente empleando una longitud de onda de excitación de 540 nm y una longitud de onda de emisión de 620 nm. Los resultados demuestran que ambos lotes de H16-7.8mcMMAF inhibían potentemente la proliferación de células KU812. Se determinó que la CI50 era de 0,2 nM y 0,1 nM para el lote (1) y el lote (2), respectivamente. Un MAb control totalmente humano que no se une a células KU812 se conjugó con mcMMAF para producir un DAR de 3,9 (+/-0,2). El ADC control (mcF control) no inhibe la proliferación de células KU812, lo cual demuestra también la especificidad de la citotoxicidad. Así, estos resultados indican que H16-7.8mcMMAF puede transportar selectivamente un fármaco citotóxico a células que expresan 161P2F10B, lo cual conduce a su destrucción.

Figura 9. Eficacia de H16-7.8mcMMAF en un xenoinjerto de cáncer renal humano establecido por vía subcutánea UG-K3 en ratones SCID. En este experimento, un xenoinjerto de cáncer renal humano derivado de un paciente UG-K3 se mantuvo por medio de transferencias en serie en ratones SCID. Se recolectaron tumores madre de modo estéril y se trituraron en trozos pequeños. Los trozos de tumor se digirieron enzimáticamente para producir suspensiones de células individuales empleando Liberase Blendzyme (Roche Applied Science, Indianápolis, IN). Se inyectaron $1,5 \times 10^6$ células en los flancos de ratones SCID individuales y se dejó que los tumores creciesen sin tratar hasta que alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm³. Los animales se asignaron aleatoriamente a las siguientes cohortes: un grupo tratado con H16-7.8mcMMAF, un control de H16-7.8, y un control de dextrosa al 5%. Se dosificó H16-7.8mcMMAF y H16-7.8 a 10 mg/kg una vez en el día 0 mediante una inyección en embolada intravenosa. La cantidad de H16-7.8mcMMAF y H16-7.8 administrada se basa en el peso corporal individual de cada animal obtenido inmediatamente antes de la dosificación. El control de dextrosa al 5% se dosificó a 150 µl por animal. El crecimiento de los tumores se controló empleando mediciones con calibrador cada 3 a 4 días hasta el final del estudio. Se calculó el volumen del tumor como la anchura²×longitud/2, en la que la anchura es la dimensión más pequeña y la longitud es la dimensión más grande. Los animales en los grupos control recibieron una eutanasia compasiva cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 1000 mm³. Los animales en el grupo tratado con H16-7.8mcMMAF se controlaron durante dos semanas más antes del sacrificio. Se realizó un análisis estadístico en el último momento del tiempo cuando los datos de ambos grupos control estuvieron disponibles, empleando un ensayo de Kruskal-Wallis con $\alpha = 0,05$.

Los resultados demostraron que el tratamiento de tumores de xenoinjerto de células de tumor renal de células claras UG-K3 con H16-7.8mcMMAF a todas las dosis y programas estudiados produjo una inhibición significativa del crecimiento tumoral en ratones SCID

Figura 10. Inhibición del crecimiento en xenoinjertos ortotópicos establecidos de UG-K3 por H16-7.8mcMMAF. Se evaluó la capacidad de H16-7.8mcMMAF para inhibir el crecimiento de tumores renales establecidos ortotópicamente empleando xenoinjertos de tumor UG-K3 derivados de un paciente. Brevemente, disoluciones madre de tumores UG-K3 se digirieron enzimáticamente y se implantaron quirúrgicamente 1,5 millones de células viables en los riñones de ratones SCID macho en el día 0. Se dejó que los tumores creciesen durante 7 días, tras lo cual los animales se aleatorizaron en 4 grupos de tratamiento diferentes (n = 10 por grupo). Los animales aleatorizados en el grupo A recibieron ADC control a 5 mpk, el grupo B recibió H16-7.8mcMMAF a 3 mg/kg, y el grupo C recibió H16-7.8mcMMAF a 5 mg/kg administrados cada 4 días para un total de 4 dosis. El grupo D recibió H16-7.8mcMMAF a 10 mg/kg una vez. Al final del estudio (día 41), los animales se sacrificaron, y los riñones izquierdo y derecho se pesaron en una balanza electrónica. Se determinó el peso de los tumores representados en una gráfica restando el peso del riñón contralateral sin tumor del peso del riñón derecho que porta el tumor.

Los resultados demuestran que el tratamiento de tumores de xenoinjertos de células de tumor renal de células claras UG-K3 con H16-7.8mcMMAF en todas las dosis y programas estudiados produjo una inhibición notable del crecimiento tumoral. Los pesos de los tumores en todos los grupos de tratamiento con H16-7.8mcMMAF (B, C, y D) fueron menores que 1% de los pesos tumorales en el grupo tratado control. Estas diferencias fueron muy estadísticamente significativas ($p < 0,0001$, ANOVA).

Figura 11. Eficacia de H16-7.8mcMMAF en un xenoinjerto de cáncer renal humano establecido por vía subcutánea RXF-393 en ratones SCID. En este experimento, se inyectaron células de cáncer renal humano RXF-393 ($0,5 \times 10^6$ células por ratón) en los flancos de ratones individuales y se dejó que los tumores creciesen sin tratar hasta que alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm³. Después, los animales se asignaron aleatoriamente a las siguientes cohortes: un grupo tratado con H16-7.8mcMMAF, un grupo tratado con H16-7.8, y un control de dextrosa al 5%. Se dosificó H16-7.8mcMMAF y H16-7.8 a 10 mg/kg una vez semanal para un total de dos dosis mediante una inyección en embolada intravenosa. La cantidad de H16-7.8mcMMAF y H16-7.8 administrada se basa en el peso corporal individual de cada animal obtenido inmediatamente antes de la dosificación. El control de dextrosa al 5% se dosificó a 150 µl por animal. El crecimiento de los tumores se controló empleando mediciones con calibrador cada 3 a 4 días hasta el final del estudio. Se calculó el volumen del tumor como la anchura²×longitud/2, en la que la anchura es la dimensión más pequeña y la longitud es la dimensión más grande. Los animales en los grupos control

recibieron una eutanasia compasiva cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 1000 mm³. Los animales en el grupo tratado con H16-7.8mcMMAF se controlaron durante dos semanas más antes del sacrificio.

Los resultados demostraron que el tratamiento de tumores de xenoinjerto de cáncer renal humano RFX-393 con H16-7.8mcMMAF a todas las dosis y programas estudiados produjo una inhibición significativa del crecimiento tumoral en ratones SCID. Se realizó un análisis estadístico en el último momento del tiempo cuando los datos de ambos grupos control estuvieron disponibles, empleando un ensayo de Kruskal-Wallis con $\alpha = 0,05$.

Figura 12. Estudio de la eficacia de H16-7.8, comparado con H16-7.8mcMMAF, en el cáncer renal humano establecido por vía subcutánea SKRC-01 en ratones SCID. Se inyectaron células de cáncer renal humano SKRC-01 ($0,8 \times 10^6$ células por ratón) en los flancos de ratones individuales. Se dejó que los tumores crecieran sin tratar hasta que alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm³. En el día 0 cuando los tumores alcanzaron 100 mm³, los animales se asignaron aleatoriamente a las siguientes cohortes: un grupo tratado con H16-7.8mcMMAF, un grupo tratado con H16-7.8, y un control de dextrosa al 5%. Se dosificó H16-7.8mcMMAF y H16-7.8 a 4 mg/kg cada cuatro días para un total de cuatro dosis mediante una inyección en embolada intravenosa. La cantidad de H16-7.8mcMMAF y H16-7.8 administrada se basa en el peso corporal individual de cada animal obtenido inmediatamente antes de la dosificación. El control de dextrosa al 5% se dosificó a 150 μ l por animal. El crecimiento de los tumores se controló empleando mediciones con calibrador cada 3 a 4 días. Se calculó el volumen del tumor como la anchura² × longitud/2, en la que la anchura es la dimensión más pequeña y la longitud es la dimensión más grande.

Los resultados demuestran que el ADC de H16-7.8mcMMAF inhibe significativamente el crecimiento de formación de tumores SKRC-01, mientras que el MAb H16-7.8 desnudo no tuvo este efecto. Así, el ADC de H16-7.8mcMMAF tiene un efecto significativamente más notable que el anticuerpo desnudo H16-7.8.

Figura 13. Estudio de la eficacia de H16-7.8mcMMAF, comparado con otros conjugados de fármaco y anticuerpo (ADC) de 161P2F10B, en UG-K3 establecido por vía subcutánea en ratones SCID. En otro experimento, se inyectaron células de cáncer renal humano UG-K3 ($1,5 \times 10^6$ células por ratón) en los flancos de ratones individuales. Se dejó que los tumores crecieran sin tratar hasta que alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm³. En el día 0 cuando los tumores alcanzaron 100 mm³, los animales se asignaron aleatoriamente a las siguientes cohortes: un grupo H16-7.8mcMMAF, un grupo H16-7.8vcMMAE, y un grupo H16-1.11mcMMAF, y un grupo H16-1.11vcMMAE, un control de PBS, y un grupo tratado con MAb-vcMMAE control. Todos los conjugados de fármaco y anticuerpo (ADC) se dosificaron a 10 mg/kg una vez en el día 0. La cantidad de cada ADC administrada se basa en el peso corporal individual de cada animal obtenido inmediatamente antes de la dosificación. El control de PBS se dosificó a 150 μ l por animal. El crecimiento de los tumores se controló empleando mediciones con calibrador cada 3 a 4 días. Se calculó el volumen del tumor como la anchura² × longitud/2, en la que la anchura es la dimensión más pequeña y la longitud es la dimensión más grande.

Los resultados demuestran que los ADC de H16-7.8vcMMAE y H16-1.11vcMMAE no inhiben el crecimiento de formación de tumores. Además, ambos H16-7.8mcMMAF y H16-1.11mcMMAF inhiben significativamente el crecimiento de formación de tumores UG-K3 durante los primeros treinta (30) días. Después del día treinta (30), el H16-7.8mcMMAF produjo un efecto significativamente más notable cuando se compara con H16-1.11mcMMAF

Figura 14. Mapas de péptidos de H16-7.8mcMMAF y H16-7.8. Los H16-7.8mcMMAF y H16-7.8 obtenidos se trataron con ditiotreitol (DTT) para reducir los enlaces disulfuro, seguido de una alquilación de las cisteínas libres resultantes. Se empleó guanidina en esta etapa para asegurar la desnaturalización completa de la proteína. Después de una diálisis para eliminar la guanidina, las muestras se digirieron con una endoproteinasa específica, Lys-C. La Lys-C rompe los enlaces peptídicos en el lado C-terminal de los restos lisina. Los péptidos resultantes se analizaron mediante una cromatografía en fase inversa acoplada con una espectrometría de masa. Los tiempos de retención en fase inversa y las proporciones de masa a carga observadas de los picos se compararon entre H16-7.8mcMMAF y H16-7.8. El análisis de LC-MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas) se realizó empleando un WATERS Acquity UPLC acoplado a un espectrómetro de masas a WATERS Q-TOFp. La muestra digerida se aplicó a una columna YMC C18 y se eluyó con un gradiente de acetonitrilo que contenía ácido trifluoroacético. Tal como demuestran los resultados, las intensidades de los picos, indicadas por un asterisco, se redujeron en el anticuerpo conjugado, comparado con el anticuerpo nativo. Los picos marcados con una flecha representan nuevos picos que aparecen en el mapa de péptidos del anticuerpo conjugado. De modo específico, se cree que los picos marcados con un asterisco o con una flecha son un péptido destinado para la conjugación y el péptido conjugado resultante, respectivamente.

Figura 15. Espectros de masas del pico (*). Los resultados muestran una porción de los espectros de masas del pico marcado con un asterisco en la figura 14. El valor de masa de la señal que ha cambiado durante la conjugación se indica con el signo "más". Este péptido con un m/z aproximado de 970,4 (estado de carga +3) se identificó como C225-K250 que se origina de la región de bisagra de la cadena pesada y contiene los sitios de conjugación esperados.

Figura 16. Cromatogramas de iones extraídos (XIC) de MSE para los mapas de péptidos de H16-7.8mcMMAF y H16-7.8 a 619,4 m/z. Para identificar los picos recién aparecidos, que se cree que son el péptido conjugado de la anterior figura 14, se realizó un análisis de LC-MS empleando la técnica de adquisición de datos de energía elevada

- (MSE). Esta figura muestra los cromatogramas de iones extraídos (XIC) de MSE para los mapas de péptidos de H16-7.8mcMMAF y H16-7.8 empleando el m/z de 619,4. Este ion se corresponde con un fragmento de ion del resto de fármaco. Los picos observados en XIC a 619,4 son casi idénticos a los picos marcados con una flecha en la figura 14. Además, no se detectaron estos picos en el cromatograma del anticuerpo nativo. Estas observaciones sugieren que los picos detectados en los XIC a un m/z de 619,4 son aparentemente péptidos conjugados al fármaco y se identifican por sus valores de masa intacta. El resultado se resume en la tabla V. Estos resultados sugieren que, en el caso del conjugado, los péptidos predominantes son los conjugados a 2 fármacos en la región de bisagra de la cadena pesada. Estos datos son coherentes con los datos obtenidos por el otro método ortogonal, tal como un análisis de DAR.
- Figura 17. Ejemplos de espectros que muestran perfiles de masas del ADC de H16-7.8mcMMAF desglicosilado. Se determinó la masa completa del H16-7.8mcMMAF desglicosilado mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo-ionización de electrospray ("electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry", ESI-TOF). Se diluyeron muestras de ensayo con tampón fosfato de sodio 250 mM, pH 7,5, y después se incubaron durante la noche a 37 °C con glicopeptidasa F. Las muestras se inyectaron en una columna PLRPTM (Varian Technology), se equilibraron a 90 °C, y se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo/agua. Los picos de las muestras se analizaron mediante un sistema Acquity UPLC acoplado a un espectrómetro de masas WATERS Synapt (Waters) y las masas se reconstruyeron a partir de los datos brutos mediante el programa informático MaxEnt1. Se muestra un ejemplo de un perfil espectral de masas para el H16-7.8mcMMAF desglicosilado. El anticuerpo conjugado al fármaco predominante es una especie que porta una carga de 4 fármacos. Esta observación, que incluye la abundancia de anticuerpo no conjugado en H16-7.8mcMMAF, resulta coherente con los resultados obtenidos por los otros métodos ortogonales, tales como DAR mediante RP-HPLC, cartografiado de péptidos y ensayo de HIC.
- Figura 18. Perfil de proporción de fármaco-anticuerpo ("Drug Antibody Ratio", DAR) de H16-7.8mcMMAF. Se realizó un análisis de DAR para la determinación cuantitativa mediante HPLC de la cantidad relativa de la carga de fármaco en cada cadena ligera y cadena pesada. Los análisis de DAR se realizaron empleando una columna analítica PLRP-S, de 2,1 mm × 50 mm, con una fase móvil A que consistía en ácido fórmico al 2,0%, y una fase móvil B que consistía en ácido fórmico al 2,0% más acetonitrilo al 90%. Se muestra un perfil de DAR representativo para H16-7.8mcMMAF. El valor de DAR es de 4,0. La muestra se sometió a un análisis de LC-MS empleando las mismas condiciones de HPLC de este método para identificar el pico observado. Los resultados se resumen en la tabla VI. La identificación del pico de los resultados de DAR obtenidos durante la calificación de este método ha sido confirmada ortogonalmente mediante LC-MS.

Descripción detallada de la invención

Resumen de las secciones

- I.) Definiciones
- II.) Anticuerpos de 161P2F10B
- 35 III.) Generalidades de los conjugados de fármaco y anticuerpo
 - III(A). Auristatinas y dolostatinas
- IV.) Conjugados de fármaco y anticuerpo que se unen a 161P2F10B
- V.) Unidades de conector
- VI.) La unidad alargadora
- 40 VII.) La unidad de aminoácido
- VIII.) La unidad espaciadora
- IX.) La unidad de fármaco
- X.) Carga del fármaco
- XI.) Métodos para determinar el efecto citotóxico de los ADC
- 45 XII.) Tratamiento de cánceres
- XIII.) 161P2F10B como diana para una terapia basada en anticuerpos
- XIV.) Cócteles de ADC de 161P2F10B
- XV.) Terapia de combinación

XVI.) Kits/artículos manufacturados

Definiciones

A menos que se indique lo contrario, se considera que todos los términos, expresiones, indicaciones y otros términos o terminología empleados en la presente tiene los significados que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención. En algunos casos, los términos y expresiones con significados que se entienden habitualmente se definen en la presente para aclararlos y/o para facilitar su referencia, y la inclusión de dichas definiciones en la presente no debe considerarse que necesariamente represente una diferencia sustancial con respecto a lo que se entiende en general en la técnica. Muchas de las técnicas y los procedimientos descritos o referidos en la presente son bien entendidos y los expertos en la técnica los emplean habitualmente utilizado una metodología convencional, tal como, por ejemplo, las metodologías de clonación molecular ampliamente utilizadas descritas en Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2ª edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Según sea apropiado, los procedimientos que implican el uso de kits y reactivos disponibles en el mercado se realizan, en general, según los protocolos y/o los parámetros definidos por el fabricante, a menos que se indique lo contrario.

15 Cuando se emplea un nombre comercial en la presente, la referencia al nombre comercial también remite a la formulación del producto, el fármaco genérico y el ingrediente o ingredientes farmacéuticos activos del producto del nombre comercial, a menos que el contexto indique lo contrario.

20 Las expresiones “cáncer avanzado”, “cáncer localmente avanzado”, “enfermedad avanzada” y “enfermedad localmente avanzada” significan cánceres que se han extendido a través de la cápsula de tejido pertinente, y pretenden incluir la enfermedad en estadio C según el sistema de American Urological Association (AUA), la enfermedad en el estadio C1-C2 según el sistema de Whitmore-Jewett, y la enfermedad en el estadio T3-T4 y N+ según el sistema de TNM (tumor, nodo, metástasis). En general, no se recomienda la cirugía para pacientes con enfermedad localmente avanzada, y estos pacientes presentan unos resultados sustancialmente menos favorables, comparado con pacientes que padecen un cáncer clínicamente localizado (confinado a un órgano).

25 La abreviatura “AFP” se refiere a dimetilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproína-fenilalanina-p-fenilendiamina (véase la fórmula XVI a continuación).

La abreviatura “MMAE” se refiere a monometil auristatina E (véase la fórmula XI a continuación).

La abreviatura “AEB” se refiere a un éster producido haciendo reaccionar la auristatina E con ácido paraacetilbenzoico (véase la fórmula XX a continuación).

30 La abreviatura “AEVB” se refiere a un éster producido haciendo reaccionar la auristatina E con ácido benzoilvalérico (véase la fórmula XXI a continuación).

La abreviatura “MMAF” se refiere a dovalina-valina-dolaisoleucina-dolaproína-fenilalanina (véase la fórmula XIV a continuación).

35 A menos que indique lo contrario, el término “alquilo” se refiere a un hidrocarburo saturado lineal o ramificado que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono dentro de estos), siendo preferido de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo son metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, n-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, n-decilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2-metil-3-pentilo, 2,3-dimetil-2-butilo, y 3,3-dimetil-2-butilo.

40 Los grupos alquilo, por sí solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferiblemente de 1 a 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado de halógeno) que incluyen, pero no se limitan a -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, en los que cada R' se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, o -arilo, y en los que dichos grupos -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, y -alquino C₂-C₈ pueden estar opcionalmente sustituidos además con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, en los que cada R" se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, o -arilo.

55 A menos que indique lo contrario, los términos “alqueno” y “alquino” se refieren a cadenas de carbonos lineales y ramificadas que tiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono dentro de estos), siendo preferido de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 átomos de carbono. Una cadena de alqueno tiene al menos un doble

enlace en la cadena, y una cadena de alquino tiene al menos un triple enlace en la cadena. Los ejemplos de grupos alqueno incluyen, pero no se limitan a etileno o vinilo, alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, y -2,3-dimetil-2-butenilo. Los ejemplos de grupos alquino incluyen, pero no se limitan a acetilénico, propargilo, acetileno, propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo, y -3-metil-1-butinilo.

Los grupos alqueno y alquino, por sí solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferiblemente de 1 a 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado de halógeno) que incluyen, pero no se limitan a halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, en los que cada R' se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, o -arilo, y en los que dichos grupos -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, y -alquino C₂-C₈ pueden estar opcionalmente sustituidos además con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, en los que cada R" se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, o -arilo.

A menos que indique lo contrario, el término "alqueno" se refiere a un radical hidrocarbonado saturado de cadena lineal o ramificada que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono dentro de estos), siendo preferido de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono, y que tiene dos centros de radicales monovalentes obtenidos por la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo de carbono o de dos átomos de carbono diferentes del alcano de origen. Los alquenos típicos incluyen pero no se limitan a metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno, decaleno, 1,4-ciclohexileno y similares. Los grupos alqueno, por sí solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferiblemente de 1 a 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado de halógeno) que incluyen, pero no se limitan a -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, en los que cada R' se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, o -arilo, y en los que dichos grupos -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, y -alquino C₂-C₈ pueden estar opcionalmente sustituidos además con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, en los que cada R" se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, o -arilo.

A menos que se indique lo contrario, el término "alqueno" se refiere a un grupo alqueno opcionalmente sustituido que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alqueno incluyen, por ejemplo, etenileno (-CH=CH-) y propenileno (-CH=CHCH₂-).

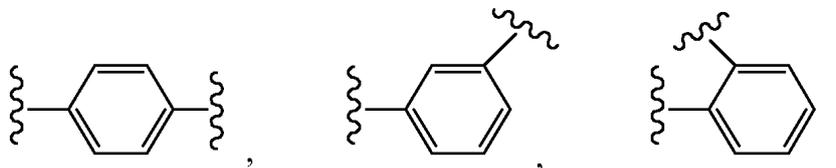
A menos que se indique lo contrario, el término "alquino" se refiere a un grupo alqueno opcionalmente sustituido que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquino incluyen, por ejemplo, acetileno (-C≡C-), propargilo (-CH₂C≡C-), y 4-pentinilo (-CH₂CH₂CH₂C≡CH-).

A menos que indique lo contrario, el término "arilo" se refiere a un radical hidrocarbonado aromático monovalente de 6-20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono dentro de estos) obtenido por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un sistema de anillo aromático de origen. Algunos grupos arilo se representan en los ejemplos de estructuras como "Ar". Los grupos arilo típicos incluyen, pero no se limitan a radicales derivados del benceno, benceno sustituido, fenilo, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares.

Un grupo arilo, por sí solo o como parte de otro grupo, puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos, preferiblemente de 1 a 5 grupos, o incluso de 1 a 2 grupos que incluyen, pero no se limitan a -halógeno, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -NO₂, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, en los que cada R' se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, o -arilo, y en los dichos grupos -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), y -arilo pueden estar opcionalmente sustituidos además con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, en los que cada R" se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, o -arilo.

A menos que se indique lo contrario, el término "arileno" se refiere a un grupo arilo opcionalmente sustituido que es divalente (es decir, obtenido por la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo de carbono o de dos

átomos de carbono diferentes de un sistema de anillo aromático de origen) y puede estar en la configuración orto, meta, o para, tal como se muestra en las siguientes estructuras, con el fenilo como ejemplo de grupo arilo.



Los grupos “-(alquilen C₁-C₈)arilo,” “-(alquenilen C₂-C₈)arilo”, y “-(alquinilen C₂-C₈)arilo” típicos incluyen, pero no se limitan a bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmétilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-ilo y similares.

A menos que indique lo contrario, el término “heterociclo” se refiere a un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o policíclico que tiene de 3 a 14 átomos del anillo (también denominados miembros del anillo), en el que al menos un átomo del anillo es al menos un anillo es un heteroátomo seleccionado de N, O, P, o S (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono y heteroátomos dentro de estos). El heterociclo puede tener de 1 a 4 heteroátomos del anillo seleccionados independientemente de N, O, P, o S. Uno o más átomos de N, C, o S en un heterociclo pueden estar oxidados. Un heterociclo monocíclico preferiblemente tiene de 3 a 7 miembros del anillo (por ejemplo, de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados independientemente de N, O, P, o S), y un heterociclo bicíclico preferiblemente tiene de 5 a 10 miembros del anillo (por ejemplo, de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados independientemente de N, O, P, o S). El anillo que incluye el heteroátomo puede ser aromático o no aromático. A menos que se indique lo contrario, el heterociclo está unido a su grupo colgante en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que produzca una estructura estable.

Los heterociclos se describen en Paquette, “Principles of Modern Heterocyclic Chemistry” (W. A. Benjamin, Nueva York, 1968), en particular 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; and *J. Am. Chem., Soc.*, 82:5566 (1960).

Los ejemplos de grupos “heterociclo” incluyen, como ejemplo y no como limitación, piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, bis-tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, octahidroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tiantrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizínilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, 4H-carbazolilo, carbazolilo, β-carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, benzisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo, e isatinilo. Los grupos “heterociclo” preferidos incluyen, pero no se limitan a benzofuranilo, benzotiofenilo, indolilo, benzopirazolilo, cumarinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo.

Un grupo heterociclo, por sí solo o como parte de otro grupo, puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos, preferiblemente de 1 a 2 grupos que incluyen, pero no se limitan a -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, en los que cada R' se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o -arilo, y en los que dichos grupos -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, y -arilo pueden estar opcionalmente sustituidos además con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, en los que cada R" se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o arilo.

Como ejemplo y no como limitación, los heterociclos unidos a carbono pueden estar unidos en las siguientes posiciones: posición 2, 3, 4, 5, o 6 de una piridina; posición 3, 4, 5, o 6 de una piridazina; posición 2, 4, 5, o 6 de una pirimidina; posición 2, 3, 5, o 6 de una pirazina; posición 2, 3, 4, o 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol; posición 2, 4, o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol; posición 3, 4, o 5 de un isoxazol, pirazol o isotiazol; posición 2 o 3 de una aziridina; posición 2, 3, o 4 de una azetidina; posición 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 de una

quinolina; o posición 1, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 de una isoquinolina. De modo aún más típico, 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.

5 Como ejemplo y no como limitación, los heterociclos unidos a nitrógeno pueden estar 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, o 1H-indazol; la posición 2 de un isoindol, o isoindolina; la posición 4 de una morfolina; y la posición 9 de un carbazol, o β -carbolina. De modo aún más típico, los heterociclos unidos a nitrógeno incluyen 1-aziridilo, 1-azetidilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo, y 1-piperidinilo.

10 A menos que indique lo contrario, el término "carbociclo" se refiere a un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o policíclico no aromático saturado o insaturado que tiene de 3 a 14 átomos del anillo (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono dentro de estos), en los que todos los átomos del anillo son átomos de carbono. Los carbociclos monocíclicos preferiblemente tienen de 3 a 6 átomos del anillo, aún más preferiblemente 5 o 6 átomos del anillo. Los carbociclos bicíclicos preferiblemente tienen de 7 a 12 átomos del anillo, por ejemplo, dispuestos como un sistema de biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], o 9 o 10 átomos del anillo dispuestos como un sistema de biciclo [5,6] o [6,6]. El término "carbociclo" incluye, por ejemplo, un anillo de carbociclo monocíclico condensado con un anillo de arilo (por ejemplo, un anillo de carbociclo monocíclico condensado con un anillo de benceno). Los carbociclos preferiblemente tienen de 3 a 8 átomos de carbono del anillo.

15 Los grupos carbociclo, por sí solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos, por ejemplo, con uno o más grupos, preferiblemente 1 o 2 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado de halógeno), que incluyen, pero no se limitan a -halógeno, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, en los que cada R' se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o -arilo, y en los que dichos grupos -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), y -arilo pueden estar opcionalmente sustituidos además con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, en los que R" se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o -arilo.

20 Los ejemplos de sustituyentes de carbociclo monocíclicos incluyen -ciclopropilo, -ciclobutilo, -ciclopentilo, -1-ciclopent-1-enilo, -1-ciclopent-2-enilo, -1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, -1-ciclohex-1-enilo, -1-ciclohex-2-enilo, -1-ciclohex-3-enilo, -cicloheptilo, -ciclooctilo, -1,3-ciclohexadienilo, -1,4-ciclohexadienilo, -1,3-cicloheptadienilo, -1,3,5-cicloheptatrienilo, y -ciclooctadienilo.

25 Un "carbociclo", empleado por sí solo o como parte de otro grupo, se refiere a un grupo carbociclo opcionalmente sustituido, según se definió anteriormente, que es divalente (es decir, se obtiene por la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo de carbono o de dos átomos de carbono diferentes de un sistema de anillo carbocíclico de origen).

30 A menos que el contexto indique lo contrario, un guion (-) indica el punto de unión a la molécula colgante. Por consiguiente, la expresión "-(alquilen C₁-C₈)arilo" o "-alquilen C₁-C₈ (arilo)" se refiere a un radical alquilen C₁-C₈, según se define en la presente, en el que el radical alquilen está unido a la molécula colgante en cualquiera de los átomos de carbono del radical alquilen, y uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono del radical alquilen está reemplazado por un radical arilo, según se define en la presente.

35 Cuando un grupo concreto está "sustituido", ese grupo puede tener uno o más sustituyentes, preferiblemente de uno a cinco sustituyentes, más preferiblemente de uno a tres sustituyentes, lo más preferiblemente de uno a dos sustituyentes, seleccionados independientemente de la lista de sustituyentes. Sin embargo, el grupo puede tener, en general, cualquier número de sustituyentes seleccionados de halógenos. Los grupos que están sustituidos se indican.

40 Se pretende que la definición de cualquier sustituyente o variable en una localización concreta en una molécula sea independiente de sus definiciones en otro punto de esta molécula. Se entiende que los sustituyentes y los patrones de sustitución en los compuestos de la invención pueden ser seleccionados por los expertos en la técnica para proporcionar compuestos que sean químicamente estables y que puedan sintetizarse con facilidad por medio de técnicas conocidas en la técnica, así como con los métodos indicados en la presente.

45 Los grupos protectores, tal como se emplean en la presente, se refieren a grupos que bloquean selectivamente, de modo temporal o permanente, un sitio reactivo en un compuesto multifuncional. Los grupos protectores de hidroxil adecuados para su uso en la presente invención son farmacéuticamente aceptables y puede ser o no necesario que

se retiren del compuesto de origen después de su administración a un sujeto para que el compuesto sea activo. La ruptura se produce a través de procesos metabólicos normales dentro del cuerpo. Los grupos protectores de hidroxilo son muy conocidos en la técnica; véase, *Protective Groups in Organic Synthesis* de T. W. Greene y P. G. M. Wuts (John Wiley & Sons, 3ª edición) e incluyen, por ejemplo, grupos protectores de éter (por ejemplo, alquil éteres y silil éteres que incluyen, por ejemplo, dialquil silil éter, trialquil silil éter, dialquil alcoxisilil éter), éster, carbonato, carbamato, sulfonato y fosfato. Los ejemplos de grupos protectores de hidroxilo incluyen, pero no se limitan a metil éter, metoximetil éter, metiltiometil éter, (fenildimetilsilil)metoximetil éter, benciloximetil éter, p-metoxibenciloximetil éter, p-nitrobenciloximetil éter, o-nitrobenciloximetil éter, (4-metoxifenoxi)metil éter, guaiacolmetil éter, t-butoximetil éter, 4-penteniloximetil éter, siloximetil éter, 2-metoxietoximetil éter, 2,2,2-tricloroetoximetil éter, bis(2-cloroetoxi)metil éter, 2-(trimetilsilil)etoximetil éter, mentoximetil éter, tetrahidropiranyl éter, 1-metoxiciclohexil éter, 4-metoxitetrahidropiranyl éter, S,S-dióxido de 4-metoxitetrahidropiranyl éter, 1-[(2-cloro-4-metil)fenil]-4-metoxipiperidin-4-il éter, 1-(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-il éter, 1,4-dioxan-2-il éter, tetrahidrofuranil éter, tetrahidrotiofuranil éter; etil éteres sustituidos, tales como 1-etoxietil éter, 1-(2-cloroetoxi)etil éter, 1-[2-(trimetilsilil)etoxi]etil éter, 1-metil-1-metoxietil éter, 1-metil-1-benciloxietil éter, 1-metil-1-benciloxi-2-fluoroetil éter, 1-metil-1-fenoxietil éter, 2-trimetilsilil éter, t-butil éter, alil éter, propargil éter, p-clorofenil éter, p-metoxifenil éter, bencil éter, p-metoxibencil éter, 3,4-dimetoxibencil éter, trimetilsilil éter, trietilsilil éter, tripropilsilil éter, dimetilisopropilsilil éter, dietilisopropilsilil éter, dimetilhexilsilil éter, t-butildimetilsilil éter, difenilmetsilil éter, éster benzoilformiato, éster acetato, éster cloroacetato, éster dicloroacetato, éster tricloroacetato, éster trifluoroacetato, éster metoxiacetato, éster trifenilmetoxiacetato, éster fenilacetato, éster benzoato, carbonato de alquilmetilo, carbonato de alquil-9-fluorenilmetilo, carbonato de alquiletilo, carbonato de alquil-2,2,2-tricloroetilo, carbonato de 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetilo, alquilsulfonato, bencilsulfonato, tosilato, metileno acetal, etilideno acetal, y t-butilmetilideno acetal. Los grupos protectores preferidos están representados por las fórmulas $-R^a$, $-\text{Si}(\text{R}^a)(\text{R}^a)(\text{R}^a)$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^a$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{R}^a)$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^a$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$, $\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$, y $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{OR}^a$, en las que R^a es alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{20}$, alqueno $\text{C}_2\text{-C}_{20}$, alquino $\text{C}_2\text{-C}_{20}$, $-(\text{alquilen } \text{C}_1\text{-C}_{20})(\text{carbociclo})$, $-(\text{alquilen } \text{C}_2\text{-C}_{20})(\text{carbociclo})$, $-(\text{alquilen } \text{C}_2\text{-C}_{20})(\text{carbociclo})$, $-\text{arilo } \text{C}_6\text{-C}_{10}$, $-(\text{alquilen } \text{C}_1\text{-C}_{20})(\text{arilo})$, $-(\text{alquilen } \text{C}_2\text{-C}_{20})(\text{arilo})$, $-(\text{alquilen } \text{C}_2\text{-C}_{20})(\text{arilo})$, $-(\text{alquilen } \text{C}_1\text{-C}_{20})(\text{heterociclo})$, $-(\text{alquilen } \text{C}_2\text{-C}_{20})(\text{heterociclo})$, o $-(\text{alquilen } \text{C}_2\text{-C}_{20})(\text{heterociclo})$, en los que dichos radicales alquilo, alqueno, alquino, alqueno, alqueno, alqueno, arilo, carbociclo y heterociclo, tanto por sí solos como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos.

“Alterar el patrón de glicosilación nativo”, para los objetivos de la presente, significa deleciónar uno o más restos carbohidrato que se encuentran en la secuencia nativa de 161P2F10B (eliminando el sitio de glicosilación subyacente o deleciónando la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos) y/o añadiendo uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa de 161P2F10B. Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, que implican un cambio en la naturaleza y las proporciones de los diversos restos carbohidrato presentes.

El término “análogo” se refiere a una molécula que es similar desde el punto de vista estructural o comparte atributos similares o correspondientes a otra molécula (por ejemplo, una proteína relacionada con 161P2F10B). Por ejemplo, un análogo de una proteína 161P2F10B puede unirse específicamente a un anticuerpo o una célula T que se une específicamente a 161P2F10B.

El término “anticuerpo” se emplea en el sentido más amplio, a menos que se indique claramente lo contrario. Por tanto, un “anticuerpo” puede ser un anticuerpo natural o fabricado por el ser humano, tales como anticuerpos monoclonales producidos mediante la tecnología del hibridoma convencional. Los anticuerpos de 161P2F10B comprenden anticuerpos monoclonales y policlonales, así como fragmentos que contienen el dominio de unión al antígeno y/o una o más regiones determinantes de la complementariedad de estos anticuerpos. Tal como se emplea en la presente, el término “anticuerpo” se refiere a cualquier forma de anticuerpo, o uno de sus fragmentos, que se une específicamente a 161P2F10B y/o muestra la actividad biológica deseada, e incluye específicamente anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos, con la condición de que se unan específicamente a 161P2F10B y/o muestren la actividad biológica deseada. Puede emplearse cualquier anticuerpo específico en los métodos y las composiciones proporcionados en la presente. Así, en una realización, el término “anticuerpo” incluye una molécula que comprende al menos una región variable procedente de una molécula de cadena ligera de una inmunoglobulina y al menos una región variable de una molécula de cadena pesada que, en combinación, forman un sitio de unión específico para el antígeno diana. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. Por ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. Los anticuerpos útiles en los presentes métodos y composiciones pueden generarse en un cultivo celular, en fagos o en diversos animales, que incluyen, pero no se limitan a vacas, conejos, cabras, ratones, ratas, hámsteres, cobayas, ovejas, perros, gatos, monos, chimpancés, simios. Por tanto, en una realización, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de mamífero. Pueden emplearse técnicas de fagos para aislar un anticuerpo inicial o para generar variantes con características de avidez o de especificidad alteradas. Estas técnicas son habituales y muy conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo se produce por medios recombinantes conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede producirse un anticuerpo recombinante transfectando una célula hospedante con un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica el anticuerpo. Pueden emplearse uno o más vectores para transfectar la secuencia de ADN que expresa al menos una región VL y una región VH en la célula hospedante. Los ejemplos de descripciones de medios recombinantes para la generación y la producción de anticuerpos incluyen

Delves, *Antibody Production: Essential Techniques* (Wiley, 1997); Shephard, *et al.*, *Monoclonal Antibodies* (Oxford University Press, 2000); Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles And Practice* (Academic Press, 1993); *Current Protocols In Immunology* (John Wiley & Sons, edición más reciente). Un anticuerpo de la presente invención puede modificarse por medios recombinantes para aumentar la eficacia del anticuerpo para mediar en la función deseada.

5 Así, se encuentra dentro de la invención el hecho de que los anticuerpos puedan modificarse mediante sustituciones empleando medios recombinantes. Generalmente, las sustituciones serán sustituciones conservativas. Por ejemplo, al menos un aminoácido en la región constante del anticuerpo puede ser reemplazado por un resto diferente. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.624.821, la patente de EE. UU. n.º 6.194.551, la solicitud n.º WO 9958572; y Angal, *et al.*, *Mol. Immunol.*, 30:105-08 (1993). La modificación en los aminoácidos incluye deleciones, adiciones y sustituciones de aminoácidos. En algunos casos, estos cambios se realizan para reducir actividades no deseadas, por ejemplo, la citotoxicidad dependiente del complemento. Con frecuencia, los anticuerpos se marcan uniendo una sustancia, de modo covalente o no covalente, que proporciona una señal detectable. Se conoce una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación y estas se describen a fondo en la bibliografía científica y de patentes. Estos anticuerpos pueden seleccionarse para su unión a 161P2F10B normal o defectuosa. Véase, por ejemplo, 10 *Antibody Engineering: A Practical Approach* (Oxford University Press, 1996). Los anticuerpos adecuados con las actividades biológicas deseadas pueden identificarse en los siguientes ensayos *in vitro* que incluyen, pero no se limitan a: proliferación, migración, adhesión, crecimiento en agar blando, angiogénesis, comunicación célula a célula, apoptosis, transporte, transducción de señales, litalización, destrucción secundaria mediada por anticuerpos, y los siguientes ensayos *in vivo*, tales como la inhibición del crecimiento tumoral. El anticuerpo proporcionado en la presente puede ser útil como un intermedio de ADC. Los anticuerpos proporcionados en la presente también pueden ser útiles en aplicaciones de diagnóstico. Como anticuerpos de captura o no neutralizantes, pueden seleccionarse para su capacidad para unirse al antígeno específico sin inhibir la unión al receptor o la actividad biológica del antígeno. Como anticuerpos neutralizantes, los anticuerpos pueden ser útiles en ensayos de unión competitiva. También pueden emplearse para cuantificar 161P2F10B o su receptor.

25 La expresión "porción de unión al antígeno" o "fragmento de anticuerpo" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), tal como se emplea en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo de 161P2F10B que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, 161P2F10B; figura 1). Se ha descubierto que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro de la expresión "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos a través de un enlace disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento de dAb (Ward, *et al.* (1989), *Nature*, 341:544-546), que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes distintos, pueden ser unidos, empleando métodos recombinantes, por medio de un conector sintético que permite que se conviertan en una única cadena de proteína, en la que la pareja de regiones V_L y V_H forma moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenarios (Fvmc); véase, por ejemplo, Bird, *et al.* (1988), *Science*, 242:423-426; y Huston, *et al.* (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883). Dichos anticuerpos monocatenarios también pretenden ser incluidos dentro de la expresión "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen empleando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan por su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

45 Tal como se emplea en la presente, puede utilizarse cualquier forma del "antígeno" para generar un anticuerpo que es específico de 161P2F10B. Así, el antígeno inductor puede ser un único epitopo, múltiples epitopos o la proteína completa por sí sola o en combinación con uno o más agentes potenciadores de la inmunogenicidad conocidos en la técnica. El antígeno inductor puede ser una proteína de longitud completa aislada, una proteína de la superficie celular (por ejemplo, inmunizando con células transfectadas con al menos una porción del antígeno), o una proteína soluble (por ejemplo, inmunizando solo con la porción de dominio extracelular de la proteína). El antígeno puede ser producido en una célula genéticamente modificada. El ADN que codifica el antígeno puede ser genómico o no genómico (por ejemplo, ADNc) y codificar al menos una porción del dominio extracelular. Tal como se emplea en la presente, el término "porción" se refiere al número mínimo de aminoácidos o ácidos nucleicos, según sea apropiado, que constituyen un epitopo inmunogénico del antígeno de interés. Puede emplearse cualquier vector genético adecuado para la transformación de las células de interés, que incluyen, pero no se limitan a vectores adenovíricos, plásmidos y vectores no víricos, tales como lípidos catiónicos. En una realización, el anticuerpo de los métodos y las composiciones de la presente se unen específicamente al menos a una porción del dominio extracelular de la 161P2F10B de interés.

60 Los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno proporcionados en la presente pueden ser conjugados con un "agente bioactivo". Tal como se emplea en la presente, la expresión "agente bioactivo" se refiere a cualquier compuesto sintético o natural que se une al antígeno y/o potencia o media en un efecto biológico deseado para potenciar toxinas que destruyen células. En una realización, los fragmentos de unión útiles en la presente invención son fragmentos biológicamente activos. Tal como se emplea en la presente, la expresión "biológicamente activo" se refiere a un anticuerpo o a un fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse al epitopo antigénico deseado y

ejerce, directa o indirectamente, un efecto biológico. Los efectos directos incluyen, pero no se limitan a la modulación, la estimulación y/o la inhibición de una señal de crecimiento, la modulación, la estimulación y/o la inhibición de una señal antiapoptótica, la modulación, la estimulación y/o la inhibición de una señal apoptótica o necrótica, la modulación, la estimulación y/o la inhibición de la cascada de ADCC, y la modulación, la estimulación y/o la inhibición de la cascada de CDC.

Los anticuerpos monoclonales de la presente incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos”, en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondiente secuencias en anticuerpos derivados de una especie concreta o que pertenecen a una clase o subclase concreta de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas son idénticas u homólogas a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, con la condición de que se unan específicamente al antígeno diana y/o que muestren la actividad biológica deseada (la patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)).

La expresión “agente quimioterapéutico” se refiere a todos los compuestos químicos que son eficaces para inhibir el crecimiento tumoral. Los ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes; por ejemplo, gases mostaza, compuestos de etilenimina y sulfonatos de alquilo; antimetabolitos, por ejemplo, ácido fólico, antagonistas de purina o pirimidina; inhibidores mitóticos, por ejemplo, agentes antitubulina, tales como vinca-alcaloides, auristatinas y derivados de podofilotoxina; antibióticos citotóxicos; compuestos que dañan o interfieren con la expresión o la replicación del ADN, por ejemplo, ligantes del surco menor del ADN; y antagonistas del receptor del factor de crecimiento. Además, los agentes quimioterapéuticos incluyen agentes citotóxicos (según se definen en la presente), anticuerpos, moléculas biológicas y moléculas pequeñas.

El término “compuesto” se refiere e incluye el propio compuesto químico, y también, tanto si indica explícitamente como si no, y a menos que el contexto indique claramente que deben excluirse, los siguientes: formas amorfas y cristalinas del compuesto, que incluyen las formas polimórficas, en las que estas formas pueden ser parte de una mezcla o estar aisladas; formas de ácido libre y base libre del compuesto, que generalmente son las formas mostradas en las estructuras proporcionadas en la presente; isómeros del compuesto, que se refieren a isómeros ópticos e isómeros tautoméricos, en los que los isómeros ópticos incluyen enantiómeros y diastereómeros, isómeros quirales e isómeros no quirales, y los isómeros ópticos incluyen isómeros ópticos aislados, así como mezclas de isómeros ópticos que incluyen mezclas racémicas y no racémicas; en los que un isómero puede estar en forma aislada o mezclado con uno o más isómeros distintos; isótopos del compuesto, que incluyen compuestos que contienen deuterio y tritio, e incluyen compuestos que contiene radioisótopos, que incluyen radioisótopos terapéutica y diagnósticamente eficaces; formas multiméricas del compuesto, que incluyen formas diméricas, triméricas, etc.; sales del compuesto, preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables, que incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases, que incluyen sales que incluyen contraiones orgánicos y contraiones inorgánicos, y que incluyen formas bipolares, en los que si un compuesto está asociado con dos o más contraiones, dichos dos o más contraiones pueden ser iguales o diferentes; y solvatos del compuesto, que incluyen hemisolvatos, monosolvatos, disolvatos, etc., que incluyen solvatos orgánicos y solvatos inorgánicos, y dichos solvatos inorgánicos incluyen hidratos; en los que si un compuesto está asociado con dos o más moléculas de disolvente, dichas dos o más moléculas de disolvente pueden ser iguales o diferentes. En algunos casos, la referencia en la presente a un compuesto de la invención incluirá una referencia explícita a una o más de las anteriores formas, por ejemplo, sales y/o solvatos, aunque esta referencia se emplea solo para enfatizar y no debe considerarse que excluya otras de las formas anteriores, según se han identificado anteriormente.

La expresión “agente citotóxico” se refiere a una sustancia que inhibe o evita la actividad de expresión de las células, la función de las células y/o provoca la destrucción de células. La expresión pretende incluir isótopos radiactivos, agentes quimioterapéuticos y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, que incluyen sus fragmentos y/o variantes. Los ejemplos de agentes citotóxicos pueden incluir, pero no se limitan a auristatinas (por ejemplo, auristatina e, auristatina f, MMAE y MMAF), auromicinas, maitansinoides, ricina, cadena de ricina A, combretastatina, duocarmicinas, dolastatinas, doxorubicina, daunorubicina, taxoles, cisplatino, cc1065, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxiantracindiona, actinomicina, toxina de la difteria, exototoxina (PE) A de *Pseudomonas*, PE40, abrina, cadena de abrina A, cadena de modicina A, alfa-sarcina, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, caliqueamicina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, y glucocorticoides y otros agentes quimioterapéuticos, así como radioisótopos, tales como At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} o Bi^{213} , P^{32} e isótopos radiactivos de Lu, que incluyen Lu^{177} . Los anticuerpos también pueden conjugarse con enzimas activadores de profármacos anticáncer capaces de convertir el profármaco en su forma activa.

El término “mermar”, en el contexto del efecto de un agente de unión a 161P2F10B sobre las células que expresan 161P2F10B, se refiere a una reducción en el número o la eliminación de las células que expresan 161P2F10B.

El “producto génico” se emplea en la presente para indicar un péptido/proteína o un ARNm. Por ejemplo, un “producto génico de la invención” a veces se denomina en la presente una “secuencia de aminoácidos del cáncer”, “proteína del cáncer”, “proteína del cáncer listada en la tabla I”, un “ARNm de cáncer”, “ARNm de un cáncer listado

en la tabla I”, etc. En una realización, la proteína del cáncer es codificada por un ácido nucleico de la figura 1. La proteína del cáncer puede ser un fragmento o, como alternativa, ser la proteína de longitud completa codificada por los ácidos nucleicos de la figura 1. En una realización, se emplea una secuencia de aminoácidos del cáncer para determinar la identidad o la similitud de la secuencia. En otra realización, las secuencias son variantes alélicas naturales de una proteína codificada por un ácido nucleico de la figura 1. En otras realizaciones, las secuencias son variantes de secuencia, tal como se describe también en la presente.

Los anticuerpos “heteroconjugados” son útiles en los presentes métodos y composiciones. Tal como se emplea en la presente, la expresión “anticuerpo heteroconjugado” se refiere a dos anticuerpos unidos covalentemente. Estos anticuerpos pueden prepararse empleando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, que incluyen el empleo de agentes de entrecruzamiento. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980.

El término “homólogo” se refiere a una molécula que muestra homología con otra molécula, por ejemplo, presentando secuencias de restos químicos que son iguales o similares en las correspondientes posiciones.

En una realización, el anticuerpo proporcionado en la presente es un “anticuerpo humano”. Tal como se emplea en la presente, la expresión “anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo en el que, fundamentalmente, las secuencias completas de la cadena ligera y las secuencias de la cadena pesada, que incluyen las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), proceden de genes humanos. En una realización, se preparan anticuerpos monoclonales humanos mediante la técnica del trioma, la técnica de células B humanas (véase, por ejemplo, Kozbor, *et al.*, *Immunol. Today*, 4: 72 (1983), la técnica de la transformación con EBV (véase, por ejemplo, Cole, *et al.*, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, 77-96 (1985)), o empleando la presentación con fagos (véase, por ejemplo, Marks, *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). En una realización específica, el anticuerpo humano se genera en un ratón transgénico. Las técnicas para fabricar dichos anticuerpos parcial o totalmente humanos son conocidas en la técnica y cualquiera de dichas técnicas puede utilizarse. Según una realización particularmente preferida, las secuencias de anticuerpos totalmente humanos se fabrican en un ratón transgénico modificado para que exprese genes de cadena pesada y ligera de anticuerpos humanos. Un ejemplo de descripción de la preparación de ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos se encuentra en la solicitud n.º WO02/43478 y la patente de EE. UU. n.º 6.657.103 (Abgenix) y su progenie. Las células B procedentes de ratones transgénicos que producen el anticuerpo deseado después pueden condensarse para obtener líneas de células de hibridoma para la producción continua del anticuerpo. Véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; y 5.545.806; y Jakobovits, *Adv. Drug Del. Rev.*, 31:33-42 (1998); Green, *et al.*, *J. Exp. Med.*, 188:483-95 (1998).

Los términos “inhibir” o “inhibición de”, tal como se emplean en la presente, significan reducir en una cantidad mensurable o evitar completamente.

Los “marcadores” adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las patentes que indican el uso de dichos marcadores incluyen las patentes de EE. UU. n.ºs 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241. Además, los anticuerpos proporcionados en la presente también pueden ser útiles como componente de unión al antígeno de fluorocuerpos. Véase, por ejemplo, Zeytun, *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 21:1473-79 (2003).

Las expresiones “cáncer metastásico” y “enfermedad metastásica” significan cánceres que se han extendido hasta nódulos linfáticos regionales o hasta sitios distantes, y pretenden incluir la enfermedad en estadio D según el sistema de AJA y el estadio T×N×M+ según el sistema de TNM.

El término “modulador” o las expresiones “compuesto de ensayo” o “candidato a fármaco” o sus equivalentes gramaticales, tal como se emplean en la presente, describen cualquier molécula, por ejemplo, proteína, oligopéptido, molécula orgánica pequeña, polisacárido, polinucleótido, etc., que se va a ensayar para determinar su capacidad para alterar, directa o indirectamente, el fenotipo de cáncer o la expresión de una secuencia de cáncer, por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos o de proteínas, o los efectos de secuencias de cáncer (por ejemplo, la señalización, la expresión génica, la interacción de proteínas, etc.). En un aspecto, un modulador neutralizará el efecto de una proteína del cáncer de la invención. “Neutralizar” significa que una actividad de una proteína es inhibida o bloqueada, junto con el efecto consiguiente sobre la célula. En otro aspecto, un modulador neutralizará el efecto de un gen, y su correspondiente proteína, de la invención, normalizando los niveles de dicha proteína. En realizaciones preferidas, los moduladores alteran los perfiles de expresión, o el perfil de expresión de ácidos nucleicos o proteínas proporcionadas en la presente, o vías efectoras cadena abajo. En una realización, el modulador suprime un fenotipo de cáncer, por ejemplo, hasta una huella digital de tejido normal. En otra realización, un modulador induce un fenotipo de cáncer. En general, una pluralidad de mezclas de ensayo se ensayan en paralelo con diferentes concentraciones de agente para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Generalmente, una de estas concentraciones actúa como control negativo, es decir, a concentración cero o por debajo del nivel de detección.

Los moduladores, candidatos a fármaco o compuestos de ensayo incluyen numerosas clases químicas, aunque generalmente son moléculas orgánicas, preferiblemente compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso

molecular mayor que 100 y menor que aproximadamente 2.500 Daltons. Las moléculas pequeñas preferidas son menores que 2000, o menores que 1500 o menores que 1000 o menores que 500 D. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, en particular con enlaces de hidrógeno, y generalmente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos a menudo comprenden estructuras cíclicas de carbono o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los anteriores grupos funcionales. Los moduladores también comprenden biomoléculas, tales como péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, sus derivados, análogos estructurales o combinaciones. Se prefieren en particular los péptidos. Una clase de moduladores son los péptidos, por ejemplo, de aproximadamente cinco a aproximadamente 35 aminoácidos, siendo preferido de aproximadamente cinco a aproximadamente 20 aminoácidos, y siendo particularmente preferido de aproximadamente 7 a aproximadamente 15. Preferiblemente, la proteína moduladora del cáncer es soluble, incluye una región no transmembrana y/o tiene una Cys N-terminal para ayudar a la solubilidad. En una realización, el C-terminal del fragmento se mantiene como un ácido libre, y el N-terminal es una amina libre para ayudar al acoplamiento, concretamente, con cisteína. En una realización, una proteína del cáncer de la invención se conjuga con un agente inmunogénico, tal como se analiza en la presente. En una realización, la proteína del cáncer se conjuga con BSA. Los péptidos de la invención, por ejemplo, de longitudes preferidas, pueden conectarse entre sí o con otros aminoácidos para crear un péptido/proteína más largo. Los péptidos moduladores pueden ser digeridos de proteínas naturales, tal como se indicó anteriormente, péptidos aleatorios o péptidos aleatorios "sesgados". En una realización preferida, los moduladores basados en péptidos/proteínas son anticuerpos, y sus fragmentos, tal como se definen en la presente.

La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se emplea en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades muy pequeñas. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un único epítipo antigénico. Por contraste, las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) incluyen una multitud de anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopos (o específicos de diferentes epítopos). En una realización, el anticuerpo policlonal contiene una pluralidad de anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de epítipo, afinidades o avidedces dentro de un único antígeno que contiene múltiples epítopos antigénicos. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo, que es obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe considerarse que requiera producir el anticuerpo mediante ningún método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a utilizar según la presente invención pueden fabricarse mediante el método del hibridoma, descrito por primera vez por Kohler, *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), o pueden fabricarse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de bancos de anticuerpos de fagos empleando técnicas descritas en Clackson, *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991), y Marks, *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo. Estos anticuerpos monoclonales habitualmente se unen con una Kd de al menos aproximadamente 1 µM, de modo más habitual de al menos aproximadamente 300 nM, generalmente de al menos aproximadamente 30 nM, preferiblemente de al menos aproximadamente 10 nM, más preferiblemente de al menos aproximadamente 3 nM o mejor, que habitualmente se determina mediante ELISA.

Un "excipiente farmacéutico" comprende un material, tal como un adyuvante, un vehículo, agentes tamponantes y de ajuste del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, conservantes y similares.

"Farmacéuticamente aceptable" se refiere a una composición no tóxica e inerte que es fisiológicamente compatible con los seres humano u otros mamíferos.

El término "polinucleótido" significa una forma polimérica de nucleótidos con una longitud de al menos 10 bases o pares de base, y son ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquiera de estos tipos de nucleótidos, y pretende incluir las formas monocatenarias y bicatenarias de ADN y/o ARN. En la técnica, este término a menudo se emplea de modo intercambiable con "oligonucleótido". Un polinucleótido puede comprender una secuencia de nucleótidos descrita en la presente, en la que la timidina (T), tal como se muestra, por ejemplo, en la figura 1, también puede ser uracilo (U); esta definición se refiere a las diferencias entre las estructuras químicas del ADN y ARN, en particular la observación de que una de las cuatro bases principales en el ARN es uracilo (U) en lugar de timidina (T).

El término "polipéptido" significa un polímero de al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, u 8 aminoácidos. A lo largo de esta memoria descriptiva, se emplean las denominaciones convencionales de tres letras o de una sola letra para los aminoácidos. En la técnica, este término a menudo se emplea de modo intercambiable con "péptido" o "proteína".

Una molécula de ADN o ARN "recombinante" es una molécula de ADN o ARN que se ha sometido a una manipulación molecular *in vitro*.

Tal como se emplea en la presente, el término "específico" y la expresión "se une específicamente" se refieren a la unión selectiva del anticuerpo al epítipo del antígeno diana. Los anticuerpos pueden ensayarse para su especificidad de unión comparando la unión al antígeno apropiado con la unión a un antígeno o una mezcla de antígenos irrelevante bajo un conjunto de condiciones dadas. Si el anticuerpo se une al antígeno apropiado al menos

2, 5, 7, y preferiblemente 10 veces más que al antígeno o mezcla de antígenos irrelevante, entonces se considera que es específico. En una realización, un anticuerpo específico es un anticuerpo que se une al antígeno relacionado con 161P2F10B (en particular 161P2F10B), pero no se une al antígeno irrelevante.

5 Tal como se emplea en la presente “tratar” o “terapéutico” y los términos relacionados gramaticalmente se refieren a cualquier mejora de cualquier consecuencia de una enfermedad, tal como una supervivencia prolongada, menos morbilidad y/o una disminución de los efectos secundarios que son las consecuencias de una modalidad terapéutica alternativa; tal como se apreciará en la técnica, se prefiere la erradicación total de la enfermedad, aunque no es un requisito para un acto de tratamiento.

10 Las “proteínas relacionadas con 161P2F10B” incluyen las identificadas específicamente en la presente (véase la figura 1), así como los variantes alélicos, variantes de sustitución conservativa, análogos y homólogos que puedan aislarse/generarse y caracterizarse sin experimentación indebida siguiendo los métodos indicados en la presente o que se encuentran fácilmente disponibles en la técnica. También se incluyen las proteínas de fusión que combinan partes de diferentes proteínas 161P2F10B o sus fragmentos, así como proteínas de fusión de una proteína 161P2F10B y un polipéptido heterólogo. Estas proteínas 161P2F10B se indican colectivamente como proteínas 15 relacionadas con 161P2F10B, las proteínas de la invención o 161P2F10B. La expresión “proteína relacionada con 161P2F10B” se refiere a un fragmento de polipéptido o una secuencia de proteína 161P2F10B de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más de 25 aminoácidos; o al menos 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 330, 335, 339 o más aminoácidos.

20 Anticuerpos de 161P2F10B

Los anticuerpos para los ADC de la invención se unen específicamente a una proteína 161P2F10B y no se unen (o se unen débilmente) a péptidos o proteínas que no son proteínas relacionadas con 161P2F10B bajo condiciones fisiológicas.

25 En la técnica se conocen diversos métodos para la preparación de anticuerpos, específicamente anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, los anticuerpos pueden prepararse inmunizando un hospedante mamífero adecuado empleando una proteína o un péptido relacionado con 161P2F10B, o uno de sus fragmentos, en forma aislada o inmunoconjugada (*Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press, eds., Harlow y Lane (1988); Harlow, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Además, también pueden emplearse proteínas de fusión de 161P2F10B, tal como una proteína de fusión de GST 161P2F10B. En una realización particular, se produce una proteína de fusión 30 de GST que comprende toda o la mayor parte de la secuencia de aminoácidos de la figura 1, y después se emplea como inmunógeno para generar anticuerpos apropiados. En otra realización, una proteína relacionada con 161P2F10B se sintetiza y se emplea como inmunógeno.

Además, se emplean técnicas de inmunización con ADN desnudo conocidas en la técnica (con o sin proteína relacionada con 161P2F10B purificada o células que expresan 161P2F10B) para generar una respuesta 35 inmunológica contra el inmunógeno codificado (para un análisis, véase Donnelly, *et al.*, 1997, *Ann. Rev. Immunol.*, 15:617-648).

40 La secuencia de aminoácidos de una proteína 161P2F10B, tal como se muestra en la figura 1, puede analizarse para seleccionar regiones específicas de la proteína 161P2F10B para generar anticuerpos. Por ejemplo, se emplean análisis de hidrofobicidad e hidrofiliidad de una secuencia de aminoácidos de 161P2F10B para identificar regiones hidrófilas en la estructura de 161P2F10B. Las regiones de una proteína 161P2F10B que muestran una estructura inmunogénica, así como otras regiones y dominios, pueden identificarse con facilidad empleando diversos otros métodos conocidos en la técnica, tal como los análisis de Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz o Jameson-Wolf. Pueden generarse perfiles de hidrofiliidad empleando el método de Hopp, T. P. y Woods, K. R., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78:3824-3828. Pueden generarse perfiles de hidropaticidad 45 empleando el método de Kyte, J. y Doolittle, R. F., 1982, *J. Mol. Biol.*, 157:105-132. Pueden generarse perfiles de porcentaje (%) de restos accesibles empleando el método de Janin J., 1979, *Nature*, 277:491-492. Pueden generarse perfiles de promedio de flexibilidad empleando el método de Bhaskaran R., Ponnuswamy P. K., 1988, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 32:242-255. Pueden generarse perfiles de vueltas beta empleando el método de Deleage, G., Roux B., 1987, *Protein Engineering*, 1:289-294. Así, cada región identificada cualquiera de estos programas o métodos está dentro del alcance de la presente invención. Los métodos preferidos para la generación 50 de anticuerpos 161P2F10B se ilustran más a fondo mediante los ejemplos proporcionados en la presente. Los métodos para preparar una proteína o un polipéptido para su uso como inmunógeno son muy conocidos en la técnica. En la técnica también se conocen métodos para preparar conjugados inmunogénicos de una proteína con un portador, tal como BSA, KLH u otra proteína portadora. En algunas circunstancias, se emplea la conjugación directa empleando, por ejemplo, reactivos de carbodiimida; en otros casos, resultan eficaces reactivos conectores, tales como los suministrados por Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. La administración de un inmunógeno de 161P2F10B a menudo se realiza mediante una inyección a lo largo de un periodo de tiempo adecuado con el uso de un adyuvante adecuado, tal como se conoce en la técnica. Durante el programa de inmunización, se van tomando 55 titulaciones de los anticuerpos para determinar la formación adecuada de los anticuerpos.

En una realización preferida, un MAb de 161P2F10B para los ADC de la invención comprende regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo denominado H16-7.8 (véase la figura 3), o regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas con las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera de H16-7.8, y en el que los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas (en particular la actividad de unión con 161P2F10B) de los MAb de 161P2F10B de la invención. La región variable de cadena pesada de H16-7.8 consiste en la secuencia de aminoácidos que abarca desde el 20º resto Q al 142º resto S de SEQ ID NO:7, y la región variable de cadena ligera de H16-7.8 que consiste en la secuencia de aminoácidos que abarca desde el 20º resto E hasta el 127º resto R de SEQ ID NO:8. Como región constante del anticuerpo de la invención, puede elegirse cualquier subclase de la región constante. Preferiblemente, puede emplearse la región constante de IgG2 humana como región constante de cadena pesada, y puede emplearse la región constante kappa de Ig humana como región constante de cadena ligera. La reactividad (actividad de unión) de los MAb de 161P2F10B con una proteína 161P2F10B puede establecerse por medio de una serie de medios muy conocidos, que incluyen los análisis de transferencia Western, de inmunoprecipitación, de ELISA y de FACS empleando proteínas 161P2F10B, células que expresan 161P2F10B o sus extractos.

En una realización, la región de bisagra de CH1 se modifica de modo que se altera, por ejemplo, se aumenta o se disminuye, el número de restos cisteína en la región de bisagra. Esta estrategia se describe más a fondo en la patente de EE. UU. n.º 5.677.425 de Bodmer, *et al.* El número de restos cisteína en la región de bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada o para aumentar o disminuir la estabilidad del MAb de 161P2F10B.

En otra realización, la región de bisagra de Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del MAb de 161P2F10B. De modo más específico, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de interfase del dominio CH2-CH3 del fragmento de Fc-bisagra, de modo que el anticuerpo presenta una unión alterada a la proteína A estafilocócica (SpA) con relación a la unión a SpA del dominio de Fc-bisagra nativo. Esta estrategia se describe con más detalle en la patente de EE. UU. n.º 6.165.745 de Ward, *et al.*

En otra realización, el MAb de 161P2F10B se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversas estrategias. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 6.277.375 de Ward. Como alternativa, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o CL para que contenga un epitopo de unión al receptor de reciclaje obtenido de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, tal como se describe en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.869.046 y 6.121.022 de Presta, *et al.*

En otras realizaciones, la región Fc se altera reemplazando al menos un resto aminoácido por un resto aminoácido diferente para alterar la función o funciones efectoras del MAb de 161P2F10B. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de restos aminoácidos específicos pueden ser reemplazados por un resto aminoácido diferente, de modo que el anticuerpo presenta una afinidad alterada por un ligando efector, pero conserva la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo de origen. El ligando efector cuya afinidad se altera puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Esta estrategia se describe con más detalle en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter, *et al.*

En una realización, el anticuerpo para ADC de la presente invención se produce por medios recombinantes conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede producirse un anticuerpo recombinante transfectando una célula hospedante con un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica el anticuerpo. Pueden emplearse uno o más vectores para transfectar la secuencia de ADN que expresa al menos una región VL y una región VH en la célula hospedante. Los ejemplos de descripciones de medios recombinantes para la generación y la producción de anticuerpos incluyen Delves, *ANTIBODY PRODUCTION: ESSENTIAL TECHNIQUES* (Wiley, 1997); Shephard, *et al.*, *Monoclonal Antibodies* (Oxford University Press, 2000); Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles And Practice* (Academic Press, 1993); *Current Protocols In Immunology* (John Wiley & Sons, edición más reciente).

Los expertos en la técnica pueden preparar con facilidad el anticuerpo para ADC de la presente invención basándose en la información de la secuencia de su región variable de cadena pesada y su región variable de cadena ligera descrita en la presente, empleando un método que se conoce habitualmente en la técnica. De modo específico, se prepara un fragmento de gen de región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de bases que codifica un aminoácido de la región variable de cadena pesada del anticuerpo para ADC de la presente invención (SEQ ID NO:7, desde 20 a 142), y un fragmento de gen de región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de bases que codifica un aminoácido de la región variable de cadena ligera del anticuerpo para ADC de la presente invención (SEQ ID NO:8, desde 20 a 127). Después, los genes de las regiones variables se unen a un gen de la región constante en un anticuerpo humano de la clase apropiada para preparar un gen de anticuerpo. Después, este gen de anticuerpo se une a un vector de expresión apropiado y se introduce en una célula cultivada. Por último, esta célula cultivada se cultiva, tras lo cual el anticuerpo puede obtenerse del sobrenadante del cultivo.

Cada uno de los fragmentos de genes de la región variable descritos anteriormente que codifican la región variable de cadena pesada y de cadena ligera del anticuerpo de la presente invención (SEQ ID NO:7, desde 20 a 142, y SEQ ID NO:8, desde 20 a 127) puede prepararse basándose en las secuencias de bases diseñadas basándose en las

secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera (SEQ ID NO:7, desde 20 a 142, y SEQ ID NO:8, desde 20 a 127), o basándose en las secuencias de bases de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera del anticuerpo de la presente invención mostradas en SEQ ID NO:4, desde 91 a 459, y SEQ ID NO:6, desde 100 a 423, empleando un método de síntesis de genes conocido en la técnica. Como dicho método de síntesis de genes, pueden utilizarse diversos métodos evidentes para los expertos en la técnica, tales como el método de síntesis de genes de anticuerpos descrito en el documento WO90/07861. Después, los fragmentos de genes de la región variable descritos anteriormente y el gen de la región constante del anticuerpo humano se unen para preparar un gen de anticuerpo. Aunque puede elegirse cualquier subclase de región constante como la región constante del anticuerpo humano utilizada, pueden emplearse preferiblemente Ig[gamma]2 humana como la región constante de cadena pesada, e Ig[kappa] humana como la región constante de cadena ligera.

Como el gen de la cadena pesada de anticuerpo preferible del anticuerpo para los ADC de la presente invención, obtenido uniendo el gen de la región variable de cadena pesada mostrado en SEQ ID NO:7, desde 20 a 142, y el gen de la región constante de cadena pesada de Ig[gamma]2 humana, puede mencionarse un gen que comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:7, desde 20 a 468, más preferiblemente un gen que comprende la secuencia de bases mostrada en SEQ ID NO:4, desde 91 a 1437. Como el gen de la cadena ligera de anticuerpo preferible del anticuerpo para los ADC de la presente invención, obtenido uniendo el gen de la región variable de cadena ligera mostrado en SEQ ID NO:8, desde 20 a 127, y el gen de la región constante de cadena ligera de Ig[kappa] humana, puede mencionarse un gen que comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:8, desde 20 a 233, más preferiblemente un gen que comprende la secuencia de bases mostrada en SEQ ID NO:6, desde 100 a 741. Como el anticuerpo para los ADC de la presente invención, codificado por un gen de cadena pesada que comprende la secuencia de bases mostrada en SEQ ID NO:4, desde 91 a 1437, y el gen de cadena ligera que comprende la secuencia de bases mostrada en SEQ ID NO:6, desde 100 a 741, puede mencionarse H16-7.8, descrito en el siguiente ejemplo.

Después de la preparación de este gen de anticuerpo, la introducción del gen de anticuerpo en un vector de expresión, la introducción del vector de expresión en células cultivadas, el cultivo de las células cultivadas, la purificación del anticuerpo y similares, pueden realizarse empleando diversos métodos conocidos en la técnica. El vector de expresión no está sometido a ninguna limitación, con la condición de que sea capaz de expresar el gen de anticuerpo. Se prefiere utilizar un vector de expresión que ya contenga un gen de la región constante de Ig humana, tal como AG-[gamma]2 o AG-[kappa], porque se convertirá en un vector de expresión que contenga el gen de anticuerpo simplemente cuando el gen de la región variable del anticuerpo se inserte en él.

El vector de expresión descrito anteriormente se introduce en las células cultivadas, por ejemplo, mediante el método del fosfato de calcio y similares. Como ejemplos de las células cultivadas en las que se introduce el vector de expresión, pueden emplearse células cultivadas, tales como células CHO, y estas pueden cultivarse mediante un método convencional. Después del cultivo descrito anteriormente, el anticuerpo acumulado en el sobrenadante del cultivo puede purificarse, por ejemplo, mediante diversas cromatografías que emplean una columna de proteína A.

La reactividad (actividad de unión) de los anticuerpos de 161P2F10B obtenidos de esta manera con una proteína 161P2F10B puede establecerse por medio de una serie de medios muy conocidos, que incluyen los análisis de transferencia Western, de inmunoprecipitación, de ELISA y de FACS empleando, según sea apropiado, proteína 161P2F10B, células que expresan 161P2F10B o sus extractos. El anticuerpo obtenido de este modo, o un fragmento de anticuerpo que conserve la actividad debida al anticuerpo después de ser purificado según sea necesario, puede prepararse como un anticuerpo para ADC. Un anticuerpo de 161P2F10B, o uno de sus fragmentos, puede marcarse con un marcador detectable o puede conjugarse con una segunda molécula. Los marcadores detectables adecuados incluyen, pero no se limitan a un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelante de metales o una enzima. Además, se generan anticuerpos biespecíficos para dos o más epitopos de 161P2F10B empleando métodos conocidos en la técnica. También pueden generarse anticuerpos homodiméricos mediante técnicas de entrecruzamiento conocidas en la técnica (por ejemplo, Wolff, *et al.*, *Cancer Res.*, 53:2560-2565).

En otra realización preferida, el MAb de 161P2F10B para ADC de la invención es un anticuerpo que comprende una cadena pesada y ligera de un anticuerpo denominado H16-7.8. La cadena pesada de H16-7.8 consiste en la secuencia de aminoácidos que abarca desde el 20° resto Q al 468° resto K de SEQ ID NO:7, y la cadena ligera de H16-7.8 que consiste en la secuencia de aminoácidos que abarca desde el 20° resto E hasta el the 233° resto C de la secuencia de SEQ ID NO:8. Estas secuencias se indican en la figura 2 y la figura 3. En una realización preferida, H16-7.8 se conjuga con un agente citotóxico.

Generalidades de los conjugados de fármaco y anticuerpo

En otro aspecto, la invención proporciona conjugados de fármaco y anticuerpo ("antibody drug conjugates", ADC) que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, tal como MMAF. En otro aspecto, la invención proporciona además métodos para utilizar los ADC. En un aspecto, un ADC comprende cualquiera de los MAb de 161P2F10B anteriores unido covalentemente a un agente citotóxico.

El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir 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; la patente de EE. UU. n.º 4,975,278) permite el transporte dirigido del resto de fármaco hasta tumores y su acumulación intracelular en ellos, mientras que la administración sistémica de estos agentes de fármaco no conjugados puede provocar unos niveles inaceptables de toxicidad para las células normales y también para las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin, *et al.* (1986), *Lancet* (15 de marzo, 1986), pp. 603-05; Thorpe (1985), "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera, *et al.* (eds.), pp. 475-506). Con ello se intenta conseguir una eficacia máxima con una toxicidad mínima. Se ha indicado que los anticuerpos policlonales y los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland, *et al.* (1986), *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Los fármacos empleados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland, *et al.* (1986), *supra*). Las toxinas empleadas en los conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas, tales como la toxina de la difteria, toxinas vegetales, tales como ricina, toxinas de molécula pequeña, tales como geldanamicina (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 ejercer sus efectos citotóxicos y citostáticos por medio de mecanismos que incluyen la unión a la tubulina, la unión al ADN o la inhibición de topoisomerasas. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos de receptores de proteínas.

Los ejemplos de conjugado de fármaco y anticuerpo son ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetano, Biogen/Idec), que es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal kappa de IgG1 murino dirigido contra el antígeno de CD20 que se encuentra sobre la superficie de linfocitos B normales y malignos, y el radioisótopo ¹¹¹In o ⁹⁰Y unido a través de 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).

Además, MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de fármaco y anticuerpo compuesto de un anticuerpo hu CD33 unido a caliqueamicina, fue aprobado en 2000 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda mediante inyección (*Drugs of the Future* (2000), 25(7):686; las patentes de EE. UU. n.ºs 4.970.198; 5.079.233; 5.585.089; 5.606.040; 5.693.762; 5.739.116; 5.767.285; y 5.773.001).

Además, cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de fármaco y anticuerpo compuesto del anticuerpo huC242 unido a través de un conector de disulfuro SPP al resto de fármaco de maitansinoide DM1, está avanzando hacia ensayos de fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como de colon, pancreáticos, gástricos y otros.

Además, MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de fármaco y anticuerpo compuesto del anticuerpo monoclonal anti-antígeno de membrana específico de próstata ("prostate specific membrane antigen", PSMA) unido al resto de fármaco de maitansinoide DM1, está desarrollándose para el tratamiento potencial de tumores de próstata.

Por último, los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, fueron conjugados con Iso anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específico de Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico de CD30 en malignidades hematológicas) (Doronin, *et al.* (2003), *Nature Biotechnology*, 21(7):778-784) y están en desarrollo terapéutico.

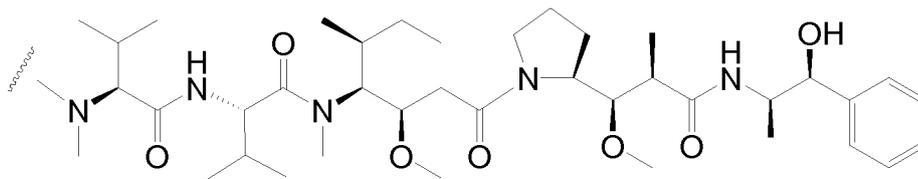
III(A). Auristatinas y dolostatinas

Se ha demostrado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (Woyke, *et al.* (2001), *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 45(12):3580-3584) y poseen actividad anticáncer (la patente de EE. UU. n.º 5.663.149) y antifúngica (Pettit, *et al.* (1998), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42:2961-2965). El resto de fármaco de dolastatina o auristatina puede unirse al anticuerpo a través del N-terminal (amino) o el C-terminal (carboxilo) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172).

Los ejemplos de realizaciones de auristatina incluyen los restos de fármaco de monometilauristatina unidos al N-terminal DE y DF, descritos en Senter, *et al.*, "Proceedings of the American Association for Cancer Research", volumen 45, resumen n.º 623, y presentado el 28 de marzo de 2004.

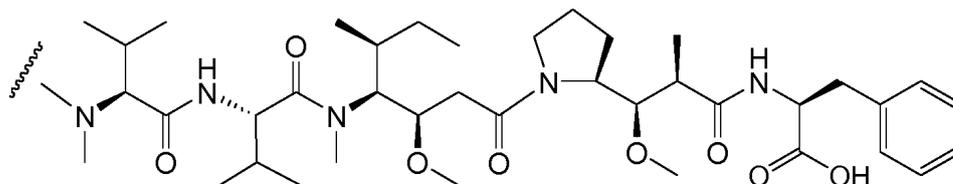
Un ejemplo de realización de auristatina es MMAE (en la que la línea ondulada indica la unión covalente a un conector (L) de un conjugado de fármaco y anticuerpo).

55



MMAE

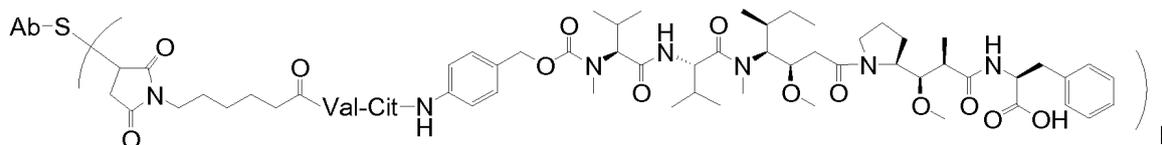
Otro ejemplo de realización de auristatina es MMAF, en la que la línea ondulada indica la unión covalente a un conector (L) de un conjugado de fármaco y anticuerpo (documento US 2005/0238649):



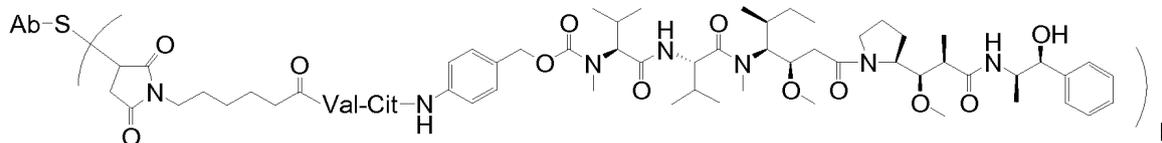
MMAF

Otros ejemplos de realizaciones que comprenden MMAE o MMAF y diversos componentes conectores (descritos más a fondo en la presente) tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (en las que Ab significa anticuerpo, y p es de 1 a aproximadamente 12):

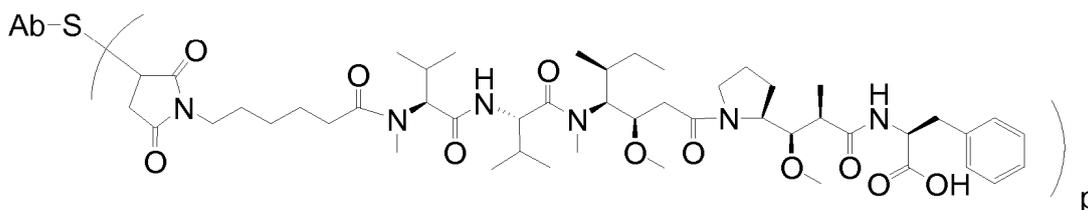
5



Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAF

El ADC de la presente invención incluye MMAF. En la realización preferida, el ADC de la presente invención incluye maleimidocaproilo (mc) como conector, y MMAF como fármaco.

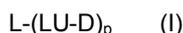
Compuestos de conjugados de fármaco y anticuerpo que se unen a 161P2F10B

10

La presente invención proporciona, entre otros, compuestos de conjugados de fármaco-anticuerpo para el transporte dirigido de fármacos. Los inventores han descubierto que los compuestos conjugados de fármaco-anticuerpo tienen una potente actividad citotóxica y/o citostática contra células que expresan 161P2F10B. Los compuestos de conjugados de fármaco-anticuerpo comprenden una unidad de anticuerpo unida covalentemente al menos a una unidad de fármaco. Las unidades de fármaco se unen covalentemente a través de una unidad de conector ("linker unit", -LU-).

15

En algunas realizaciones, el compuesto de conjugado de fármaco y anticuerpo tiene la siguiente fórmula:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o solvatos, en la que:

L es la unidad de anticuerpo, por ejemplo, MAb de 161P2F10B de la presente invención, y

(LU-D) es un resto de unidad de conector-unidad de fármaco, en la que:

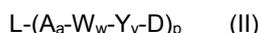
5 LU- es una unidad de conector, y

-D es una unidad de fármaco que tiene actividad citostática o citotóxica contra una célula diana; y

p es un número entero de 1 a 20.

10 En algunas realizaciones, p varía de 1 a 12, de 1 a 10, de 1 a 9, de 1 a 8, de 1 a 7, de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, o de 1 a 2. En algunas realizaciones, p varía de 2 a 10, de 2 a 9, de 2 a 8, de 2 a 7, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4 o de 2 a 3. En otras realizaciones, p es 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En algunas realizaciones, p es 2 o 4.

En algunas realizaciones, el compuesto de conjugado de fármaco y anticuerpo tiene la siguiente fórmula:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o solvatos, en la que:

L es la unidad de anticuerpo, por ejemplo, MAb de 161P2F10B; y

15 -A_a-W_w-Y_y- es una unidad de conector (LU), en la que:

-A- es una unidad alargadora,

a es 0 o 1,

cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido,

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

20 -Y- es una unidad espaciadora autoinmoladora,

y es 0, 1 o 2;

-D es una unidad de fármaco que tiene actividad citostática o citotóxica contra una célula diana; y

p es un número entero de 1 a 20.

25 En algunas realizaciones, a es 0 o 1, w es 0 o 1, e y es 0, 1 o 2. En algunas realizaciones, a es 0 o 1, w es 0 o 1, e y es 0 o 1. En algunas realizaciones, p varía de 1 a 12, de 1 a 10, de 1 a 9, de 1 a 8, de 1 a 7, de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, o de 1 a 2. En algunas realizaciones, p varía de 2 a 8, de 2 a 7, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4 o de 2 a 3. En otras realizaciones, p es 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En algunas realizaciones, p es 2 o 4. En algunas realizaciones, cuando w no es cero, y es 1 o 2. En algunas realizaciones, cuando w es de 1 a 12, y es 1 o 2. En algunas realizaciones, w es de 2 a 12, e y es 1 o 2. En algunas realizaciones, a es 1, y w e y son 0.

30 Para composiciones que comprenden una pluralidad de anticuerpos, la carga del fármaco se representa mediante p, el número promedio de moléculas de fármaco por anticuerpo. La carga del fármaco puede variar de 1 a 12 fármacos (D) por anticuerpo. El número promedio de fármacos por anticuerpo en la preparación de reacciones de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales, tales como espectroscopía de masas, ensayo ELISA y HPLC. También puede determinarse la distribución cuantitativa de los conjugados de fármaco-anticuerpo en términos de p.

35 En algunos casos, puede lograrse la separación, la purificación y la caracterización de conjugados de fármaco-anticuerpo homogéneos, en los que p es un valor concreto de los conjugados de fármaco-anticuerpo con otras cargas de fármaco, por medio de HPLC en fase inversa o electroforesis. En ejemplos de realizaciones, p es de 2 a 8.

40 La generación de compuestos de conjugados de fármaco y anticuerpo puede lograrse mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica. Brevemente, los compuestos de conjugados de fármaco y anticuerpo comprenden MAb de 161P2F10B como unidad de anticuerpo, un fármaco, y opcionalmente un conector que une el fármaco y el agente de unión. En una realización preferida, el anticuerpo es MAb de 161P2F10B que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo denominado H16-7.8 descrito anteriormente. En una realización más preferida, el anticuerpo es MAb de 161P2F10B que comprende la cadena pesada y ligera de un anticuerpo denominado H16-7.8 descrito anteriormente. Están disponibles una serie de reacciones diferentes para la unión covalente de fármacos y/o conectores a agentes de unión. Esto a menudo se logra mediante la reacción de los restos aminoácidos del agente de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que incluyen los grupos amina de la lisina, los grupos ácido carboxílico libres del ácido glutámico y aspártico, los grupos sulfhidrilo de la cisteína y

45

diversos restos de los aminoácidos aromáticos. Uno de los métodos no específicos de unión covalente que se emplea más habitualmente es la reacción de carbodiimida para unir un grupo carboxi (o amino) de un compuesto a grupos amino (o carboxi) del anticuerpo. Además, se han empleado agentes bifuncionales, tales como dialdehídos o imidoésteres, para unir el grupo amino de un compuesto a grupos amino de una molécula de anticuerpo. La reacción de bases de Schiff también está disponible para la unión de fármacos a agentes de unión. Este método implica la oxidación con peryodato de un fármaco que contiene grupos glicol o hidroxilo, formando así un aldehído que después se hace reaccionar con el agente de unión. La unión se produce a través de la formación de una base de Schiff con grupos amino del agente de unión. También pueden emplearse isotiocianatos como agentes de acoplamiento para la unión covalente de fármacos a agentes de unión. Otras técnicas son conocidas por los expertos en la técnica y están dentro del alcance de la presente invención.

En ciertas realizaciones, un intermedio, que es el precursor del conector, se hace reaccionar con el fármaco bajo condiciones apropiadas. En ciertas realizaciones, se emplean grupos reactivos sobre el fármaco y/o el intermedio. El producto de la reacción entre el fármaco y el intermedio, o el fármaco derivatizado, después se hace reaccionar con el MAB de 161P2F10B bajo condiciones apropiadas.

Cada una de las unidades particulares de los compuestos de conjugados de fármaco-anticuerpo se describe con más detalle en la presente. La síntesis y la estructura de ejemplos de unidades de conector, unidades alargadoras, unidades de aminoácidos, unidades espaciadoras autoinmoladoras, y unidades de fármaco también se describen en las publicaciones de solicitudes de patente de EE. UU. n.ºs 2003-0083263, 2005-0238649 y 2005-0009751.

Unidades de conector

Generalmente, los compuestos de conjugados de fármaco y anticuerpo comprenden una región de conector entre la unidad de fármaco y la unidad de anticuerpo. En algunas realizaciones, el conector puede escindirse bajo condiciones intracelulares, de modo que la escisión del conector libera a la unidad de fármaco del anticuerpo en el entorno intracelular. En otras realizaciones, la unidad de conector no se escinde y el fármaco es liberado, por ejemplo, por la degradación del anticuerpo.

En algunas realizaciones, el conector se escinde por medio de un agente de escisión que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o un endosoma o una cuévula). El conector puede ser, por ejemplo, un conector de peptidilo que es escindido por una enzima proteasa o peptidasa que incluyen, pero no se limitan a proteasa lisosómica o endosómica. En algunas realizaciones, el conector de peptidilo tiene una longitud de al menos dos aminoácidos o de al menos tres aminoácidos. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todos los cuales son conocidos por hidrolizar derivados de fármaco de dipéptido y provocan la liberación del fármaco activo dentro de las células diana (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics*, 83:67-123). Los más típicos son los conectores de peptidilo que son escindidos por enzimas que están presentes en las células que expresan 161P2F10B. Por ejemplo, puede emplearse un conector de peptidilo que es escindido por la proteasa dependiente de tior catepsina-B, que se expresa en gran cantidad en tejido canceroso (por ejemplo, un conector de Phe-Leu o de Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:9). Otros ejemplos de dichos conectores se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.214.345. En una realización específica, el conector de peptidilo escindible por una proteasa intracelular es un conector de Val-Cit o un conector de Phe-Lys (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.214.345, que describe la síntesis de doxorubicina con el conector de val-cit). Una ventaja de la utilización de la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente está generalmente atenuado cuando está conjugado, y la estabilidad en suero de los conjugados generalmente es alta.

En otras realizaciones, el conector escindible es sensible al pH, es decir, es sensible a la hidrólisis en ciertos valores de pH. Generalmente, el conector sensible al pH es hidrolizable bajo condiciones ácidas. Por ejemplo, puede emplearse un conector lábil frente a ácidos que es hidrolizable en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetal, cetal, o similares; véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics*, 83:67-123; Neville, *et al.*, 1989, *Biol. Chem.*, 264:14653-14661). Estos conectores son relativamente estables bajo condiciones de pH neutro, tales como las de la sangre, pero son inestables a un pH menor que 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En ciertas realizaciones, el conector hidrolizable es un conector de tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter unido al agente terapéutico a través de un enlace de acilhidrazona (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.622.929).

En otras realizaciones, el conector es escindible bajo condiciones reductoras (por ejemplo, un conector de disulfuro). En la técnica se conoce una diversidad de conectores de disulfuro que incluyen, por ejemplo, los que pueden formarse empleando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridilditio)tolueno), SPDB y SMPT (véase, por ejemplo, Thorpe, *et al.*, 1987, *Cancer Res.*, 47:5924-5931; Wawrzynczak, *et al.*, In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed.), Oxford U. Press, 1987. Véase también la patente de EE. UU. n.º 4.880.935.)

En otras realizaciones específicas, el conector es un conector de malonato (Johnson, *et al.*, 1995, *Anticancer Res.*, 15:1387-93), un conector de maleimidobenzóilo (Lau, *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.*, 3(10):1299-1304), o un

análogo de 3'-N-amida (Lau, *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.*, 3(10):1305-12).

En otras realizaciones, la unidad de conector no se escinde y el fármaco es liberado por la degradación del anticuerpo (véase la publicación de EE. UU. n.º 2005/0238649). En una realización preferida, la unidad de conector es maleimidocaproilo (mc).

- 5 Generalmente, el conector no es sustancialmente sensible al entorno extracelular. Tal como se emplea en la presente, "no sustancialmente sensible al entorno extracelular", en el contexto de un conector, significa que no más de aproximadamente 20%, generalmente no más de aproximadamente 15%, más generalmente no más de aproximadamente 10%, y aún más generalmente no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 3%, o no más de aproximadamente 1% de los conectores, en una muestra de un compuesto de conjugado de fármaco y anticuerpo, es escindida cuando el compuesto de conjugado de fármaco-anticuerpo está presente en un entorno extracelular (por ejemplo, en plasma). Puede determinarse si un conector no es sustancialmente sensible al entorno extracelular, por ejemplo, incubando con plasma el compuesto de conjugado de fármaco-anticuerpo durante un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16, o 24 horas) y después cuantificando la cantidad de fármaco libre presente en el plasma.
- 10
- 15 En otras realizaciones no mutuamente excluyentes, el conector estimula la internalización celular. En ciertas realizaciones, el conector estimula la internalización celular cuando se conjuga con el agente terapéutico (concretamente, en el entorno del resto de agente terapéutico-conector del compuesto de conjugado de fármaco-anticuerpo, según se describe en la presente). En otras realizaciones, el conector estimula a internalización celular cuando se conjuga con el compuesto de auristatina y el MAb de 161P2F10B.
- 20 Se describe una diversidad de ejemplos de conectores que pueden emplearse con las presentes composiciones y métodos en el documento WO2004-010957, publicación U.S. n.º 20060074008, publicación U.S. n.º 20050238649, y publicación U.S. n.º 20060024317.

Una "unidad de conector" ("Linker unit", LU) es un compuesto bifuncional que puede emplearse para conectar una unidad de fármaco y una unidad de anticuerpo para formar un compuesto de conjugado de fármaco-anticuerpo. En algunas realizaciones, la unidad de conector tiene la fórmula:



en la que: -A- es una unidad alargadora,

a es 0 o 1,

cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido,

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

-Y- es una unidad espaciadora autoinmoladora, y

y es 0, 1 o 2.

En algunas realizaciones, a es 0 o 1, w es 0 o 1, e y es 0, 1 o 2. En algunas realizaciones, a es 0 o 1, w es 0 o 1, e y es 0 o 1. En algunas realizaciones, cuando w es de 1 a 12, y es 1 o 2. En algunas realizaciones, w es de 2 a 12, e y es 1 o 2. En algunas realizaciones, a es 1, y w e y son 0.

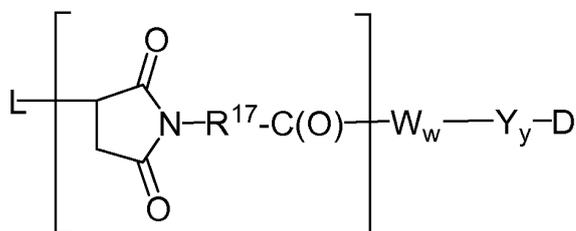
35 La unidad alargadora

La unidad alargadora (A), cuando está presente, es capaz de unir una unidad de anticuerpo a una unidad de aminoácido (-W-), si está presente, a una unidad espaciadora unit (-Y-), si está presente, o a una unidad de fármaco (-D). Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un MAb de 161P2F10B MAb (por ejemplo, H16-7.8), de modo natural o por medio de manipulación química, incluyen, pero no se limitan a sulfhidrilo, amino, hidroxilo, el grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato, y un carboxilo. Los grupos funcionales adecuados son sulfhidrilo y amino. En un ejemplo, los grupos sulfhidrilo pueden generarse mediante la reducción de los enlaces disulfuro intramoleculares de un MAb de 161P2F10B. En otra realización, los sulfhidrilo pueden generarse mediante la reacción de un grupo amino de un resto lisina de un MAb de 161P2F10B con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otros reactivos generadores de sulfhidrilo. En ciertas realizaciones, el MAb de 161P2F10B es un anticuerpo recombinante y se modifica para que porte una o más lisinas. En ciertas otras realizaciones, el MAb de 161P2F10B recombinante se modifica para que porte grupos sulfhidrilo adicionales, por ejemplo, cisteínas adicionales.

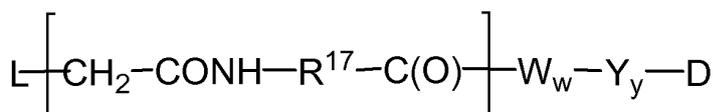
En una realización, la unidad alargadora forma un enlace con un átomo de azufre de la unidad de anticuerpo. El átomo de azufre puede provenir de un grupo sulfhidrilo de un anticuerpo. Las unidades alargadoras representativas de esta realización se indican entre corchetes en las fórmulas IIIa y IIIb, en las que L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se definió anteriormente, y R¹⁷ se selecciona de -alquilenilo C₁-C₁₀-, -alquenileno C₁-C₁₀-, -alquinileno C₁-C₁₀-, carbociclo-, -O-(alquilenilo C₁-C₈)-, O-(alquenileno C₁-C₈)-, -O-(alquinileno C₁-C₈)-, -arileno-, -(alquilen C₁-C₁₀)arileno-,

50

- 5 -(alquenilen C₂-C₁₀)arileno, -(alquinilen C₂-C₁₀)arileno, -arilen-(alquilen C₁-C₁₀)-, -arilen-(alquenileno C₂-C₁₀)-, -arilen-(alquinileno C₂-C₁₀)-, -(alquilen C₁-C₁₀)-(carbociclo)-, -(alquenilen C₂-C₁₀)-(carbociclo)-, -(alquinilen C₂-C₁₀)-(carbociclo)-, -(carbociclo)-(alquilen C₁-C₁₀)-, -(carbociclo)-(alquenileno C₂-C₁₀)-, -(carbociclo)-(alquinileno C₂-C₁₀)-, -heterociclo-, -(alquilen C₁-C₁₀)-(heterociclo)-, -(alquenilen C₂-C₁₀)-(heterociclo)-, -(alquinilen C₂-C₁₀)-(heterociclo)-, -(heterociclo)-(alquilen C₁-C₁₀)-, -(heterociclo)-(alquenileno C₂-C₁₀)-, -(heterociclo)-(alquinileno C₁-C₁₀)-, -(CH₂CH₂O)_r, o -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, y r es un número entero que varía de 1-10, en los que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilen, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo, heterociclo, y arileno, por sí solos o como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos. En algunas realizaciones, dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilen, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo, heterociclo, y arileno, por sí solos o como parte de otro grupo, no están sustituidos. En algunas realizaciones, R¹⁷ se selecciona de -alquilen C₁-C₁₀-, -carbociclo-, -O-(alquilen C₁-C₈)-, -arileno-, -(alquilen C₁-C₁₀)arileno-, -arilen-(alquilen C₁-C₁₀)-, -(alquilen C₁-C₁₀)-(carbociclo)-, -(carbociclo)-(alquilen C₁-C₁₀)-, -heterociclo C₃-C₈-, -(alquilen C₁-C₁₀)-(heterociclo)-, -(heterociclo)-(alquilen C₁-C₁₀)-, -(CH₂CH₂O)_r-, y -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; y r es un número entero que varía de 1-10, en los que dichos grupos alquilen no están sustituidos y el resto de los grupos están opcionalmente sustituidos.
- 10
- 15 En todos los ejemplos de realizaciones, debe entenderse que, aunque no se indique expresamente, de 1 a 12 restos de fármaco pueden estar unidos a un anticuerpo (p = 1-12).

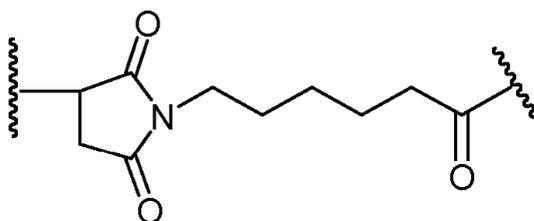


IIIa

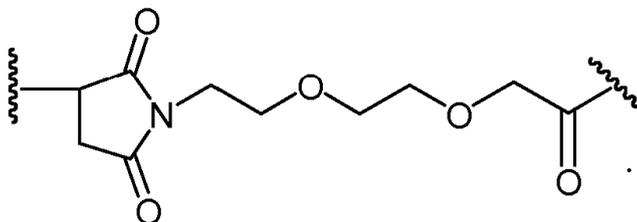


IIIb

Una unidad alargadora ilustrativa es la que tiene la fórmula IIIa, en la que R¹⁷ es -(CH₂)₅-:

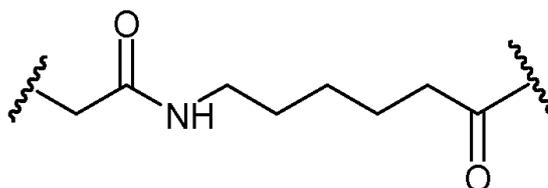


- 20 Otra unidad alargadora ilustrativa es la que tiene la fórmula IIIa, en la que R¹⁷ es -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; y r es 2:

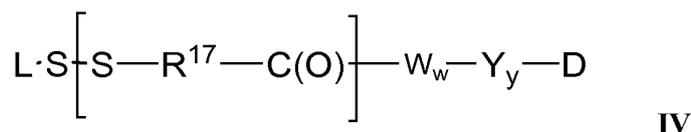


Una unidad alargadora ilustrativa es la que tiene la fórmula IIIa, en la que R¹⁷ es -arileno- o arilen-(alquilen C₁-C₁₀)-. En algunas realizaciones, el grupo arilo es un grupo fenilo no sustituido.

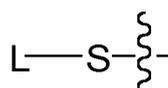
Otra unidad alargadora ilustrativa es la que tiene la fórmula IIIb, en la que R¹⁷ es -(CH₂)₅-:



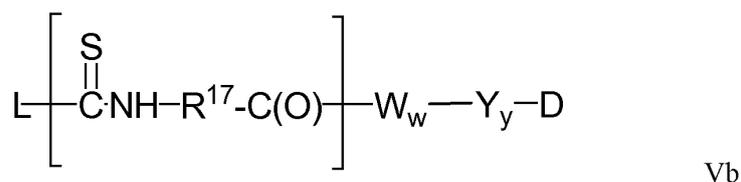
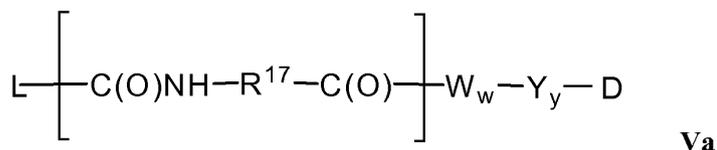
En ciertas realizaciones, la unidad alargadora está unida a la unidad de anticuerpo a través de un enlace disulfuro entre un átomo de azufre de la unidad de anticuerpo y un átomo de azufre de la unidad alargadora. Una unidad alargadora representativa de esta realización se indica entre los corchetes de la fórmula IV, en la que R¹⁷, L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se definió anteriormente.



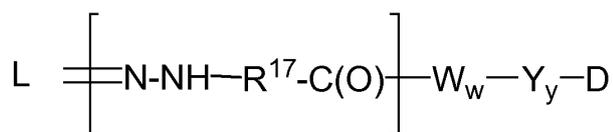
- 5 Debe advertirse que, a lo largo de esta solicitud, el resto S en la siguiente fórmula se refiere a un átomo de azufre de la unidad de anticuerpo, a menos que el contexto indique lo contrario.



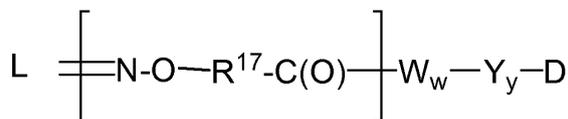
- 10 En otras realizaciones, el alargador contiene un sitio reactivo que puede formar un enlace con un grupo amino primario o secundario de un anticuerpo. Los ejemplos de estos sitios reactivos incluyen, pero no se limitan a ésteres activados, tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Las unidades alargadoras representativas de esta realización se indican entre los corchetes de las fórmulas Va y Vb, en las que -R¹⁷-, L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se definió anteriormente:



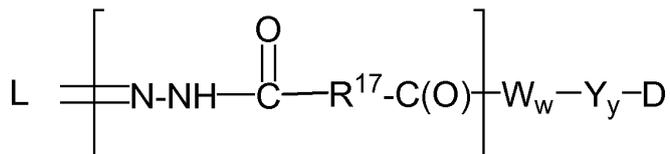
- 15 En algunas realizaciones, el alargador contiene un sitio reactivo que es reactivo con un grupo de carbohidrato modificado (-CHO) que puede estar presente sobre un anticuerpo. Por ejemplo, un carbohidrato puede ser débilmente goxidado empleando un reactivo, tal como peryodato de sodio, y la unidad resultante (-CHO) del carbohidrato oxidado puede condensarse con un alargador que contenga una funcionalidad, tal como una hidrazida, una oxima, una amina primaria o secundaria, una hidrazina, una tiosemicarbazona, un carboxilato de hidrazina, y una arilhidrazida, tales como los descritos por Kaneko, *et al.*, 1991, *Bioconjugate Chem.*, 2:133-41. Las unidades
20 alargadoras representativas de esta realización se indican entre los corchetes de las fórmulas VIa, VIb, y VIc, en las que -R¹⁷-, L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se definió anteriormente.



VIa



VIb



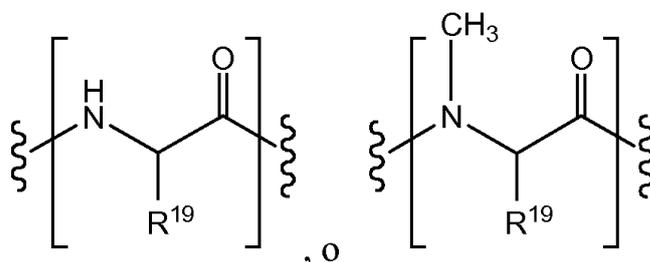
VIc

La unidad de aminoácido

La unidad de aminoácido (-W-), cuando está presente, une la unidad alargadora con la unidad espaciadora si la unidad espaciadora está presente, une la unidad alargadora con el resto de fármaco si la unidad espaciadora está ausente, y une la unidad de anticuerpo con la unidad de fármaco si la unidad alargadora y la unidad espaciadora están ausentes.

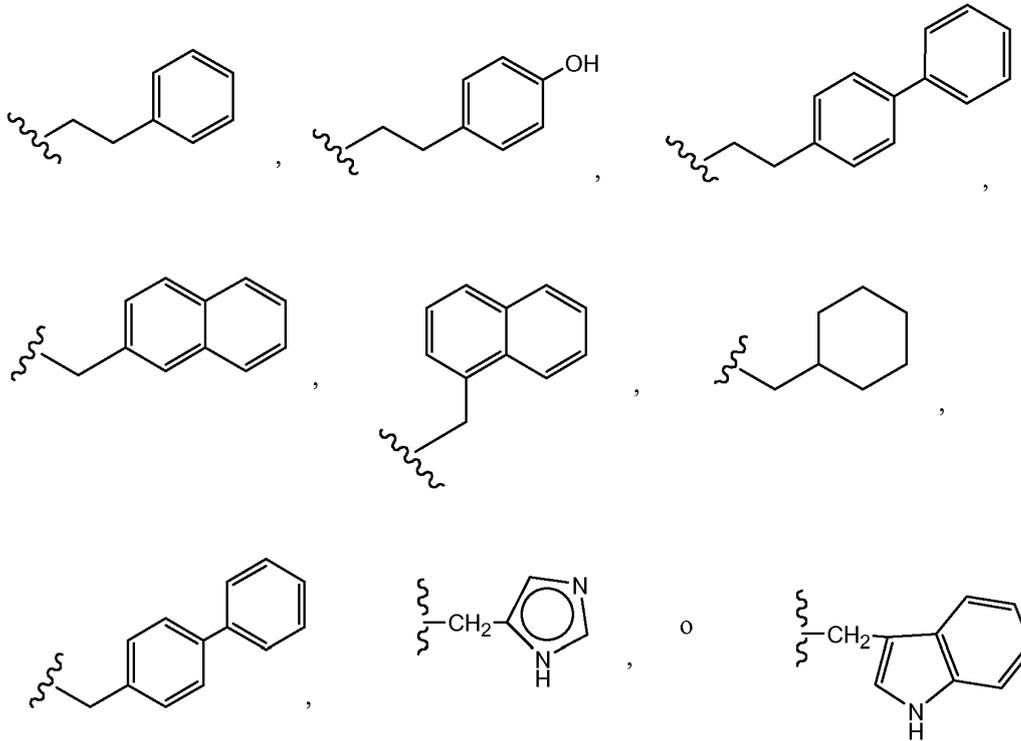
5

W_w- puede ser, por ejemplo, una unidad de monopéptido, dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido. Cada unidad -W- tiene independientemente la fórmula indicada a continuación entre corchetes, y w es un número entero que varía de 0 a 12:



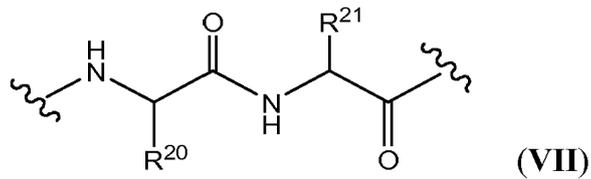
10 en la que R¹⁹ es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, *sec*-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-piridilmetilo-, 3-piridilmetilo-, 4-piridilmetilo-, fenilo, ciclohexilo,

15

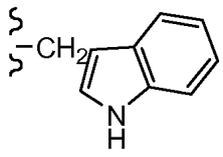


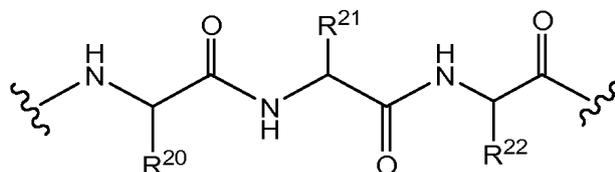
En algunas realizaciones, la unidad de aminoácido puede ser enzimáticamente escindida por una o más enzimas, que incluyen una proteasa asociada a cáncer o tumor, para liberar la unidad de fármaco (-D), que, en una realización, se protona *in vivo* tras su liberación para proporcionar un fármaco (D).

5 En ciertas realizaciones, la unidad de aminoácido puede comprender aminoácidos naturales. En otras realizaciones, la unidad de aminoácido puede comprender aminoácidos no naturales. Las unidades Ww ilustrativas están representadas por las fórmulas (VII)-(IX):



en las que R^{20} y R^{21} son como sigue:

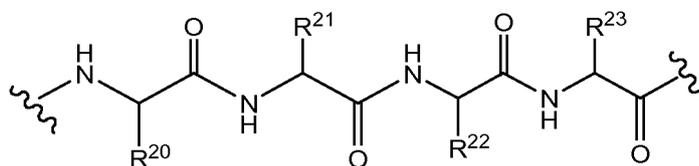
R ²⁰	R ²¹
bencilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
metilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
isopropilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
isopropilo	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
bencilo	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
isobutilo	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
sec-butilo	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
bencilo	metilo;
bencilo	(CH ₂) ₃ NHC(=NH)NH ₂ ;



(VIII)

en las que R²⁰, R²¹ y R²² son como sigue:

R ²⁰	R ²¹	R ²²
bencilo	bencilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
isopropilo	bencilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ; y
H	bencilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;



(IX)

5 en las que R²⁰, R²¹, R²² y R²³ son como sigue:

R ²⁰	R ²¹	R ²²	R ²³
H	bencilo	isobutilo	H; e
metilo	isobutilo	metilo	isobutilo.

Los ejemplos de unidades de aminoácido incluyen, pero no se limitan a las unidades de fórmula VII, en la que: R²⁰ es bencilo, y R²¹ es -(CH₂)₄NH₂; R²⁰ es isopropilo, y R²¹ es -(CH₂)₄NH₂; o R²⁰ es isopropilo, y R²¹ es -(CH₂)₃NHCONH₂. Otro ejemplo de unidad de aminoácido es una unidad de fórmula VIII, en la que R²⁰ es bencilo, R²¹ es bencilo, y R²² es -(CH₂)₄NH₂.

- 5 Las unidades -W_w- útiles pueden diseñarse y optimizarse en su selectividad por la escisión enzimática por una enzima concreta, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor. En una realización, una unidad -W_w- es una unidad cuya escisión es catalizada por la catepsina B, C y D, o una proteasa de plasmina.

En una realización, -W_w- es un dipéptido, tripéptido, tetrapéptido o pentapéptido. Cuando R¹⁹, R²⁰, R²¹, R²² o R²³ es distinto del hidrógeno, el átomo de carbono al cual está unido R¹⁹, R²⁰, R²¹, R²² o R²³ es quiral.

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

En un aspecto de la unidad de aminoácido, la unidad de aminoácido es valina-citrulina (vc o val-cit). En otro aspecto, la unidad de aminoácido es fenilalanina-lisina (es decir, fk). En otro aspecto de la unidad de aminoácido, la unidad de aminoácido es N-metilvalina-citrulina. En otro aspecto, la unidad de aminoácido es ácido 5-aminovalérico, homofenilalanina lisina, tetraisoquinolincarboxilato lisina, ciclohexilalanina lisina, ácido isonapecótico lisina, beta-alanina lisina, glicina serina valina glutamina y ácido isonapecótico.

- 15

La unidad espaciadora

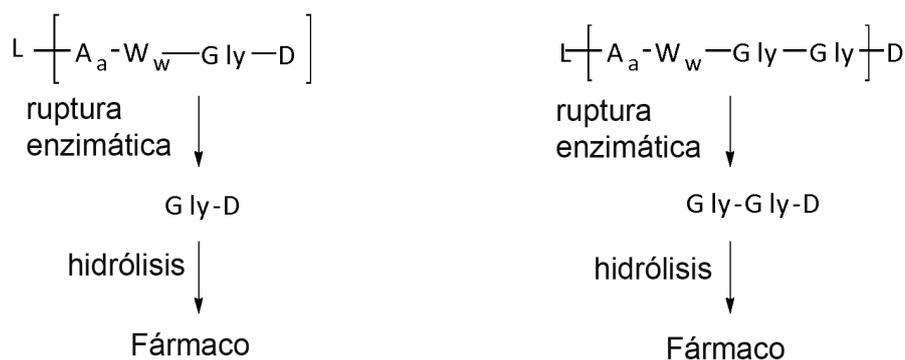
La unidad espaciadora (-Y-), cuando está presente, une una unidad de aminoácido a la unidad de fármaco cuando la unidad de aminoácido está presente. Como alternativa, la unidad espaciadora une la unidad alargadora a la unidad de fármaco cuando la unidad de aminoácido está ausente. La unidad espaciadora también une la unidad de fármaco a la unidad de anticuerpo cuando la unidad de aminoácido y la unidad alargadora están ausentes.

- 20

Las unidades espaciadoras son de dos tipos generales: autoinmoladoras o no autoinmoladoras. Una unidad espaciador no autoinmoladora es una unidad en la que parte o toda la unidad espaciador permanece unida al resto de fármaco después de la escisión, en particular enzimática, de una unidad de aminoácido del conjugado de fármaco-anticuerpo. Los ejemplos de unidad espaciadora no autoinmoladora incluyen, pero no se limitan a una unidad espaciadora de (glicina-glicina) y una unidad espaciadora de glicina (ambas mostradas en el esquema 1, a continuación). Cuando un conjugado contiene una unidad espaciadora de glicina-glicina o una unidad espaciadora de glicina sufre una escisión enzimática por una enzima (por ejemplo, una proteasa asociada a células tumorales, una proteasa asociada a células de cáncer o una proteasa asociada a linfocitos), un resto de glicina-glicina-fármaco o un resto de glicina-fármaco se escinde de L-Aa-Ww-. En una realización, se produce una reacción de hidrólisis independiente dentro de la célula diana, que escinde el enlace del resto de fármaco-glicina y libera el fármaco.

- 25
30

Esquema 1



En algunas realizaciones, una unidad espaciadora no autoinmoladora (-Y-) es -Gly-. En otras realizaciones, una unidad espaciadora no autoinmoladora (-Y-) es -Gly-Gly-.

- 35 En una realización, se proporciona un conjugado de fármaco-conector en el que la unidad espaciadora está ausente (y = 0), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o solvatos.

Como alternativa, un conjugado que contiene una unidad espaciador autoinmoladora puede liberar -D. Tal como se emplea en la presente, la expresión "espaciador autoinmolador" se refiere a un resto químico bifuncional que es capaz de unir covalentemente dos restos químicos separados para formar una molécula tripartita estable. Se separa de modo espontáneo del segundo resto químico si su enlace con el primer resto se rompe.

- 40

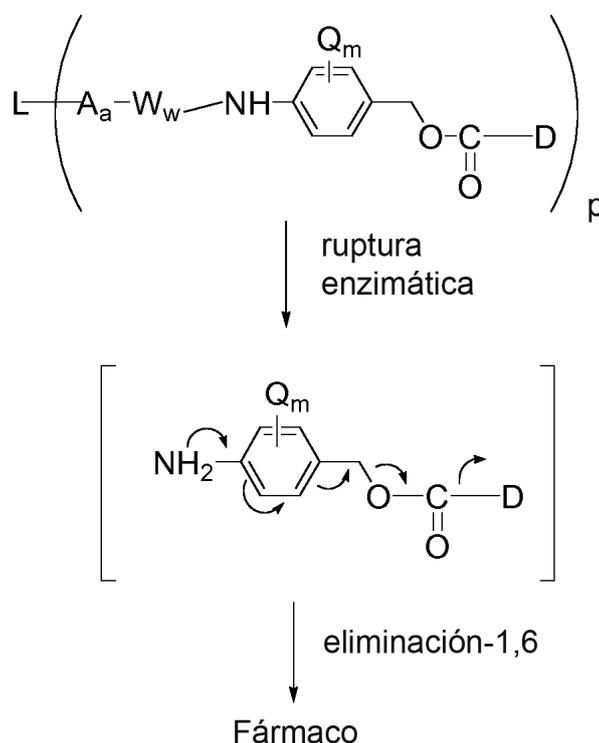
En algunas realizaciones, -Y_y- es una unidad de p-aminobencil alcohol (PAB) (véanse los esquemas 2 y 3) cuya

porción de fenileno está sustituida con Q_m , en la que Q es -alquilo C_1-C_8 , -alquenilo C_1-C_8 , -alquinilo C_1-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -O-(alquenilo C_1-C_8), -O-(alquinilo C_1-C_8), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0-4. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, por sí solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.

- 5 En algunas realizaciones, -Y- es un grupo PAB que está unido a $-W_w$ a través del átomo de nitrógeno de amino del grupo PAB, y está conectado directamente con -D a través de un grupo carbonato, carbamato o éter. Aunque no se pretenda limitación alguna por ninguna teoría o mecanismo concreto, el esquema 2 muestra un posible mecanismo de liberación del fármaco de un grupo PAB que está unido directamente a -D a través de un grupo carbamato o carbonato, según se describe en Toki *et al.*, 2002, *J. Org. Chem.*, 67:1866-1872.

10

Esquema 2

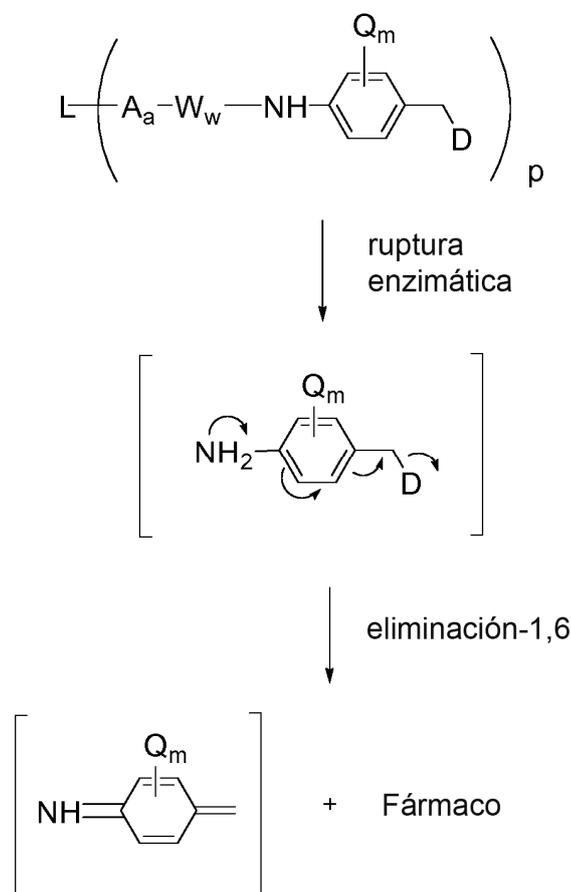


En el esquema 2, Q es -alquilo C_1-C_8 , -alquenilo C_1-C_8 , -alquinilo C_1-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -O-(alquenilo C_1-C_8), -O-(alquinilo C_1-C_8), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0-4; y p varía de 1 a aproximadamente 12. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, por sí solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.

15

Aunque no se pretenda limitación alguna por ninguna teoría o mecanismo concreto, el esquema 3 muestra un posible mecanismo de liberación del fármaco de un grupo PAB que está unido directamente a -D a través de un enlace éter o amina, en el que D incluye el grupo oxígeno o nitrógeno que es parte de la unidad de fármaco.

Esquema 3



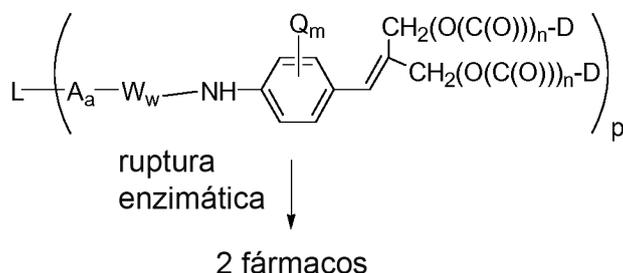
5 En el esquema 3, Q es -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₁-C₈, -alquinilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₁-C₈), -O-(alquinilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0-4; y p varía de 1 a aproximadamente 12. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, por sí solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.

10 Otros ejemplos de espaciadores autoinmoladores 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. Pueden emplearse espaciadores que sufren una ciclación tras la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas del ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues, *et al.*, 1995, *Chemistry Biology*, 2:223), sistemas de anillo de biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] sustituidos de modo adecuado (Storm, *et al.*, 1972, *J. Amer. Chem. Soc.*, 94:5815) y amidas del ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry, *et al.*, 1990, *J. Org. Chem.*, 55:5867). La eliminación de fármacos que contienen amina que están sustituidos en la posición α de la glicina (Kingsbury *et al.*, 1984, *J. Med. Chem.*, 27:1447) también son ejemplos de espaciadores autoinmoladores.

En una realización, la unidad espaciadora es una unidad de bis(hidroximetil)-estireno (BHMS) ramificado, tal como se muestra en el esquema 4, que puede utilizarse para incorporar y liberar múltiples fármacos.

20

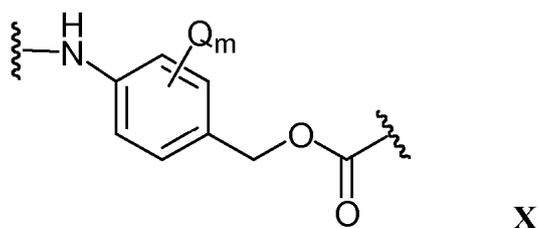
Esquema 4



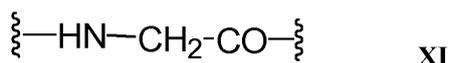
En el esquema 4, Q es -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₁-C₈, -alquinilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₁-C₈), -O-(alquinilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0-4; n es 0 o 1; y p varía de 1 a aproximadamente 12. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, por sí solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.

En algunas realizaciones, los restos -D son iguales. En otra realización, los restos -D son diferentes.

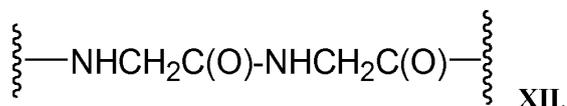
En un aspecto, las unidades espaciadoras (-Y_y-) están representadas por las fórmulas (X)-(XII):



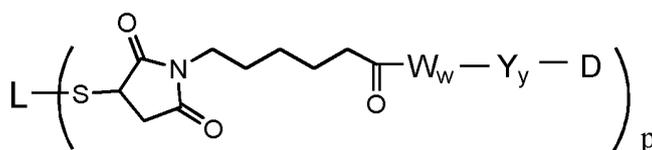
en las que Q es -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₁-C₈, -alquinilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₁-C₈), -O-(alquinilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0-4. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, por sí solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.

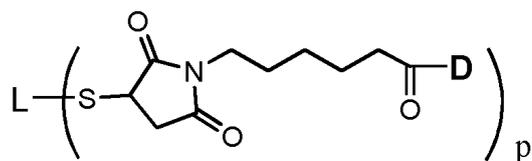


y



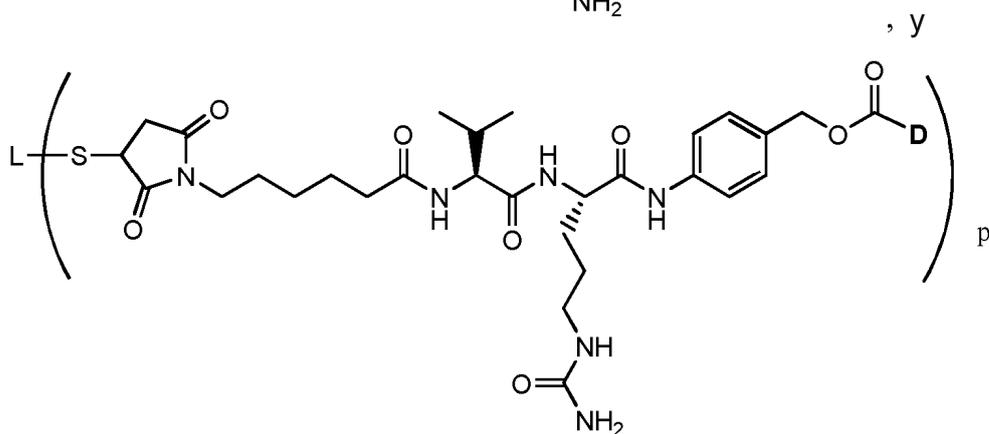
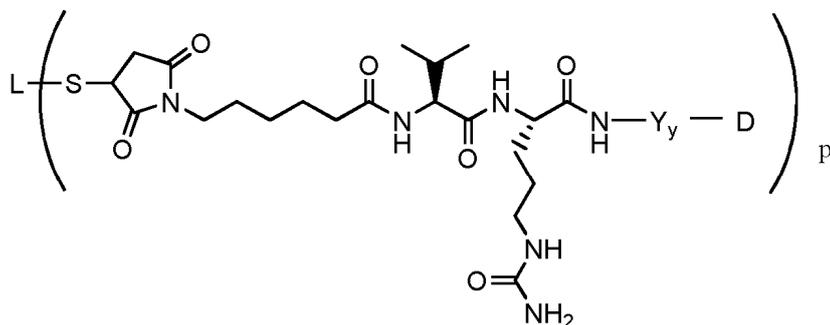
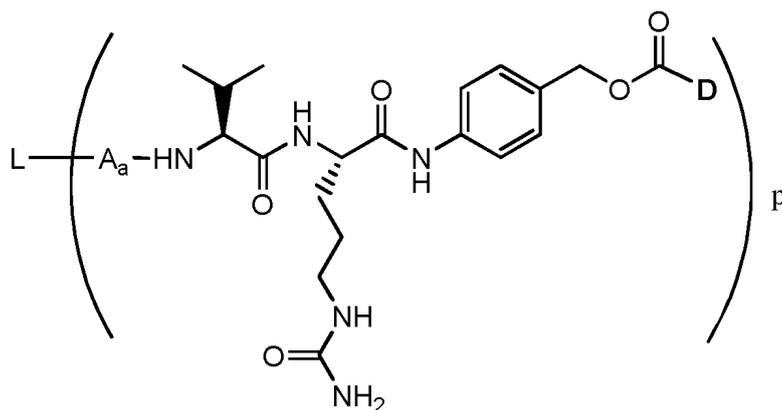
Las realizaciones de las fórmulas I y II que comprenden compuestos de conjugados de fármaco-anticuerpo pueden incluir:





en la que w e y son cada uno 0, 1 o 2, y,

en la que w e y son cada uno 0,



La unidad de fármaco

- 5 El resto de fármaco (D) puede ser cualquier citotóxico, citostático o inmunomodulador (por ejemplo, inmunosupresor) o fármaco. D es la unidad (resto) de fármaco ("Drug") que tiene un átomo que puede formar un enlace con la unidad espaciadora, con la unidad de aminoácido, con la unidad alargadora o con la unidad de anticuerpo. En algunas realizaciones, la unidad de fármaco D tiene un átomo de nitrógeno que puede formar un enlace con la unidad espaciadora. Tal como se emplean en la presente, las expresiones "unidad de fármaco" y "resto de fármaco" son sinónimas y se emplean de modo intercambiable.

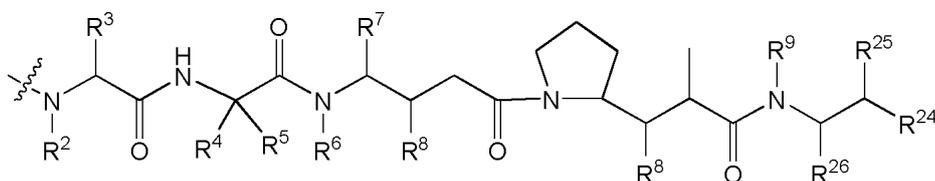
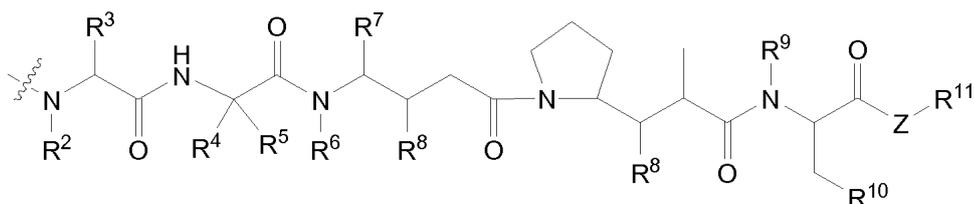
Las clases útiles de agentes citotóxicos o inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, ligantes del surco menor del ADN, inhibidores de la replicación del ADN y agentes alquilantes.

En algunas realizaciones, el fármaco es una auristatina, tal como auristatina E (también conocida en la técnica como un derivado de dolastatina-10) o uno de sus derivados. La auristatina puede ser, por ejemplo, un éster formado entre la auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, la auristatina E puede hacerse reaccionar con ácido para-acetilbenzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otras auristatinas típicas incluyen AFP, MMAF, y MMAE. La síntesis y la estructura de ejemplos de auristatinas se describen en las publicaciones de solicitudes de patente de EE. UU. n.ºs 2003-0083263, 2005-0238649 y 2005-0009751; la publicación de patente internacional n.º WO04/010957, la publicación de patente internacional n.º WO02/088172, y las patentes de EE. UU. n.ºs 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414.

Se ha demostrado que las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos y la división nuclear y celular y que tienen actividad anticáncer. MMAF se une a la tubulina y puede ejercer un efecto citotóxico o citostático sobre una célula que expresa 161P2F10B. Existen una serie de ensayos diferentes, conocidos en la técnica, que pueden utilizarse para determinar si una auristatina, o un conjugado de fármaco-anticuerpo resultante, ejerce un efecto citostático o citotóxico sobre una línea celular deseada.

Los métodos para determinar si un compuesto se une a la tubulina son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Muller, *et al.*, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 4390-4397; Hamel, *et al.*, *Molecular Pharmacology*, 1995 47: 965-976; y Hamel, *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265:28, 17141-17149. Para los fines de la presente invención, puede determinarse la afinidad relativa de un compuesto por la tubulina. Algunas auristatinas preferidas de la presente invención se unen a la tubulina con una afinidad que varía de 10 veces menor (afinidad más débil) que la afinidad de unión de MMAE a la tubulina, hasta 10 veces, 20 veces o incluso 100 veces mayor (afinidad más alta) que la afinidad de unión de MMAE a la tubulina.

En algunas realizaciones, -D es una auristatina de fórmula D_E o D_F:

D_ED_F

25 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o solvatos;

en las que, independientemente en cada emplazamiento:

la línea ondulada indica un enlace;

R² es -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, o -alquinilo C₂-C₂₀;

30 R³ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, -carbociclo, -(alquilen C₁-C₂₀)(carbociclo), -(alquenilen C₂-C₂₀)(carbociclo), -(alquinilen C₂-C₂₀)(carbociclo), -arilo, -(alquilen C₁-C₂₀)(arilo), -(alquenilen C₂-C₂₀)(arilo), -(alquinilen C₂-C₂₀)(arilo), heterociclo, -(alquilen C₁-C₂₀)(heterociclo), -(alquenilen C₂-C₂₀)(heterociclo), o -(alquinilen C₂-C₂₀)(heterociclo);

35 R⁴ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, -carbociclo, -(alquilen C₁-C₂₀)(carbociclo), -(alquenilen C₂-C₂₀)(carbociclo), -(alquinilen C₂-C₂₀)(carbociclo), -arilo, -(alquilen C₁-C₂₀)(arilo), -(alquenilen C₂-C₂₀)(arilo), -(alquinilen C₂-C₂₀)(arilo), heterociclo, -(alquilen C₁-C₂₀)(heterociclo), -(alquenilen C₂-

C₂₀)(heterociclo), o -(alquinilen C₂-C₂₀)(heterociclo);

R⁵ es -H o -alquilo C₁-C₈;

o R⁴ y R⁵ conjuntamente forman un anillo carbocíclico que tiene la fórmula -(CR^aR^b)_s-, en la que R^a y R^b son independientemente -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, -alquino C₂-C₂₀, o -carbociclo, y s es 2, 3, 4, 5 o 6,

R⁶ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, o -alquino C₂-C₂₀;

R⁷ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, -alquino C₂-C₂₀, -carbociclo, -(alquilen C₁-C₂₀)(carbociclo), -(alquilen C₂-C₂₀)(carbociclo), -(alquilen C₂-C₂₀)(carbociclo), -arilo, -(alquilen C₁-C₂₀)(arilo), -(alquilen C₂-C₂₀)(arilo), -(alquilen C₂-C₂₀)(arilo), heterociclo, -(alquilen C₁-C₂₀)(heterociclo), -(alquilen C₂-C₂₀)(heterociclo), o -(alquilen C₂-C₂₀)(heterociclo);

cada R⁸ es independientemente -H, -OH, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, -alquino C₂-C₂₀, -O-(alquilo C₁-C₂₀), -O-(alqueno C₂-C₂₀), -O-(alquino C₁-C₂₀), o -carbociclo;

R⁹ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, o -alquino C₂-C₂₀;

R²⁴ es -arilo, -heterociclo, o -carbociclo;

R²⁵ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, -alquino C₂-C₂₀, -carbociclo, -O-(alquilo C₁-C₂₀), -O-(alqueno C₂-C₂₀), -O-(alquino C₂-C₂₀), o OR¹⁸, en el que R¹⁸ es -H, un grupo protector de hidroxilo, o un enlace directo, en el que OR¹⁸ representa =O;

R²⁶ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, o -alquino C₂-C₂₀, -arilo, -heterociclo, o -carbociclo;

R¹⁰ es -arilo o -heterociclo;

Z es -O, -S, -NH, o -NR¹², en el que R¹² es -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, o -alquino C₂-C₂₀;

R¹¹ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, -alquino C₂-C₂₀, -arilo, -heterociclo, -(R¹³O)_m-R¹⁴, o -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂;

m es un número entero que varía de 1-1000;

R¹³ es -alqueno C₂-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, o -alqueno C₂-C₂₀;

R¹⁴ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, o -alquino C₂-C₂₀;

cada vez que aparece R¹⁵ es independientemente -H, -COOH, -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, -(CH₂)_n-SO₃H, -(CH₂)_n-SO₃-(alquilo C₁-C₂₀), -(CH₂)_n-SO₃-(alqueno C₂-C₂₀), o -(CH₂)_n-SO₃-(alquino C₂-C₂₀);

cada vez que aparece R¹⁶ es independientemente -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, -alquino C₂-C₂₀, o -(CH₂)_n-COOH; y

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

en las que dichos radicales alquilo, alqueno, alquino, alqueno, alqueno, alqueno, arilo, carbociclo, y heterociclo, por sí solos o como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos.

Las auristatinas de la fórmula D_E incluyen aquellas en las que dichos radicales alquilo, alqueno, alquino, alqueno, alqueno, alqueno, arilo, carbociclo, y heterociclo no están sustituidos.

Las auristatinas de la fórmula D_E incluyen aquellas en las que los grupos R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, y R⁹ no están sustituidos, y los grupos R¹⁹, R²⁰ y R²¹ están opcionalmente sustituidos como se describe en la presente.

Las auristatinas de fórmula D_E incluyen aquellas en las que:

R² es -alquilo C₁-C₈;

R³, R⁴ y R⁷ se seleccionan independientemente de -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, -alquino C₂-C₂₀, carbociclo C₃-C₆ monocíclico, -(alquilen C₁-C₂₀)(carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -(alquilen C₂-C₂₀)(carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -(alquilen C₂-C₂₀)(carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -arilo C₆-C₁₀, -(alquilen C₁-C₂₀)(arilo C₆-C₁₀), -(alquilen C₂-C₂₀)(arilo C₆-C₁₀), -(alquilen C₂-C₂₀)(arilo C₆-C₁₀), heterociclo, -(alquilen C₁-C₂₀)(heterociclo), -(alquilen C₂-C₂₀)(heterociclo), o -(alquilen C₂-C₂₀)(heterociclo); en los que dichos radicales alquilo, alqueno, alquino, alqueno, alqueno, alqueno, carbociclo, arilo, y heterociclo están opcionalmente sustituidos.

R⁵ es -H;

R⁶ es -alquilo C₁-C₈;

cada R⁸ se selecciona independientemente de -OH, -O-(alquilo C₁-C₂₀), -O-(alquenilo C₂-C₂₀), o -O-(alquinilo C₂-C₂₀), en los que dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;

5 R⁹ es -H o -alquilo C₁-C₈;

R²⁴ es fenilo opcionalmente sustituido;

R²⁵ es -OR¹⁸, en el que R¹⁸ es H, un grupo protector de hidroxilo, o un enlace directo, en el que OR¹⁸ representa =O;

10 R²⁶ se selecciona de -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, o -alquinilo C₂-C₂₀, o -carbociclo; en los que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo y carbociclo están opcionalmente sustituidos; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o solvatos.

Las auristatinas de fórmula D_E incluyen aquellas en las que:

R² es metilo;

15 R³ es -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, o -alquinilo C₂-C₈, en los que dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;

20 R⁴ es -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, carbociclo C₃-C₆ monocíclico, -arilo C₆-C₁₀, -(alquilen C₁-C₈)(arilo C₆-C₁₀), -(alquenilen C₂-C₈)(arilo C₆-C₁₀), -(alquinilen C₂-C₈)(arilo C₆-C₁₀), -(alquilen C₁-C₈)(carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -(alquenilen C₂-C₈)(carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -(alquinilen C₂-C₈)(carbociclo C₃-C₆ monocíclico); en los que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilen, alquenileno, alquinileno, arilo y carbociclo, por sí solos o como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos;

R⁵ es -H;

R⁶ es metilo;

R⁷ es -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈ o -alquinilo C₂-C₈;

25 cada R⁸ es metoxi;

R⁹ es -H o -alquilo C₁-C₈;

R²⁴ es -fenilo;

R²⁵ es -OR¹⁸, en el que R¹⁸ es H, un grupo protector de hidroxilo, o un enlace directo, en el que OR¹⁸ representa =O;

30 R²⁶ es metilo;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Las auristatinas de fórmula D_E incluyen aquellas en las que:

35 R² es metilo; R³ es -H o -alquilo C₁-C₃; R⁴ es -alquilo C₁-C₅; R⁵ es -H; R⁶ es metilo; R⁷ es isopropilo o sec-butilo; R⁸ es metoxi; R⁹ es -H o -alquilo C₁-C₈; R²⁴ es fenilo; R²⁵ es -OR¹⁸, en el que R¹⁸ es -H, un grupo protector de hidroxilo, o un enlace directo, en el que OR¹⁸ representa =O; y R²⁶ es metilo, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o solvatos.

Las auristatinas de fórmula D_E incluyen aquellas en las que:

R² es metilo o -alquilo C₁-C₃;

R³ es -H o -alquilo C₁-C₃;

40 R⁴ es -alquilo C₁-C₅;

R⁵ es H;

R⁶ es -alquilo C₁-C₃;

R⁷ es -alquilo C₁-C₅;

R⁸ es -alcoxi C₁-C₃;

R⁹ es -H o -alquilo C₁-C₈;

R²⁴ es fenilo;

5 R²⁵ es -OR¹⁸, en el que R¹⁸ es -H, un grupo protector de hidroxilo, o un enlace directo, en el que OR¹⁸ representa =O; y

R²⁶ es -alquilo C₁-C₃;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en las que:

R² es metilo;

10 R³, R⁴, y R⁷ se seleccionan independientemente de -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, -alquino C₂-C₂₀, carbociclo C₃-C₆ monocíclico, -(alquilen C₁-C₂₀)(carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -(alquilen C₂-C₂₀)(carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -(alquilen C₂-C₂₀)(arilo C₆-C₁₀), -(alquilen C₁-C₂₀)(arilo C₆-C₁₀), -(alquilen C₂-C₂₀)(arilo C₆-C₁₀), -(alquilen C₂-C₂₀)(arilo C₆-C₁₀), heterociclo, -(alquilen C₁-C₂₀)(heterociclo), -(alquilen C₂-C₂₀)(heterociclo), o -(alquilen C₂-C₂₀)(heterociclo); en los que dichos radicales

15 alquilo, alqueno, alquino, alqueno, alqueno, alqueno, carbociclo, arilo, y heterociclo, por sí solos o como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos;

R⁵ es -H;

R⁶ es metilo;

cada R⁸ es metoxi;

20 R⁹ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, o -alquino C₂-C₂₀, en los que dichos radicales alquilo, alqueno y alquino están opcionalmente sustituidos;

R¹⁰ es arilo opcionalmente sustituido o heterociclo opcionalmente sustituido;

Z es -O-, -S-, -NH-, o -NR¹², en el que R¹² es -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, o -alquino C₂-C₂₀, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

25 R¹¹ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, -alquino C₂-C₂₀, -arilo, -heterociclo, -(R¹³O)_m-R¹⁴, o -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂, en los que dichos radicales alquilo, alqueno, alquino, arilo y heterociclo están opcionalmente sustituidos;

m es un número entero que varía de 1-1000 o m = 0;

30 R¹³ es -alqueno C₂-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, o -alqueno C₂-C₂₀, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

R¹⁴ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, o -alquino C₂-C₂₀, en los que dichos radicales alquilo, alqueno y alquino están opcionalmente sustituidos;

35 cada vez que aparece R¹⁵ es independientemente -H, -COOH, -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, -(CH₂)_n-SO₃H, -(CH₂)_n-SO₃-(alquilo C₁-C₂₀), -(CH₂)_n-SO₃-(alqueno C₂-C₂₀), o -(CH₂)_n-SO₃-(alquino C₂-C₂₀), en los que dichos radicales alquilo, alqueno y alquino están opcionalmente sustituidos;

cada vez que aparece R¹⁶ es independientemente -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₂-C₂₀, -alquino C₂-C₂₀, o -(CH₂)_n-COOH, en los que dichos radicales alquilo, alqueno y alquino están opcionalmente sustituidos;

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

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

40 En ciertas de estas realizaciones, R¹⁰ es fenilo opcionalmente sustituido.

Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en las que los grupos R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, y R⁹ no están sustituidos, y los grupos R¹⁰ y R¹¹ son como se describe en la presente.

Las auristatinas de la fórmula D_F incluyen aquellas en las que los radicales alquilo, alqueno, alquino, alqueno, alqueno, alqueno, arilo, carbociclo, y heterociclo no están sustituidos.

Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en las que:

R^2 es -alquilo C_1-C_3 ; R^3 es -H o -alquilo C_1-C_3 ; R^4 es -alquilo C_1-C_5 ; R^5 es -H; R^6 es -alquilo C_1-C_3 ; R^7 es -alquilo C_1-C_5 ; R^8 es -alcoxi C_1-C_3 ; R^9 es -H o -alquilo C_1-C_8 ; R^{10} es fenilo opcionalmente sustituido; Z es -O-, -S-, o -NH-; R^{11} es como se define en la presente; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

5 Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en las que:

R^2 es metilo; R^3 es -H o -alquilo C_1-C_3 ; R^4 es -alquilo C_1-C_5 ; R^5 es -H; R^6 es metilo; R^7 es isopropilo o sec-butilo; R^8 es metoxi; R^9 es -H o -alquilo C_1-C_8 ; R^{10} es fenilo opcionalmente sustituido; Z es -O-, -S-, o -NH-; y R^{11} es como se define en la presente; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en las que:

10 R^2 es metilo; R^3 es -H o -alquilo C_1-C_3 ; R^4 es -alquilo C_1-C_5 ; R^5 es -H; R^6 es metilo; R^7 es isopropilo o sec-butilo; R^8 es metoxi; R^9 es -H o -alquilo C_1-C_8 ; R^{10} es fenilo; y Z es -O- o -NH- y R^{11} es como se define en la presente, preferiblemente hidrógeno; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en las que:

15 R^2 es -alquilo C_1-C_3 ; R^3 es -H o -alquilo C_1-C_3 ; R^4 es -alquilo C_1-C_5 ; R^5 es -H; R^6 es -alquilo C_1-C_3 ; R^7 es -alquilo C_1-C_5 ; R^8 es -alcoxi C_1-C_3 ; R^9 es -H o -alquilo C_1-C_8 ; R^{10} es fenilo; y Z es -O- o -NH- y R^{11} es como se define en la presente, preferiblemente hidrógeno; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Las auristatinas de fórmula D_E o D_F incluyen aquellas en las que R^3 , R^4 y R^7 son independientemente isopropilo o sec-butilo, y R^5 es -H. En un ejemplo de realización, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^5 es H, y R^7 es sec-butilo. El resto de los sustituyentes son como se definen en la presente.

20 Las auristatinas de fórmula D_E o D_F incluyen aquellas en las que R^2 y R^6 son cada uno metilo, y R^9 es H. El resto de los sustituyentes son como se definen en la presente.

Las auristatinas de fórmula D_E o D_F incluyen aquellas en las que, cada vez que aparece, R^8 es -OCH₃. El resto de los sustituyentes son como se definen en la presente.

25 Las auristatinas de fórmula D_E o D_F incluyen aquellas en las que R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^2 y R^6 son cada uno metilo, R^5 es H, R^7 es sec-butilo, cada vez que aparece, R^8 es -OCH₃, y R^9 es H. El resto de los sustituyentes son como se definen en la presente.

Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en las que Z es -O- o -NH-. El resto de los sustituyentes son como se definen en la presente.

30 Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en las que R^{10} es arilo. El resto de los sustituyentes son como se definen en la presente.

Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en las que R^{10} es -fenilo. El resto de los sustituyentes son como se definen en la presente.

Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en las que Z es -O-, y R^{11} es H, metilo o t-butilo. El resto de los sustituyentes son como se definen en la presente.

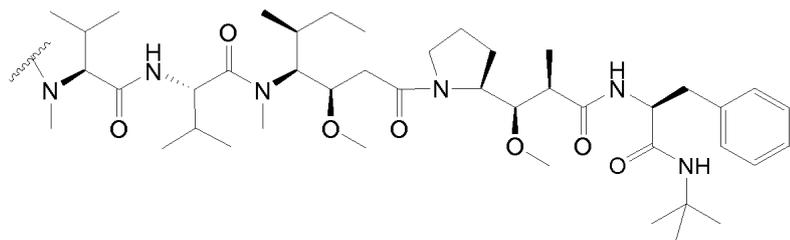
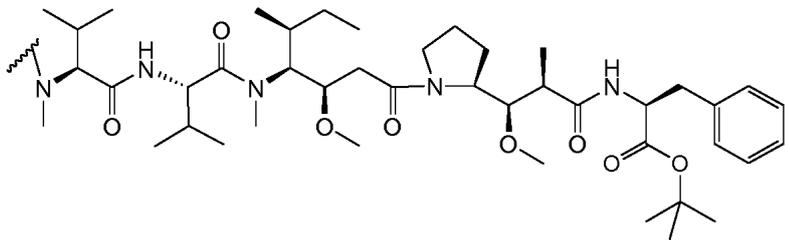
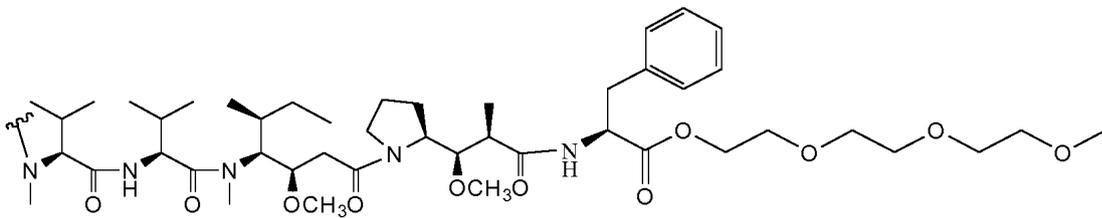
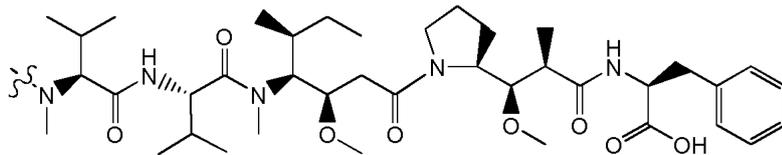
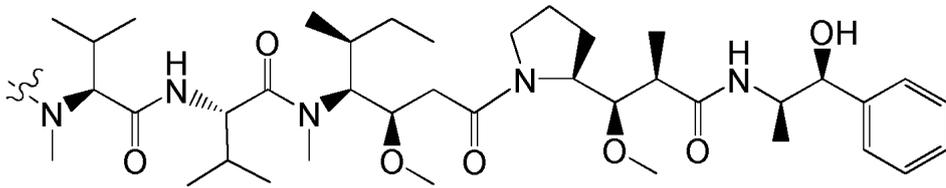
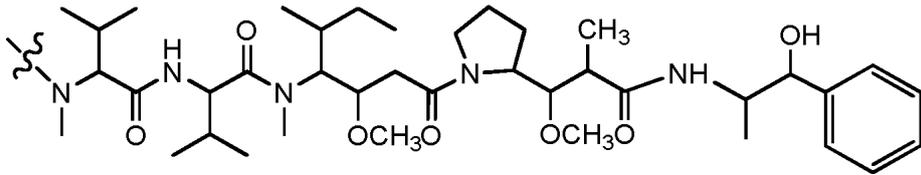
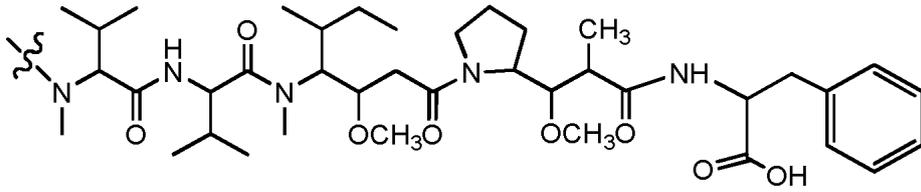
35 Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en las que Z es -NH-, R^{11} es $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$, en el que R^{15} es $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, y R^{16} es -alquilo C_1-C_8 o $-(CH_2)_n-COOH$. El resto de los sustituyentes son como se definen en la presente.

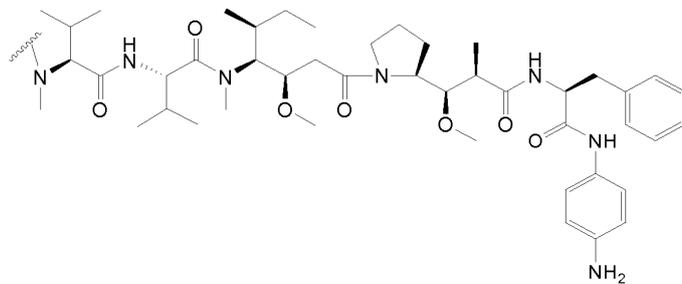
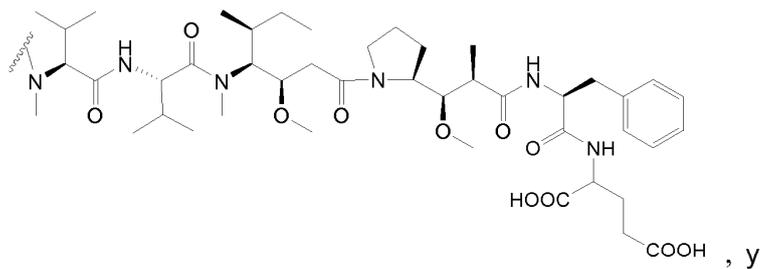
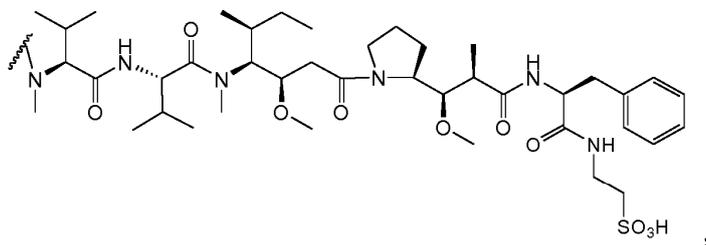
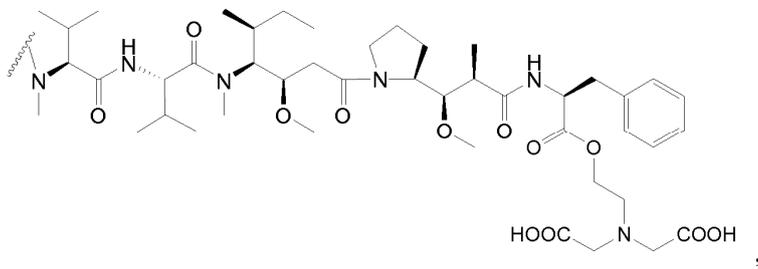
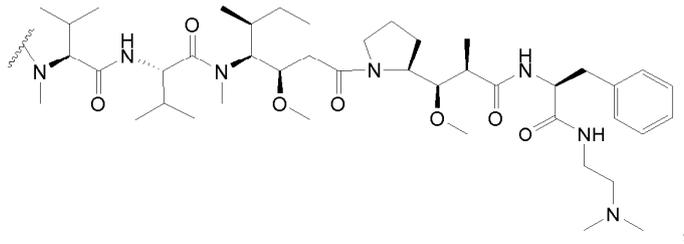
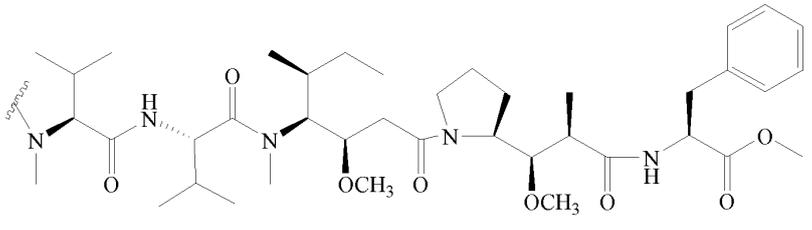
Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en las que Z es -NH-, R^{11} es $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$, en el que R^{15} es $-(CH_2)_n-SO_3H$. El resto de los sustituyentes son como se definen en la presente.

40 En realizaciones preferidas, cuando D es una auristatina de fórmula D_E , w es un número entero que varía de 1 a 12, preferiblemente de 2 a 12, y es 1 o 2, y a es preferiblemente 1.

En algunas realizaciones, cuando D es una auristatina de fórmula D_F , a es 1, y w e y son 0.

Las unidades de fármaco (-D) ilustrativas incluyen las unidades de fármaco que tienen las siguientes estructuras:





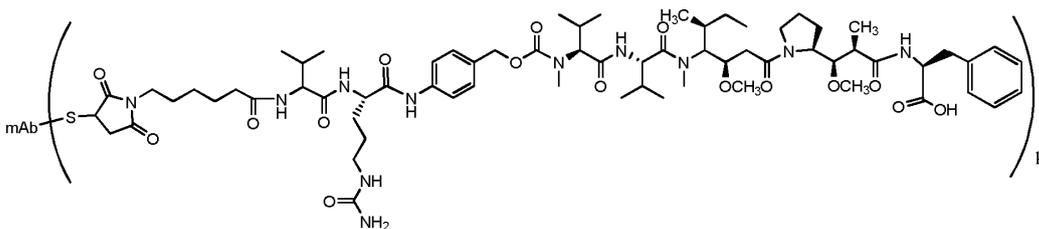
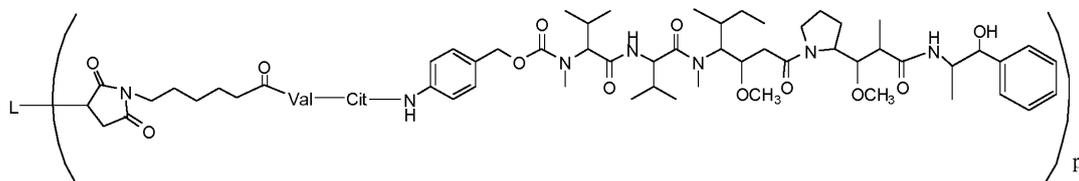
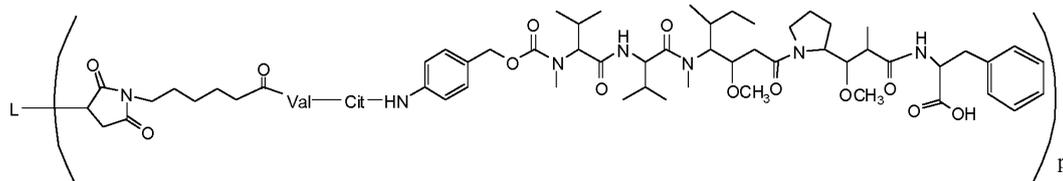
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o solvatos.

En un aspecto, pueden estar unidos grupos hidrófilos, tales como, pero sin limitarse a ésteres de trietilenglicol (TEG), a la unidad de fármaco en R¹¹. Aunque no se pretenda limitación alguna por ninguna teoría, se cree que los

grupos hidrófilos ayudan a la internalización y la no aglomeración de la unidad de fármaco.

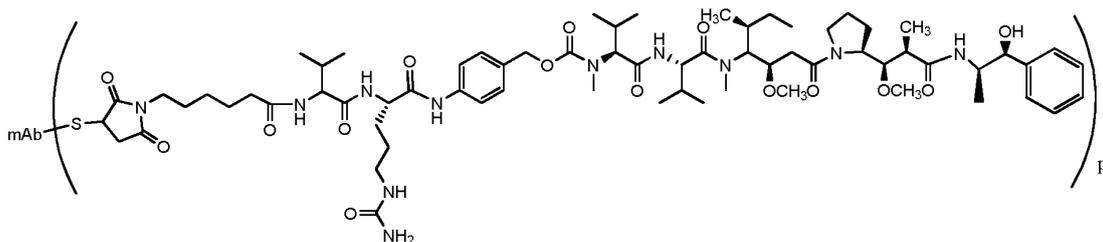
En algunas realizaciones, la unidad de fármaco no es TZT-1027. En algunas realizaciones, la unidad de fármaco no es auristatina E, dolastatina 10, o auristatina PE.

5 En una realización preferida, los compuestos de conjugado de fármaco-anticuerpo tienen las siguientes estructuras, en las que "L" o "mAb-s" representan un MAb de 161P2F10B denominado H16-7.8 tal como se indica en la presente:



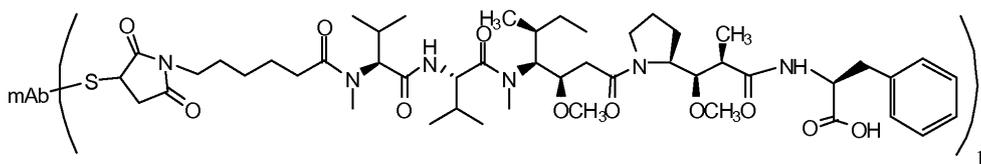
L-MC-vc-PAB-MMAF

o



L-MC-vc-PAB-MMAE

10 o



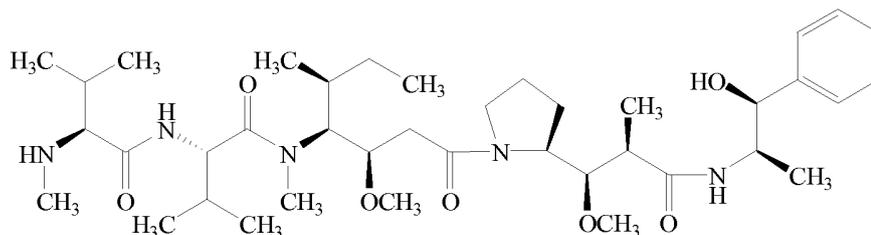
L-MC-MMAF

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, la unidad de fármaco es una caliqueamicina, camptotecina, un maitansinoide, o una antraciclina. En algunas realizaciones, el fármaco es un taxano, un inhibidor de topoisomerasas, un vinca-alcaloide o similares.

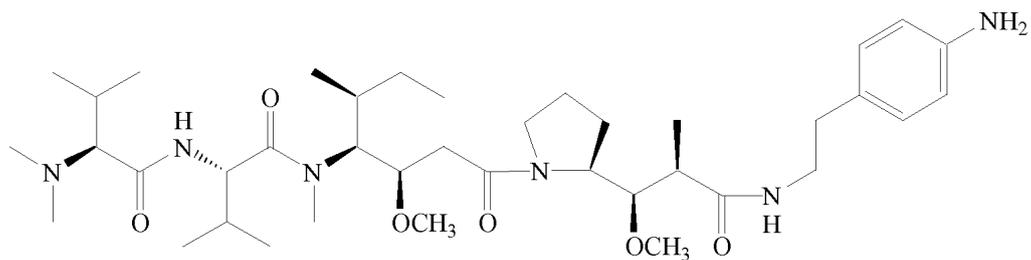
- 5 En algunas realizaciones típicas, los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, ligantes del surco menor del ADN (por ejemplo, enediinas y lexitropsinas, un compuesto de CBI; véase también la patente de EE. UU. n.º 6.130.237), duocarmicinas, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), puromicinas, y vinca-alcaloides. Otros agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, CC-1065, SN-38, topotecano, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, discodermolida, eleuterobina, y mitoxantrona.
- 10 En algunas realizaciones, el fármaco es un agente antitubulina. Los ejemplos de agentes antitubulina incluyen auristatinas, taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik) y vinca-alcaloides (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina, y vinorelbina). Otros agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, derivados de baccatina, análogos de taxano (por ejemplo, epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcimida, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermolida, y eleuterobina.
- 15 En ciertas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes antitubulina. Por ejemplo, en realizaciones específicas, el maitansinoide es maitansina o DM-1 (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari *et al.*, 1992, *Cancer Res.*, 52:127-131).

20 En ciertas realizaciones, el agente citotóxico o citostático es una dolastatina. En ciertas realizaciones, el agente citotóxico o citostático es de la clase de las auristatinas. Así, en una realización específica, el agente citotóxico o citostático es MMAE (fórmula XI). En otra realización específica, el agente citotóxico o citostático es AFP (fórmula XVI).

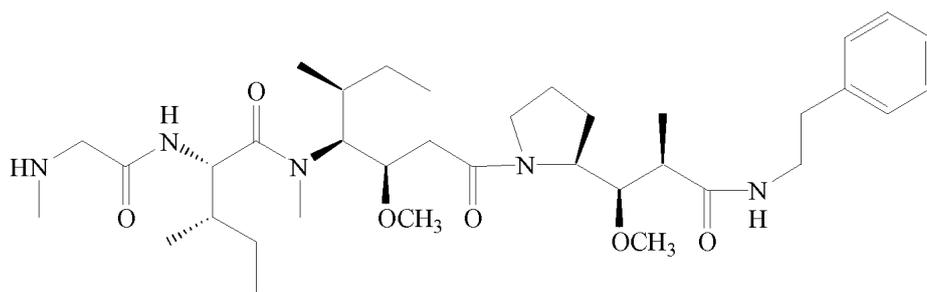


(XI)

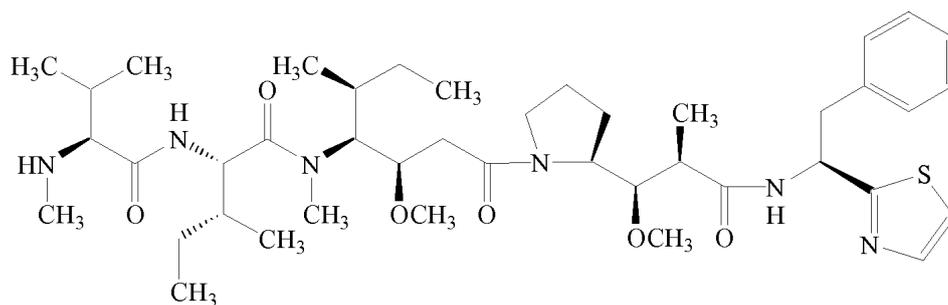
En ciertas realizaciones, el agente citotóxico o citostático es un compuesto de fórmulas XII-XXI, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables:



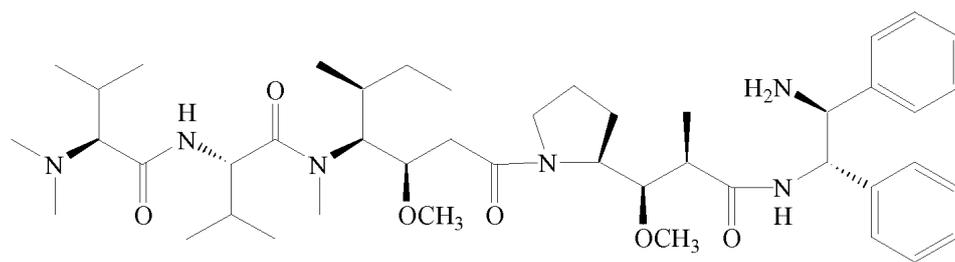
(XII)



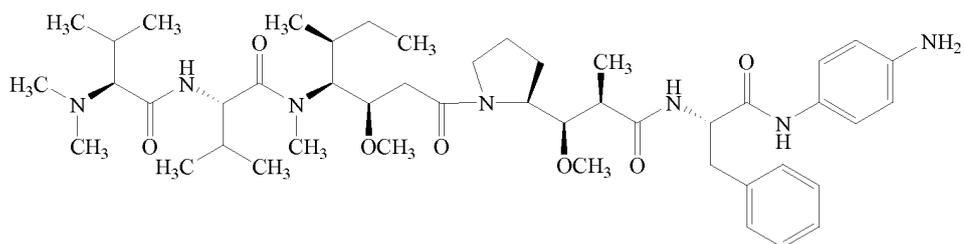
(XIII)



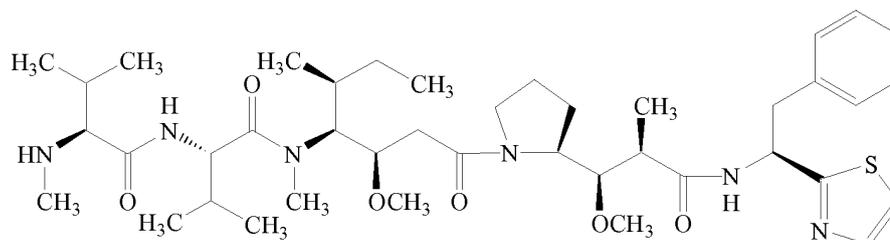
(XIV)



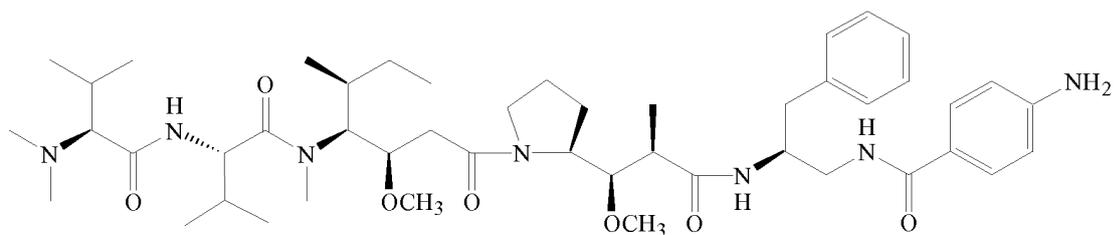
(XV)



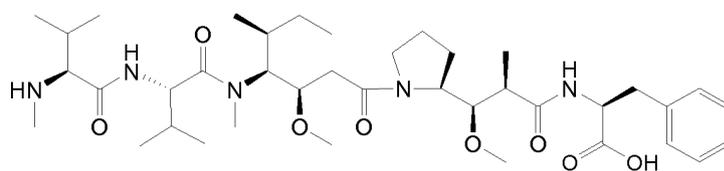
(XVI)



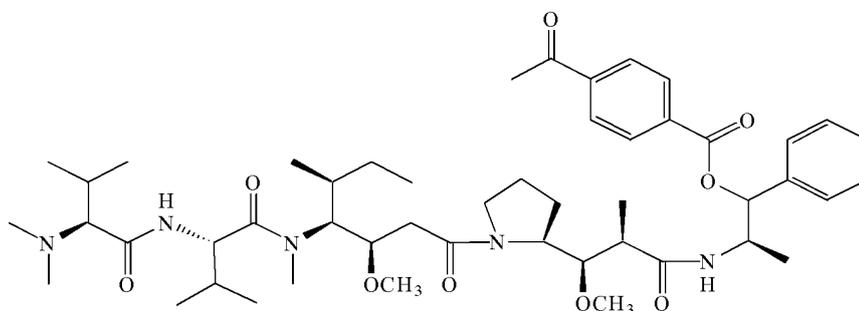
(XVII)



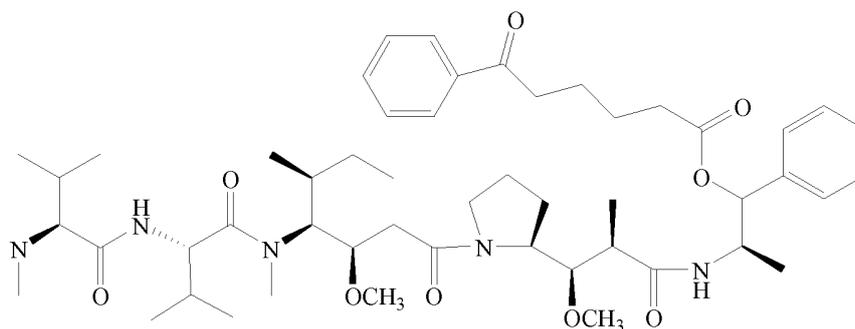
(XVIII)



(XIV)

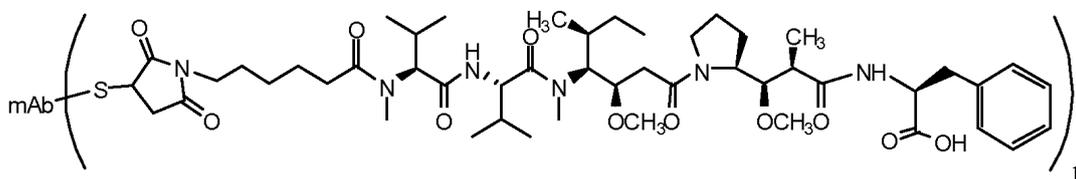


(XX)



(XXI)

p es de 1 a 12. En una realización más preferida, los compuestos de conjugado de fármaco-anticuerpo tienen las siguientes estructuras, en las que "mAb-s-" representa un MAb de 161P2F10B denominado H16-7.8 tal como se indica en la presente, y p es 4:



En una realización específica, el agente citotóxico o citostático es MMAF (fórmula XIV).

5 Carga del fármaco

La carga del fármaco se representa por p y es el número promedio de restos de fármaco por anticuerpo en una molécula. La carga del fármaco puede variar de 1 a 20 restos de fármaco (D) por anticuerpo. Los ADC de la invención incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con una serie de restos de fármaco, de 1 a 20. El número promedio de restos de fármaco por anticuerpo en las preparaciones de ADC procedentes de reacciones de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales, tales como espectroscopía de masas y ensayo ELISA. La distribución cuantitativa de los ADC en términos de p también puede determinarse. En algunos casos, puede lograrse la separación, la purificación y la caracterización de ADC homogéneos, en los que p es un valor concreto de ADC con otras cargas de fármaco, por medios tales como la electroforesis.

Para algunos conjugados de fármaco-anticuerpo, p puede estar limitado por el número de sitios de unión sobre el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión es un tiol de cisteína, como los anteriores ejemplos de realizaciones, un anticuerpo puede tener solo uno o varios grupos tiol de cisteína, o puede tener solo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales puede unirse un conector. En ciertas realizaciones, una carga de fármaco mayor, por ejemplo, $p > 5$, puede provocar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de la permeabilidad celular de ciertos conjugados de fármaco-anticuerpo. En ciertas realizaciones, la carga del fármaco para un ADC de la invención varía de 1 a aproximadamente 12; de 1 a aproximadamente 8; de aproximadamente 2 a aproximadamente 6; de aproximadamente 3 a aproximadamente 5; de aproximadamente 3 a aproximadamente 4; de aproximadamente 3,1 a aproximadamente 3,9; de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,8; de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,7; de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,6; de aproximadamente 3,3 a aproximadamente 3,8; o de aproximadamente 3,3 a aproximadamente 3,7. En efecto, se ha demostrado que, para ciertos ADC, la proporción óptima de restos de fármaco por anticuerpo puede ser menor que 8, y puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 5. Véase el documento US 2005-0238649 A1.

En ciertas realizaciones, se conjugan menos que el máximo teórico de restos de fármaco a un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, restos lisina que no reaccionan con el intermedio de fármaco-conector o con el reactivo conector, tal como se analiza a continuación. En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de cisteína libres y reactivos que puedan unirse a un resto de fármaco; en efecto, la mayoría de los restos tiol de cisteína en los anticuerpos aparecen como puentes disulfuro. En ciertas realizaciones, un anticuerpo puede reducirse con un agente reductor, tal como ditioneitol (DTT) o tricarbonyltilfosfina (TCEP), bajo condiciones reductoras parciales o totales, para generar grupos tiol de cisteína reactivos. En ciertas realizaciones, un anticuerpo se somete a condiciones desnaturizantes para revelar los grupos nucleófilos reactivos, tales como lisina o cisteína.

La carga (proporción de fármaco/anticuerpo) de un ADC puede controlarse de diferentes formas, por ejemplo: (i) limitando el exceso molar del intermedio de fármaco-conector o del reactivo de conector con relación al anticuerpo,

(ii) limitando el tiempo o la temperatura de reacción de la conjugación, (iii) empleando condiciones reductoras parciales o limitantes para la modificación del tiol de cisteína, (iv) modificando, por medio de técnicas recombinantes, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo, de modo que el número y la posición de los restos cisteína se modifica para controlar el número y/o la posición de las uniones de conector-fármaco (tal como tioMab o tioFab preparados como se describe en la presente y en el documento WO2006/034488).

Debe entenderse que cuando más de un grupo nucleófilo reacciona con un intermedio de fármaco-conector o un reactivo de conector, seguido de un 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 promedio de fármacos por anticuerpo puede calcularse a partir de la mezcla mediante un ensayo de anticuerpos ELISA dual, que sea específico para el anticuerpo y específico para el fármaco. Las moléculas de ADC individuales pueden identificarse en la mezcla mediante espectroscopía de masas y separarse mediante HPLC, por ejemplo, una cromatografía de interacción hidrofóbica (véase, por ejemplo, Hamblett, K. J., *et al.*, "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", resumen n.º 624, American Association for Cancer Research, Reunión Anual de 2004, 27-31 de marzo, 2004, *Proceedings of the AACR*, volumen 45, marzo de 2004; Alley, S. C., *et al.*, "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates", resumen n.º 627, American Association for Cancer Research, Reunión Anual de 2004, 27-31 de marzo, 2004, *Proceedings of the AACR*, volumen 45, marzo de 2004). En ciertas realizaciones, puede aislarse un ADC homogéneo con un único valor de carga a partir de la mezcla de conjugación mediante electroforesis o cromatografía.

Métodos para determinar el efecto citotóxico de los ADC

Los métodos para determinar si un fármaco o un conjugado de fármaco-anticuerpo ejerce un efecto citostático y/o citotóxico sobre una célula son conocidos. En general, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado de fármaco y anticuerpo puede medirse exponiendo células de mamífero que expresan una proteína diana del conjugado de fármaco y anticuerpo a un medio de cultivo; cultivando las células durante un periodo de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 5 días; y midiendo la viabilidad de las células. Pueden emplearse ensayos *in vitro* basados en células para medir la viabilidad (proliferación), la citotoxicidad, y la inducción de la apoptosis (activación de caspasa) del conjugado de fármaco y anticuerpo.

Para determinar si un conjugado de fármaco y anticuerpo ejerce un efecto citostático, puede emplearse un ensayo de incorporación de timidina. Por ejemplo, pueden cultivarse células de cáncer que expresan un antígeno diana a una densidad de 5.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos durante un periodo de 72 horas y exponerse a 0,5 μCi de ^3H -timidina durante las 8 horas finales del periodo de 72 horas. Se mide la incorporación de ^3H -timidina a las células del cultivo en presencia y en ausencia del conjugado de fármaco y anticuerpo.

Para determinar la citotoxicidad, puede medirse la necrosis o la apoptosis (muerte celular programada). La necrosis generalmente viene acompañada de un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática, un hinchamiento de la célula y la ruptura de la membrana plasmática. La apoptosis se caracteriza generalmente por formación de ampollas en la membrana, la condensación del citoplasma y la activación de endonucleasas endógenas. La determinación de cualquier de estos efectos en células de cáncer indica que un conjugado de fármaco-anticuerpo es útil para el tratamiento de cánceres.

La viabilidad celular puede medirse determinando en una célula la captación de un tinte, tal como rojo neutro, azul de tripano o azul ALAMAR™ (véase, por ejemplo, Page, *et al.*, 1993, *Intl. J. Oncology*, 3:473-476). En este ensayo, las células se incuban en medio que contiene el tinte, las células se lavan, y el tinte que permanece, que refleja la captación celular del tinte, se mide de modo espectrofotométrico. También puede emplearse el tinte de unión a proteínas sulforrodamina B (SRB) para medir la citotoxicidad (Skehan, *et al.*, 1990, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82:1107-12).

Como alternativa, se emplea una sal de tetrazolio, tal como MTT, en un ensayo colorimétrico cuantitativo para la supervivencia y la proliferación de células de mamífero detectando las células vivas, pero no las muertas (véase, por ejemplo, Mosmann, 1983, *J. Immunol. Methods*, 65:55-63).

La apoptosis puede cuantificarse midiendo, por ejemplo, la fragmentación del ADN. En el mercado están disponibles métodos fotométricos para la determinación cuantitativa *in vitro* de la fragmentación del ADN. Se han descrito ejemplos de dichos ensayos, que incluyen ensayos TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados en el ADN fragmentado) y basados en ELISA en *Biochemica*, 1999, n.º 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

La apoptosis también puede determinarse midiendo los cambios morfológicos en una célula. Por ejemplo, al igual que con la necrosis, la pérdida de la integridad de la membrana plasmática puede determinarse midiendo la captación de ciertos tintes (por ejemplo, un tinte fluorescente, tal como, por ejemplo, naranja de acridina o bromuro de etidio). Se ha descrito un método para medir el número de células apoptóticas en Duke y Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan *et al.*, eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16). Las células también pueden marcarse con un tinte de ADN (por ejemplo, naranja de acridina, bromuro de etidio o yoduro de propidio) y las células pueden

observarse para detectar la condensación de la cromatina y la marginación a lo largo de la membrana nuclear interna. Otros cambios morfológicos que pueden medirse para determinar la apoptosis incluyen, por ejemplo, la condensación citoplásmica, el aumento en las ampollas de la membrana y el encogimiento celular.

5 La presencia de células apoptóticas puede medirse en los compartimentos unidos y "flotantes" de los cultivos. Por ejemplo, ambos compartimentos pueden recogerse retirando el sobrenadante, tripsinizando las células unidas, combinando las preparaciones tras una etapa de lavado con centrifugación (por ejemplo, 10 minutos a 2000 rpm), y detectando la apoptosis (por ejemplo, midiendo la fragmentación del ADN) (véase, por ejemplo, Piazza, *et al.*, 1995, *Cancer Research*, 55:3110-16).

10 *In vivo*, el efecto de una composición terapéutica de 161P2F10B puede evaluarse en un modelo animal adecuado. Por ejemplo, pueden emplearse modelos de cáncer xenogénicos, en los que explantes de cáncer o tejido de xenoinjerto transferido se introducen en animales inmunocomprometidos, tales como ratones atímicos ("nude") o SCID (Klein, *et al.*, 1997, *Nature Medicine*, 3: 402-408). Por ejemplo, la solicitud de patente PCT WO98/16628 y la patente de EE. UU. n.º 6.107.540 describen diversos modelos de xenoinjerto de cáncer de próstata humano capaces de recapitular el desarrollo de tumores primarios, micrometástasis, y la formación de metástasis osteoblásticas características de la enfermedad en su estadio tardío. La eficacia puede predecirse empleando ensayos que miden la inhibición de la formación de tumores, la regresión o la metástasis de tumores, y similares.

15 Los ensayos *in vivo* que evalúan la estimulación de la apoptosis son útiles para evaluar las composiciones terapéuticas. En una realización, los xenoinjertos procedentes de ratones que portan tumores tratados con la composición terapéutica pueden estudiarse para detectar la presencia de focos apoptóticos y compararse con ratones que portan xenoinjertos control no tratados. El grado en que se encuentran los focos apoptóticos en los tumores de los ratones tratados proporciona una indicación de la eficacia terapéutica de la composición.

20 Las composiciones terapéuticas empleadas en la práctica de los anteriores métodos pueden formularse en composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo adecuado para el método de administración deseado. Los vehículos adecuados incluyen cualquier material que, cuando se combina con la composición terapéutica, conserva la función antitumoral de la composición terapéutica y, en general, no es reactivo con el sistema inmunológico del paciente. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a cualquiera de una serie de vehículos farmacéuticos convencionales, tales como disoluciones salinas tamponadas con fosfato estériles, agua bacteriostática y similares (véase, en general, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, A. Osal., ed., 1980).

25 Las formulaciones terapéuticas pueden solubilizarse y administrarse a través de cualquier vía capaz de transportar la composición terapéutica hacia el sitio del tumor. Las vías de administración potencialmente eficaces incluyen, pero no se limitan a la vía intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intraórgano, ortotópica y similares. Una formulación preferida para la inyección intravenosa comprende la composición terapéutica en una disolución de agua bacteriostática con conservantes, agua estéril sin conservantes y/o diluida en bolsas de poli(cloruro de vinilo) o polietileno que contienen cloruro de sodio estéril para inyección al 0,9%, USP. Las preparaciones de proteínas terapéuticas pueden liofilizarse y conservarse como polvos estériles, preferiblemente al vacío, y después reconstituirse en agua bacteriostática (que contenga, por ejemplo, conservante de alcohol bencílico) o en agua estéril antes de la inyección.

30 Las dosificaciones y protocolos de administración para el tratamiento de cánceres empleando los anteriores métodos variarán según el método y el cáncer diana, y en general dependerán de una serie de otros factores conocidos en la técnica.

Tratamiento de cáncere(s)

35 La identificación de 161P2F10B como una proteína que normalmente se expresa en un conjunto restringido de tejidos, pero que también se expresa en cánceres, tales como los listados en la tabla I, abre una serie de estrategias terapéuticas para el tratamiento de dichos cánceres.

40 Merece mencionarse que las terapias antitumorales dirigidas han resultado útiles incluso cuando la proteína diana se expresa en tejidos normales, incluso en tejidos de órganos vitales normales. Un órgano vital es un órgano que es necesario para mantener la vida, tal como el corazón o el colon. Un órgano no vital es un órgano que puede retirarse, tras lo cual el individuo aún es capaz de sobrevivir. Los ejemplos de órganos no vitales son el ovario, la mama y la próstata.

45 La expresión de una proteína diana en tejido normal, incluso en tejido vital normal, no frustra la utilidad de un agente de transporte dirigido para la proteína como producto terapéutico para ciertos tumores en los que la proteína también está sobreexpresada. Por ejemplo, la expresión en órganos vitales no es en sí misma perjudicial. Además, los órganos considerados como prescindibles, tales como la próstata y el ovario, puede retirarse sin afectar a la mortalidad. Por último, algunos órganos vitales no se ven afectados por la expresión normal en órganos debido a un inmunoprivilegio. Los órganos inmunoprivilegiados son órganos que están protegidos frente a la sangre mediante una barrera entre la sangre y el órgano y, por tanto, no son accesibles a la inmunoterapia. Los ejemplos de órganos

inmunoprivilegiados son el cerebro y los testículos.

Por consiguiente, las estrategias terapéuticas que inhiben la actividad de una proteína 161P2F10B son útiles para pacientes que padecen un cáncer que expresa 161P2F10B. Estas estrategias terapéuticas en general pertenecen a tres clases. La primera clase modula la función de 161P2F10B cuando se relaciona con el crecimiento de células tumorales, lo cual conduce a la inhibición o el retraso en el crecimiento de las células tumorales o se induce su destrucción. La segunda clase comprende diversos métodos para inhibir la unión o la asociación de una proteína 161P2F10B con su compañero de unión o con otras proteínas. La tercera clase comprende una diversidad de métodos para inhibir la transcripción de un gen de 161P2F10B o la traducción del ARNm de 161P2F10B.

Por consiguiente, los pacientes con cáncer pueden evaluarse para la presencia y el nivel de expresión de 161P2F10B, preferiblemente empleando evaluaciones inmunohistoquímicas de tejido tumoral, formación de imágenes de 161P2F10B cuantitativas u otras técnicas que indiquen, de forma fiable, la presencia y el grado de expresión de 161P2F10B. Se prefiere el análisis inmunohistoquímico de biopsias de tumores o especímenes quirúrgicos para este fin. Los métodos para el análisis inmunohistoquímico de tejidos tumorales son muy conocidos en la técnica.

XIII.) 161P2F10B como diana para una terapia basada en anticuerpos

La 161P2F10B es una diana atractiva para estrategias terapéuticas basadas en anticuerpos. En la técnica se conocen una serie de estrategias de anticuerpos que se dirigen a moléculas extracelulares e intracelulares (véase, por ejemplo, la destrucción mediada por el complemento y por ADCC, así como el uso de intracuerpos). Debido a que 161P2F10B es expresada por células de cáncer de diversos linajes, con relación a las correspondientes células normales, se preparan composiciones inmunorreactivas con 161P2F10B de administración sistémica que muestran una excelente sensibilidad sin efectos tóxicos, no específicos y/o no dirigidos provocados por la unión de la composición inmunorreactiva a órganos y tejidos que no son la diana. Los anticuerpos específicamente reactivos con dominios de 161P2F10B son útiles para tratar el cáncer (preferiblemente, los cánceres de la tabla I, más preferiblemente cáncer de riñón y/o hígado) de modo sistémico, preferiblemente como conjugados de fármaco y anticuerpo (es decir, ADC), en los que el conjugado contiene una toxina o un agente terapéutico.

Los expertos en la técnica entienden que los anticuerpos pueden emplearse para dirigirse y unirse específicamente a moléculas inmunogénicas, tales como una región inmunogénica de una secuencia de 161P2F10B mostrada en la figura 1. Además, los expertos en la técnica comprenden que es normal la conjugación de anticuerpos con agentes citotóxicos (véase, por ejemplo, *et al.*, *Blood*, 93:11 3678-3684 (1 de junio, 1999)). Cuando los agentes citotóxicos y/o terapéuticos se administran directamente a las células, tal como mediante su conjugación con anticuerpos específicos para una molécula expresada por esa célula (por ejemplo, 161P2F10B), el agente citotóxico ejercerá su efecto biológico conocido (concretamente, la citotoxicidad) sobre esas células.

En la técnica se conoce una amplia diversidad de composiciones y métodos para emplear conjugados de agente citotóxico-anticuerpo para destruir células. En el contexto de los cánceres, los métodos típicos suponen la administración a un mamífero que porta un tumor de una cantidad biológicamente eficaz de un conjugado que comprende un agente citotóxico y/o terapéutico seleccionado unido a un agente de transporte dirigido (por ejemplo, un MAb de 161P2F10B, preferiblemente H16-7.8) que se une a un antígeno (por ejemplo, 161P2F10B) expresado, que es accesible para la unión o que se localiza en la superficie celular. Una realización típica es un método para transportar un agente citotóxico y/o terapéutico a una célula que expresa 161P2F10B, que comprende conjugar el agente citotóxico a un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente con un epitopo de 161P2F10B, y exponer la célula al conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC). Otra realización ilustrativa es un método para tratar un individuo que se sospecha que padece un cáncer metastatizado, que comprende una etapa de administrar por vía parenteral a dicho individuo una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico y/o terapéutico.

La inmunoterapia del cáncer empleando anticuerpos de 161P2F10B puede realizarse según diversas estrategias que se han empleado con éxito en el tratamiento de otros tipos de cánceres, que incluyen, pero no se limitan a cáncer de colon (Arlen, *et al.*, 1998, *Crit. Rev. Immunol.*, 18:133-138), mieloma múltiple (Ozaki, *et al.*, 1997, *Blood*, 90:3179-3186; Tsunenari, *et al.*, 1997, *Blood*, 90:2437-2444), cáncer gástrico (Kasprzyk, *et al.*, 1992, *Cancer Res.*, 52:2771-2776), linfoma de células B (Funakoshi, *et al.*, 1996, *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.*, 19:93-101), leucemia (Zhong, *et al.*, 1996, *Leuk. Res.*, 20:581-589), cáncer colorrectal (Moun, *et al.*, 1994, *Cancer Res.*, 54:6160-6166; Velders, *et al.*, 1995, *Cancer Res.*, 55:4398-4403), y cáncer de mama (Shepard, *et al.*, 1991, *J. Clin. Immunol.*, 11:117-127). Algunas estrategias terapéuticas implican la conjugación de anticuerpos desnudos a una toxina o un radioisótopo, tal como la conjugación de Y^{91} o I^{131} a anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo, Zevalin™, IDEC Pharmaceuticals Corp., o Bexxar™ Coulter Pharmaceuticals), respectivamente, mientras que otras implican la coadministración de anticuerpos y otros agentes terapéuticos, tales como Herceptin™ (trastuzumab) con paclitaxel (Genentech, Inc.).

En una realización preferida, los anticuerpos se conjugan con un agente citotóxico, como se indicó anteriormente, y preferiblemente con un derivado de auristatina denominado MMAF (Seattle Genetics).

Los anticuerpos monoclonales preferidos empleados en los métodos terapéuticos de la invención son los que son totalmente humanos y se unen específicamente al antígeno de 161P2F10B diana con alta afinidad.

XIV.) Cócteles de ADC de 161P2F10B

5 Los métodos terapéuticos de la invención contemplan la administración de ADC de 161P2F10B individuales, así como combinaciones o cócteles de diferentes MAb (concretamente, MAb de 161P2F10B o MAb que se unen a otra proteína). Estos cócteles de MAb pueden tener ciertas ventajas, ya que contienen MAb que se dirigen a diferentes epitopos, aprovechan diferentes mecanismos efectores o combinan directamente MAb citotóxicos con MAb que se basan en una funcionalidad de efector inmunológico. Estos MAb en combinación pueden mostrar unos efectos terapéuticos sinérgicos. Además, los MAb de 161P2F10B pueden administrarse concomitantemente con otras modalidades terapéuticas que incluyen, pero no se limitan a diversos agentes quimioterapéuticos y biológicos, 10 bloqueantes de andrógenos, inmunomoduladores (por ejemplo, IL-2, GM-CSF), cirugía o radiación. En una realización preferida, los MAb de 161P2F10B se administran en forma conjugada.

15 Las formulaciones de ADC de 161P2F10B se administran a través de cualquier vía capaz de transportar los anticuerpos a una célula tumoral. Las vías de administración incluyen, pero no se limitan a la vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica y similares. El tratamiento en general implica la administración repetida de la preparación de ADC de 161P2F10B a través de una vía de administración aceptable, tal como la inyección intravenosa (IV), generalmente a una dosis en el intervalo que incluye, pero no se limita a 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, o 25 mg/kg de peso corporal. En general, las dosis en el intervalo de 10-1000 mg de MAb semanales son eficaces y bien toleradas.

20 Basándose en la experiencia clínica con Herceptin® (trastuzumab) para el tratamiento del cáncer de mama metastásico, una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg de peso corporal del paciente por vía intravenosa, seguida de dosis semanales de aproximadamente 2 mg/kg por vía intravenosa de la preparación de MAb representa un régimen de dosificación aceptable. Preferiblemente, la dosis de carga inicial se administra como una infusión de 90 o más minutos. La dosis de mantenimiento periódica se administra como una infusión de 30 o 25 más minutos, con la condición de que la dosis inicial haya sido bien tolerada. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, diversos factores pueden influir en el régimen de dosis ideal en un caso concreto. Estos factores incluyen, por ejemplo, la afinidad de unión y la semivida de los MAb empleados, el grado de expresión de 161P2F10B en el paciente, el grado de antígeno de 161P2F10B desprendido en la circulación, el nivel de concentración de anticuerpo en estado estacionario deseado, la frecuencia del tratamiento y la influencia de agentes quimioterapéuticos u otros 30 agentes empleados en combinación con el método de tratamiento de la invención, así como el estado de salud de un paciente concreto.

Opcionalmente, los pacientes deberían evaluarse para determinar los niveles de 161P2F10B en una muestra concreta (por ejemplo, los niveles de antígeno de 161P2F10B en la circulación y/o las células que expresan 161P2F10B) para ayudar a determinar el régimen de dosificación más eficaz, etc. Estas evaluaciones también se emplean para fines de control a lo largo de la terapia, y son útiles para calibrar el éxito terapéutico en combinación con la evaluación de otros parámetros (por ejemplo, citología de la orina y/o niveles de ImmunoCyt en la terapia del cáncer de vejiga o, por analogía, los niveles de PSA en suero en la terapia del cáncer de próstata). 35

40 Un objeto de la presente invención es proporcionar ADC de 161P2F10B, que inhiben o retrasan el crecimiento de células tumorales, preferiblemente células tumorales de la tabla I. Otro objeto de esta invención es proporcionar métodos para inhibir la angiogénesis y otras funciones biológicas y, así, reducir el crecimiento de tumores en mamíferos, preferiblemente seres humanos, empleando dichos ADC de 161P2F10B, y, en particular, empleando dichos ADC de 161P2F10B combinados con otros fármacos o tratamientos inmunológicamente activos.

XV.) Terapia de combinación

45 En una realización, existe una sinergia cuando los tumores, incluyendo tumores humanos, se tratan con ADC de 161P2F10B junto con agentes quimioterapéuticos o radiación o sus combinaciones. En otras palabras, la inhibición del crecimiento tumoral por un ADC de 161P2F10B se potencia aún más de lo esperado cuando se combina con agentes quimioterapéuticos o radiación o sus combinaciones. La sinergia puede demostrarse, por ejemplo, por una mayor inhibición del crecimiento tumoral con un tratamiento combinado que la que se esperaría con un tratamiento solo con ADC de 161P2F10B o con el efecto aditivo del tratamiento con un ADC de 161P2F10B y un agente quimioterapéutico o radiación. Preferiblemente, la sinergia se demuestra por la remisión del cáncer cuando no se 50 espera remisión como resultado de un tratamiento con ADC de 161P2F10B o un tratamiento que emplea una combinación aditiva de un ADC de 161P2F10B y un agente quimioterapéutico o radiación.

55 El método para inhibir el crecimiento de células tumorales empleando un ADC de 161P2F10B y una combinación de quimioterapia o radiación o ambas, comprende administrar el ADC de 161P2F10B antes, durante o después de comenzar la quimioterapia o la terapia de radiación, así como cualquiera de sus combinaciones (es decir, antes y durante, antes y después, durante y después, o antes, durante y después de comenzar la quimioterapia y/o la terapia de radiación). Por ejemplo, el ADC de 161P2F10B generalmente se administra entre 1 y 60 días, preferiblemente entre 3 y 40 días, más preferiblemente entre 5 y 12 días antes de comenzar la terapia de radiación

y/o la quimioterapia. Sin embargo, dependiendo del protocolo de tratamiento y de las necesidades específicas del paciente, el método se realiza de una manera que proporciona el tratamiento más eficaz y que, en último término, prolongue la vida del paciente.

- 5 La administración de los agentes quimioterapéuticos puede lograrse por medio de una diversidad de formas, que incluyen sistémicamente por medio de las vías parenteral y entérica. En una realización, los ADC de 161P2F10B y el agente quimioterapéutico se administran como moléculas separadas. Los ejemplos concretos de agentes quimioterapéuticos o de quimioterapia incluyen cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomomicina, mecloretamina (gas mostaza), estreptozocina, ciclofosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina), daunorubicina, procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo, vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxótero), aldesleuquina, asparaginasa, busulfano, carboplatino, cladribina, dacarbazina, floxuridina, fludarabina, hidroxiaurea, ifosfamida, interferón alfa, leuprolida, megestrol, melfalano, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, plicamicina, estreptozocina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo, taxol y sus combinaciones.
- 10
- 15 La fuente de radiación, empleada en combinación con un ADC de 161P2F10B, puede ser externa o interna al paciente que se está tratando. Cuando la fuente es externa al paciente, la terapia se denomina terapia de radiación de haz externo ("external beam radiation therapy", EBRT). Cuando la fuente de radiación es interna al paciente, el tratamiento se denomina braquiterapia (BT).
- Los regímenes terapéuticos descritos anteriormente pueden combinarse además con otros agentes y/o regímenes de tratamiento del cáncer, por ejemplo, otra quimioterapia, vacunas del cáncer, inhibidores de la transducción de señales, agentes útiles para tratar el crecimiento anómalo de células o el cáncer, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-CTLA-4, tal como se describe en el documento WO2005/092380 (Pfizer)) u otros ligandos que inhiben el crecimiento tumoral mediante su unión a IGF-1R, y citoquinas.
- 20
- 25 Cuando el mamífero se somete a otra quimioterapia, pueden emplearse los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente. Además, pueden emplearse inhibidores del factor de crecimiento, modificadores de la respuesta biológica, terapia antihormonal, moduladores del receptor de estrógeno selectivos ("selective estrogen receptor modulator", SERM), inhibidores de la angiogénesis, y antiandrógenos. Por ejemplo, pueden emplearse antihormonas, por ejemplo, antiestrógenos, tales como Nolvadex (tamoxifeno) o antiandrógenos, tales como Casodex (4'-ciano-3-(4-fluorofenilsulfonil)-2-hidroxi-2-metil-3'-(trifluorometil)propionanilida).
- 30 Las anteriores estrategias terapéuticas pueden combinarse con cualquiera de una amplia diversidad de regímenes de terapia de radiación, quimioterapia o cirugía. Las estrategias terapéuticas de la invención permiten el uso de dosis reducidas de quimioterapia (u otras terapias) y/o una administración menos frecuente, una ventaja para todos los pacientes y, en particular, para los que no toleran bien la toxicidad del agente quimioterapéutico.

XVI.) Kits/artículos manufacturados

- 35 Para su uso en las aplicaciones de laboratorio, de pronóstico, profilácticas, de diagnóstico y terapéuticas descritas en la presente, los kits están incluidos en el alcance de la invención. Estos kits pueden comprender un vehículo, un envase o un recipiente que esté compartimentalizado para recibir uno o más recipientes, tales como viales, tubos, y similares, y cada uno de los recipientes comprende uno de los elementos separados que se van a utilizar en el método, junto con una etiqueta o un inserto que comprende instrucciones para su uso, tal como un uso descrito en la presente. Por ejemplo, el recipiente o recipientes pueden comprender un anticuerpo es está o puede estar marcado de modo detectable. Los kits pueden comprender un recipiente que comprende una unidad de fármaco. El kit puede incluir todas o parte de las secuencias de aminoácidos de la figura 2 o la figura 3, o sus análogos, o una molécula de ácido nucleico que codifica dichas secuencias de aminoácidos.
- 40
- 45 El kit de la invención generalmente comprende el recipiente descrito anteriormente y uno o más recipientes distintos asociados que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas; etiquetas del vehículo, paquete, recipiente, vial y/o tubo que listan los contenidos y/o las instrucciones de uso; e insertos del paquete con instrucciones de uso.
- Puede estar presente una etiqueta sobre el recipiente o acompañando al recipiente para indicar que la composición se emplea para una terapia específica o una aplicación no terapéutica, tal como una aplicación de pronóstico, profiláctica, de diagnóstico o de laboratorio, y también puede contener indicaciones para el uso *in vivo* o *in vitro*, tales como las descritas en la presente. Las indicaciones y/u otra información también pueden incluirse en uno o más insertos o etiquetas que se incluyan dentro o sobre el kit. La etiqueta puede estar sobre el recipiente o asociado a él. Una etiqueta puede estar sobre un recipiente, de modo que las letras, números u otros caracteres que forman la etiqueta estén moldeados o grabados en el propio recipiente, o una etiqueta puede estar asociada con un recipiente cuando está presente dentro de receptáculo o portador que también aloja el recipiente, por ejemplo, como un inserto del paquete. La etiqueta puede indicar que la composición se emplea para realizar un diagnóstico, un tratamiento, una profilaxis o un pronóstico de un trastorno, tal como un cáncer de un tejido indicado en la tabla I.
- 50
- 55

El término “kit” y la expresión “artículo manufacturado” pueden emplearse como sinónimos.

En otra realización de la invención, se proporcionan uno o más artículos manufacturados que contienen composiciones, tales como conjugados de fármaco y anticuerpo (ADC), por ejemplo, materiales útiles para el diagnóstico, la prognosis, la profilaxis y/o el tratamiento de cánceres de tejidos, tales como los que se indican en la tabla I. El artículo manufacturado generalmente comprende al menos un recipiente y al menos una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados por una diversidad de materiales, tales como vidrio, metal o plástico. El recipiente puede contener una o más secuencias de aminoácidos, una o más moléculas pequeñas, una o más secuencias de ácidos nucleicos, una o más poblaciones de células y/o uno o más anticuerpos. En otra realización, un recipiente también comprende un anticuerpo, uno de sus fragmentos de unión o una proteína de unión específica para su uso para evaluar la expresión de proteínas de 161P2F10B en células y tejidos, o para objetivos de laboratorio, pronóstico, diagnóstico, profilaxis y terapéuticos pertinentes; pueden incluirse indicaciones y/o instrucciones para dichos usos sobre dicho recipiente o dentro de él, así como reactivos y otras composiciones o herramientas empleadas para estos fines.

Como alternativa, el recipiente puede contener una composición que es eficaz para tratar, diagnosticar, realizar una prognosis o una profilaxis de un trastorno, y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial con un tapón que puede atravesar una aguja de inyección hipodérmica). Los agentes activos en la composición pueden ser un conjugado de fármaco y anticuerpo que se une específicamente a 161P2F10B.

El artículo manufacturado puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como disolución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y/o disolución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agitadores, agujas, jeringas y/o insertos del paquete con indicaciones y/o instrucciones de uso.

Ejemplos

25 Ejemplo 1: El antígeno de 161P2F10B

La secuencia del gen de 161P2F10B se descubrió empleando métodos de hibridación sustractiva de supresión ("Suppression Subtractive Hybridization", SSH) conocidos en la técnica. La secuencia de 161P2F10B SSH de 182 pares de bases ha sido identificada a partir de ADNc procedente de pacientes con cáncer de riñón empleando métodos convencionales. Se aisló un clon de ADNc de longitud completa de 161P2F10B a partir de especímenes de pacientes con cáncer de riñón. El ADNc tiene una longitud de 3858 pb y codifica un ORF ("open reading frame", marco de lectura abierto) de 875 aminoácidos (véase la figura 1). 161P2F10B muestra homología con ENPP3 (véase, Buhning, *et al.*, *Blood*, 97:3303-3305 (2001)). Se cartografía 161P2F10B en el cromosoma 6q22 utilizando métodos conocidos en la técnica. Para otras referencias, véase la patente de EE. UU. n.º 7.279.556 (Agensys, Inc., Santa Monica, CA), la patente de EE. UU. n.º 7.405.290 (Agensys, Inc., Santa Monica, CA) la patente de EE. UU. n.º 7.067.130 (Agensys, Inc., Santa Monica, CA) y la patente de EE. UU. n.º 7.226.594 (Agensys, Inc., Santa Monica, CA).

Ejemplo 2: Generación de anticuerpos monoclonales (MAb) de 161P2F10B

En una realización los anticuerpos monoclonales ("MAb") terapéuticos contra 161P2F10B comprenden los anticuerpos que reaccionan con epitopos específicos para proteínas que se unen, internalizan, alteran o modula la función biológica de 161P2F10B, por ejemplo, los anticuerpos que alteran la interacción con ligandos, sustratos y compañeros de unión. Los inmunógenos para la generación de dichos MAb incluyen los inmunógenos diseñados para codificar o contener los dominios extracelulares o la secuencia de la proteína 161P2F10B completa, y regiones que se predice que contengan motivos funcionales que se cree que son antigénicos a partir de un análisis informático de la secuencia de aminoácidos. Los inmunógenos incluyen péptidos y proteínas recombinantes, tales como tag5-161P2F10B, una proteína marcada con His derivada de una célula de mamífero purificada. Además, se emplean células modificadas a través de una transducción retroviral para que expresen niveles elevados de 161P2F10B, tales como RAT1-161P2F10B, para inmunizar ratones.

Se generaron los MAb contra 161P2F10B empleando la tecnología XenoMouse® (Amgen Fremont), en la que los loci de las cadenas ligera kappa y cadena pesada murinas han sido inactivados y se ha insertado la mayoría de los loci de cadena ligera kappa y cadena pesada de inmunoglobulina humana. Se generó el MAb denominado H16-7.8 a partir de una inmunización de XenoMice que producen $\gamma 2$ con células Tag5-161P2F10B.

El MAb de 161P2F10B H16-7.8 se une específicamente a células que expresan 161P2F10B recombinante (SEQ ID NO:2) y 161P2F10B endógeno expresado sobre la superficie celular en células de xenoinjerto de cáncer.

Se determinaron las secuencias codificadoras de ADN del MAb de 161P2F10B H16-7.8 después de aislar ARNm de las respectivas células de hibridoma con reactivo TRIzol® (Life Technologies, Gibco BRL).

Se secuenciaron las secuencias de ácidos nucleicos de la cadena variable ligera y pesada de anti-161P2F10B H16-7.8 a partir de células de hibridoma empleando el siguiente protocolo. Se lisaron células de hibridoma que segregan H16-7.8 con reactivo TRIzol® (Life Technologies, Gibco BRL). El ARN total fue purificado y cuantificado. Se generaron las primeras hebras del ADNc a partir del ARN total como cebado con oligos (dT) 12-18 empleando el sistema de preamplificación Gibco®-BRL Superscript. La primera hebra del ADNc se amplificó empleando cebadores de cadena pesada variables de inmunoglobulina humana y cebadores de cadena ligera variable de inmunoglobulina humana. Los productos de la PCR se secuenciaron y se determinaron las regiones variables de cadena ligera y pesada.

Las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera y pesada se listan en la figura 2 y la figura 3. La región variable de cadena pesada de H16-7.8 consiste en la secuencia de aminoácidos que abarca desde el 20° resto Q al 142° resto S de SEQ ID NO:7, y la región variable de cadena ligera de H16-7.8 que consiste en la secuencia de aminoácidos que abarca desde el 20° resto E hasta el 127° resto R de SEQ ID NO:8. La cadena pesada de H16-7.8 consiste en la secuencia de aminoácidos que abarca desde el 20° resto Q al 468° resto K de SEQ ID NO:7, y la cadena ligera de H16-7.8 que consiste en la secuencia de aminoácidos que abarca desde el 20° resto E hasta el the 233° resto C de la secuencia de SEQ ID NO:8. El alineamiento de H16-7.8 con la línea germinal humana VH4-31/D5-12/JH6 y la línea germinal humana A26/JK1 se indica en las figuras 4A-4B.

Ejemplo 3: Expresión de H16-7.8 empleando métodos de ADN recombinante

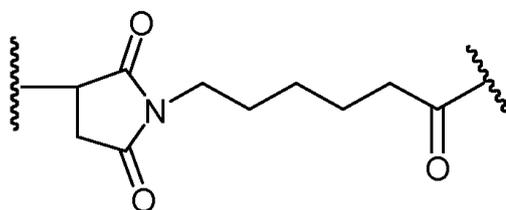
Para expresar H16-7.8 de modo recombinante en células transfectadas, se clonaron las secuencias de cadena ligera y pesada de H16-7.8 (SEQ ID NO:7, desde 20 a 468, y la cadena ligera de SEQ ID NO:8, desde 20 a 233) en vectores de expresión. Se clonaron los módulos de la cadena ligera y la cadena pesada humana de H16-7.8 completos cadena abajo del potenciador/promotor de CMV en un vector de expresión. Se incluyó un sitio de poliadenilación cadena abajo de la secuencia codificadora de MAb. Las construcciones que expresan H16-7.8 recombinante se transfectaron en células CHO y el H16-7.8 recombinante fue segregado por las células CHO. Se midieron las titulaciones de IgG mediante ELISA. Los resultados confirman la IgG y la expresión, y una buena coexpresión de las cadenas pesada y ligera. Se evaluó el H16-7.8 recombinante para su unión a 161P2F10B de la superficie celular mediante citometría de flujo (figura 5). Se tiñeron células 3T3-control y 3T3-161P2F10B con H16-7.8 recombinante procedente de células de hibridoma o CHO transfectadas con construcciones de vector de cadena ligera y pesada de H16-7.8.

La unión se detectó mediante citometría de flujo. Los resultados demuestran que se segrega H16-7.8 expresado recombinantemente en células CHO y que se une específicamente a 161P2F10B en la superficie celular (figura 5).

El H16-7.8 recombinante se caracterizó con respecto a su secuencia peptídica. El análisis del cartografiado de péptidos de H16-7.8 confirma que la secuencia de aminoácidos deducida de H16-7.8 es correcta frente a la secuencia determinada empleando digestión de Lys-C con LC-MS/MS, digestión de Asp-N con LC-MS/MS, y secuencia N-terminal mediante degradación de Edman.

Ejemplo 4: Conjugación del fármaco y anticuerpo a H16-7.8

El H16-7.8 (figura 2) se conjugó con una dolavalina-valina-dolaisoleucina-dolaproína-fenilalanina (derivado de aurastatina) denominada MMAF (fórmula XVIV; monometil auristatina F) empleando un conector no escindible de maleimidocaproilo (mc) indicado a continuación:



La síntesis del conector no escindible de maleimidocaproilo (mc) al MMAF (Seattle Genetics, Seattle, WA) se completó (SAFC, Madison, WI) empleando el método de síntesis indicado en la tabla VI para crear el mcMMAF citotóxico.

Después se preparó el conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC) de la invención denominado H16-7.8mcMMAF empleando los siguientes protocolos.

Brevemente, una disolución 10 mg/ml del H16-7.8 en succinato 10 mM a pH 4,5 se sometió a un intercambio de tampón mediante diafiltración. El objetivo del intercambio de tampón es eliminar los componentes del tampón de formulación de H16-7.8 y sustituirlo por un tampón más compatible que esté optimizado para la posterior etapa de "reducción". El anticuerpo se diafiltró contra 6 diavolumenes (DV) de tampón borato de sodio y se concentró hasta

10±1 mg/ml, se enjuagó del sistema, se diluyó hasta 7,5 mg/ml y se filtró a 0,2 µm.

Después se añadió EDTA hasta una concentración final de 5 mM en la mezcla de reacción. Después, los enlaces disulfuro de H16-7.8 fueron parcialmente reducidos con clorhidrato de tris-(2-carboxietil)-fosfina (TCEP) para formar tioles libres (SH). Este proceso se realiza a 37 °C. Está presente EDTA a una concentración de 5 mM durante esta reacción para quelar cualquier catión de metal divalente que podría provocar una reoxidación de SH no deseada. Al final de la etapa de reducción, la temperatura de la disolución reaccionada se disminuyó hasta 20 °C y se analizó para determinar la proporción molar del SH libre y para asegurarse de que se habían generado ≥3,9 de SH por MAb. Para la conjugación, el fármaco-conector mcMMAF se pesó en el aislante y se disolvió en DMSO hasta una concentración de 5,5 mg/ml.

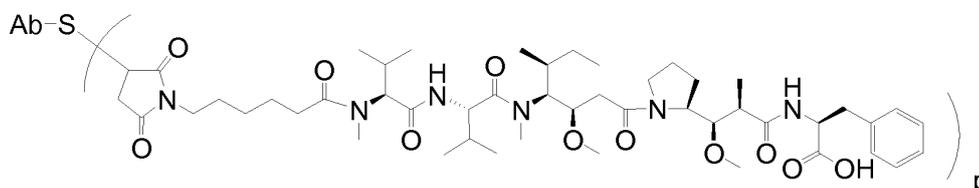
- 5
- 10 Los grupos SH en el H16-7.8 parcialmente reducido se hicieron reaccionar con el fármaco-conector mcMMAF para formar el conjugado, H16-7.8mcMMAF. El mcMMAF en DMSO se añadió a un equivalente molar concreto de fármaco a anticuerpo. Esta etapa se realizó a 20 °C. Después de un periodo de incubación de 1 h, cualquier exceso de fármaco-conector en la reacción se extinguió con N-acetilcisteína, eliminando así cualquier fármaco-conector reactivo y convirtiéndolo en un aducto que es más fácil de retirar y de detectar por medio de métodos analíticos.
- 15 La mezcla después se agita durante quince (15) minutos más tras la adición de un (1) equivalente molar de N-acetilcisteína con relación a mcMMAF.

Después se realiza la ultrafiltración/diafiltración para eliminar el DMSO, procesar las impurezas y cambiar el tampón de ADC a tampón de formulación.

- 20 Así, el exceso de mcMMAF extinguido se retira mediante ultrafiltración/diafiltración del conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC) con 8 diavolumenes de tampón de formulación de histidina 20 mM, pH 5,2. Después de completar el 8º diavolumen, la disolución se recircula y se ensaya para la concentración de proteínas.

El conjugado se ajusta a seis (6) ± 0,5 mg/ml con tampón de histidina 20 mM, trehalosa al 10%, pH 5,2. Después se añade polisorbato 20, se mezcla hasta la homogeneidad y se filtra asépticamente a través de un filtro de 0,2 µm.

El conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC) resultante se denomina H16-7.8mcMMAF y tiene la siguiente fórmula:



- 25 en la que MAb es H16-7.8 (figura 2 y figura 3), y p es de 1 a 12.

Ejemplo 5: Caracterización de H16-7.8 y H16-7.8mcMMAF

- El H16-7.8 se generó utilizando los procedimientos indicados en el ejemplo titulado como ejemplo 2, "Generación de anticuerpos monoclonales (MAb) de 161P2F10B". Además, se generaron los conjugados de fármaco y anticuerpo que se unen a 161P2F10B empleando los procedimientos indicados en el ejemplo titulado "Conjugación del fármaco y anticuerpo a H16-7.8". Los ADC de H16-7.8 y H16-7.8mcMMAF se seleccionaron, se identificaron y se caracterizaron empleando una combinación de ensayos conocidos en la técnica.
- 30

A. Unión a células y determinación de la afinidad mediante FACS

- Se ensayaron H16-7.8 y H16-7.8mcMMAF para la afinidad de unión a 161P2F10B expresado endógenamente sobre células Ku812. Brevemente, once (11) diluciones de H16-7.8 o H16-7.8mcMMAF se incubaron con células Ku812 (50.000 células por pocillo) durante la noche a 4 °C a una concentración final de 160 nM a 0,0001 nM. Al final de la incubación, las células se lavaron y se incubaron con anticuerpo de detección anti-hIgG-PE durante 45 min a 4 °C. Después de lavar los anticuerpos de detección no unidos, las células se analizaron mediante FACS. Se obtuvieron los valores de intensidad de fluorescencia promedio ("Mean Florescence Intensity", MFI) (véase la tabla IV). Los valores de MFI se introdujeron en el programa informático Graphpad Prism y se analizaron empleando la ecuación de un único sitio de unión (hipérbolo) de $Y = B_{max} * X / (Kd + X)$ para generar las curvas de saturación de H16-7.8 o H16-7.8mcMMAF mostradas en la figura 6. Bmax es el valor de MFI en la unión máxima de H16-7.8 o H16-7.8mcMMAF a 161P2F10B; Kd es la afinidad de unión de H16-7.8 o H16-7.8mcMMAF, que es la concentración de H16-7.8 o H16-7.8mcMMAF necesaria para alcanzar la unión semimáxima.
- 35
- 40

- La afinidad calculada (Kd) de H16-7.8 y H16-7.8mcMMAF es de 0,06 nM y 0,19 nM, respectivamente, a una proteína relacionada con 161P2F10B expresada endógenamente sobre la superficie de células Ku812.
- 45

Para determinar la unión de H16-7.8 y H16-7.8mcMMAF a una proteína relacionada con 161P2F10B endógena expresada sobre la superficie de células de cáncer renal, células UGK-3 humanas (células de cáncer renal de

células claras derivadas de paciente) y células RXF-393 (células de cáncer renal de células claras) se tiñeron con 10 µg/ml de H16-7.8 nativo, H16-7.8mcMMAF, o una IgG2 humana de control de isotipo y se evaluaron mediante FACS.

5 Los resultados de la figura 7 (paneles a la izquierda) demuestran una tinción intensa de las dos células de tumor renal diferentes con H16-7.8 (líneas grises), pero no con el MAb control (histogramas oscuros). Los paneles a la derecha muestra una tinción intensa similar de las mismas células de tumor renal con H16-7.8mcMMAF (líneas grises) (figura 7; paneles a la derecha). Estos resultados demuestran que H16-7.8 y H16-7.8mcMMAF se unen al antígeno de 161P2F10B nativo expresado sobre la superficie de células de cáncer humano. La conjugación del H16-7.8 nativo para generar H16-7.8mcMMAF no altera su unión sobre la superficie celular al antígeno de 161P2F10B nativo expresado sobre la superficie de células de cáncer humano.

Ejemplo 6: Citotoxicidad celular mediada por H16-7.8mcMMAF

15 Se evaluó la capacidad de H16-7.8mcMMAF para mediar en la citotoxicidad dependiente de 161P2F10B en células KU812 modificadas para que expresen 161P2F10B. Para este ensayo, se cultivaron en placa 2000 células KU812 viables por triplicado en el día 0 y se dejó que se recuperasen durante la noche. Al día siguiente se añadieron diluciones 1:4 en serie de diferentes lotes de H16-7.8mcMMAF o un MAb control conjugado con mcMMAF para conseguir las concentraciones finales indicadas en la figura 8. Se dejó que las células incubasen durante seis (6) días, tras lo cual se añadieron 20 µl de azul Alamar a cada pocillo. Las placas se incubaron durante cuatro (4) horas más y se leyó la intensidad de fluorescencia en un lector de placas fluorescente empleando una longitud de onda de excitación de 540 nM y una longitud de onda de emisión de 620 nM.

20 Los resultados de la figura 8 demuestran que ambos lotes de H16-7.8mcMMAF inhibían potentemente la proliferación de células KU812. Se determinó que la CI50 era de 0,2 nM y 0,1 nM para el lote (1) y el lote (2), respectivamente. Un MAb control totalmente humano que no se une a células KU812 se conjugó con mcMMAF para producir un DAR de 3,9 (+/-0,2). El ADC control no inhibe la proliferación de células KU812, lo cual demuestra también la especificidad de la citotoxicidad. Así, estos resultados indican que H16-7.8mcMMAF puede transportar selectivamente un fármaco citotóxico a células que expresan 161P2F10B, lo cual conduce a su destrucción.

Ejemplo 7: H16-7.8mcMMAF inhibe el crecimiento de tumores *in vivo*

30 La significativa expresión de 161P2F10B sobre la superficie de células de tejidos tumorales, junto con su expresión restrictiva en tejidos normales hace que 161P2F10B sea una buena diana para la terapia de anticuerpos y, de modo similar, a la terapia con ADC. Así, se evaluó la eficacia terapéutica de H16-7.8mcMMAF en modelos de ratón de xenoinjerto de cáncer renal humano.

Se estudió la eficacia del conjugado de fármaco y anticuerpo sobre el crecimiento tumoral y la formación de metástasis en modelos de xenoinjerto de cáncer de ratón (por ejemplo, subcutánea y ortotópicamente).

35 Se generaron tumores subcutáneos (s.c.) mediante la inyección de 5×10^4 - 10^6 células de cáncer mezcladas a una dilución 1:1 con Matrigel (Collaborative Research) en el flanco derecho de ratones SCID macho. Para ensayar la eficacia de ADC sobre la formación de tumores, concretamente las inyecciones de ADC comenzaron en el mismo día que las inyecciones de células tumorales. Como control fueron inyectados ratones con IgG humana purificada o PBS, o un MAb purificado que reconoce un antígeno irrelevante que no se expresa en células humanas. En estudios preliminares, no se encontró ninguna diferencia entre la IgG control o el PBS sobre el crecimiento tumoral. Se determinaron los tamaños de tumor con mediciones con calibrador y se calculó el volumen tumoral como longitud×anchura×altitud. Los ratones con unos tumores subcutáneos mayores que 1,5 cm de diámetro fueron sacrificados.

40 El crecimiento de los tumores de riñón en ratones se consiguió mediante la inyección de 1,5 millones a 2 millones de células implantadas subcutáneamente en ratones SCID macho. Los ratones se controlan para su salud general, actividad física y aspecto hasta que estuvieron moribundos. En el momento del sacrificio, los ratones pueden estudiarse para determinar la carga tumoral y pueden recolectarse otros órganos para evaluar la metástasis hasta sitios alejados. Como alternativa, la muerte puede emplearse como criterio de valoración. Después los ratones se dividen en grupos para los tratamientos apropiados, con 161P2F10B o con MAb control que se administran por medio de una inyección intravenosa.

50 Una ventaja de los modelos de cáncer de xenoinjerto es la capacidad de estudiar la neovascularización y la angiogénesis. El crecimiento del tumor depende, en parte, del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. Aunque el sistema capilar y el desarrollo de una red de vasos sanguíneos tiene su origen en el hospedante, el inicio y la arquitectura de la neovasculatura son regulados por el tumor de xenoinjerto (Davidoff, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* (2001), 7:2870; Solesvik, *et al.*, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* (1984), 20:1295). El efecto del anticuerpo y las moléculas pequeñas sobre la neovascularización se estudia según procedimientos conocidos en la técnica, tal como mediante análisis de IHC de tejidos tumorales y su microentorno circundante.

55

El H16-7.8mcMMAF inhibe la formación de xenoinjertos de cáncer de riñón. Estos resultados indican la utilidad de H16-7.8mcMMAF para el tratamiento de estadios locales y avanzados del cáncer y, preferiblemente, de los cánceres listados en la tabla I.

161P2F10B ADC:

5 Se generaron anticuerpos monoclonales contra 161P2F10B según se describe en el ejemplo titulado “Generación de anticuerpos monoclonales (MAb) de 161P2F10B”. Además, los MAb se conjugaron con una toxina, tal como se describe en el ejemplo titulado “Conjugación del fármaco y anticuerpo a H16-7.8” para formar H16-7.8mcMMAF. El H16-7.8mcMMAF se caracteriza mediante FACS y otros métodos conocidos en la técnica para determinar su capacidad para unirse a 161P2F10B.

10 Líneas celulares y xenoinjertos:

Las células RFX-393 se mantienen en RPMI, suplementado con L-glutamina y FBS al 10%. Los xenoinjertos de UG-K3 y SKRC-01 se mantienen por medio de la propagación en serie en ratones SCID.

Eficacia de H16-7.8mcMMAF en un xenoinjerto de cáncer renal humano establecido por vía subcutánea UG-K3 en ratones SCID

15 En este experimento, un xenoinjerto de cáncer renal humano derivado de un paciente UG-K3 se mantuvo por medio de transferencias en serie en ratones SCID. Se recolectaron tumores madre de modo estéril y se trituraron en trozos pequeños. Los trozos de tumor se digirieron enzimáticamente para producir suspensiones de células individuales empleando Liberase Blendzyme (Roche Applied Science, Indianápolis, IN). Se inyectaron $1,5 \times 10^6$ células en los flancos de ratones SCID individuales y se dejó que los tumores crecieran sin tratar hasta que alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm^3 . Los animales se asignaron aleatoriamente a las siguientes cohortes: un grupo tratado con H16-7.8mcMMAF, un control de H16-7.8, y un control de dextrosa al 5%. Se dosificó H16-7.8mcMMAF y H16-7.8 a 10 mg/kg una vez en el día 0 mediante una inyección en embolada intravenosa. La cantidad de H16-7.8mcMMAF y H16-7.8 administrada se basa en el peso corporal individual de cada animal obtenido inmediatamente antes de la dosificación. El control de dextrosa al 5% se dosificó a 150 μl por animal. El crecimiento de los tumores se controló empleando mediciones con calibrador cada 3 a 4 días hasta el final del estudio. Se calculó el volumen del tumor como la anchura²×longitud/2, en la que la anchura es la dimensión más pequeña y la longitud es la dimensión más grande. Los animales en los grupos control recibieron una eutanasia compasiva cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 1000 mm^3 . Los animales en el grupo tratado con H16-7.8mcMMAF se controlaron durante dos semanas más antes del sacrificio. Se realizó un análisis estadístico en el último momento del tiempo cuando los datos de ambos grupos control estuvieron disponibles, empleando un ensayo de Kruskal-Wallis con $\alpha = 0,05$.

Los resultados demostraron que el tratamiento de tumores de xenoinjerto de células de tumor renal de células claras UG-K3 con H16-7.8mcMMAF a todas las dosis y programas estudiados produjo una inhibición significativa del crecimiento tumoral en ratones SCID (figura 9).

35 Inhibición del crecimiento en xenoinjertos ortotópicos establecidos de UG-K3 por H16-7.8mcMMAF

En este experimento, se evaluó la capacidad de H16-7.8mcMMAF para inhibir el crecimiento de tumores renales establecidos ortotópicamente empleando xenoinjertos de tumor UG-K3 derivados de un paciente. Brevemente, disoluciones madre de tumores UG-K3 se digirieron enzimáticamente y se implantaron quirúrgicamente 1,5 millones de células viables en los riñones de ratones SCID macho en el día 0. Se dejó que los tumores crecieran durante 7 días, tras lo cual los animales se aleatorizaron en 4 grupos de tratamiento diferentes ($n = 10$ por grupo). Los animales aleatorizados en el grupo A recibieron ADC control a 5 mpk, el grupo B recibió H16-7.8mcMMAF a 3 mg/kg, y el grupo C recibió H16-7.8mcMMAF a 5 mg/kg administrados cada 4 días para un total de 4 dosis. El grupo D recibió H16-7.8mcMMAF a 10 mg/kg una vez. Al final del estudio (día 41), los animales se sacrificaron, y los riñones izquierdo y derecho se pesaron en una balanza electrónica. Se determinó el peso de los tumores representados en una gráfica restando el peso del riñón contralateral sin tumor del peso del riñón derecho que porta el tumor.

Los resultados demuestran que el tratamiento de tumores de xenoinjertos de células de tumor renal de células claras UG-K3 con H16-7.8mcMMAF en todas las dosis y programas estudiados produjo una inhibición notable del crecimiento tumoral (figura 10). Los pesos de los tumores en todos los grupos de tratamiento con H16-7.8mcMMAF (B, C, y D) fueron menores que 1% de los pesos tumorales en el grupo tratado control. Estas diferencias fueron muy estadísticamente significativas ($p < 0,0001$, ANOVA).

Eficacia de H16-7.8mcMMAF en un xenoinjerto de cáncer renal humano establecido por vía subcutánea RFX-393 en ratones SCID

55 En este experimento, se inyectaron células de cáncer renal humano RFX-393 ($0,5 \times 10^6$ células por ratón) en los flancos de ratones individuales y se dejó que los tumores crecieran sin tratar hasta que alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm^3 . Después, los animales se asignaron aleatoriamente a las siguientes cohortes: un grupo

5 tratado con H16-7.8mcMMAF, un grupo tratado con H16-7.8, y un control de dextrosa al 5%. Se dosificó H16-7.8mcMMAF y H16-7.8 a 10 mg/kg una vez semanal para un total de dos dosis mediante una inyección en embolada intravenosa. La cantidad de H16-7.8mcMMAF y H16-7.8 administrada se basa en el peso corporal individual de cada animal obtenido inmediatamente antes de la dosificación. El control de dextrosa al 5% se dosificó a 150 µl por animal. El crecimiento de los tumores se controló empleando mediciones con calibrador cada 3 a 4 días hasta el final del estudio. Se calculó el volumen del tumor como la anchura²×longitud/2, en la que la anchura es la dimensión más pequeña y la longitud es la dimensión más grande. Los animales en los grupos control recibieron una eutanasia compasiva cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 1000 mm³. Los animales en el grupo tratado con H16-7.8mcMMAF se controlaron durante dos semanas más antes del sacrificio.

10 Los resultados demostraron que el tratamiento de tumores de xenoinjerto de cáncer renal humano RFX-393 con H16-7.8mcMMAF a todas las dosis y programas estudiados (incluida una dosis única) produjo una inhibición significativa del crecimiento tumoral en ratones SCID. Se realizó un análisis estadístico en el último momento del tiempo cuando los datos de ambos grupos control estuvieron disponibles, empleando un ensayo de Kruskal-Wallis con $\alpha = 0,05$ (figura 11).

15 Estudio de la eficacia de H16-7.8, comparado con H16-7.8mcMMAF, en el cáncer renal humano establecido por vía subcutánea SKRC-01 en ratones SCID

20 En otro experimento, se inyectaron células de cáncer renal humano SKRC-01 ($0,8 \times 10^6$ células por ratón) en los flancos de ratones individuales. Se dejó que los tumores crecieran sin tratar hasta que alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm³. En el día 0 cuando los tumores alcanzaron 100 mm³, los animales se asignaron aleatoriamente a las siguientes cohortes: un grupo tratado con H16-7.8mcMMAF, un grupo tratado con H16-7.8, y un control de dextrosa al 5%. Se dosificó H16-7.8mcMMAF y H16-7.8 a 4 mg/kg cada cuatro días para un total de cuatro dosis mediante una inyección en embolada intravenosa. La cantidad de H16-7.8mcMMAF y H16-7.8 administrada se basa en el peso corporal individual de cada animal obtenido inmediatamente antes de la dosificación. El control de dextrosa al 5% se dosificó a 150 µl por animal. El crecimiento de los tumores se controló empleando mediciones con calibrador cada 3 a 4 días. Se calculó el volumen del tumor como la anchura²×longitud/2, en la que la anchura es la dimensión más pequeña y la longitud es la dimensión más grande.

25 Los resultados demuestran que el ADC de H16-7.8mcMMAF inhibe significativamente el crecimiento de formación de tumores SKRC-01 en todas las dosis (incluyendo una dosis única), mientras que el MAb H16-7.8 desnudo no tuvo este efecto. Así, el ADC de H16-7.8mcMMAF tiene un efecto significativamente más notable que el anticuerpo desnudo H16-7.8 (figura 12).

30 Estudio de la eficacia de H16-7.8mcMMAF, comparado con otros conjugados de fármaco y anticuerpo (ADC) de 161P2F10B, en UG-K3 establecido por vía subcutánea en ratones SCID

35 En otro experimento, se inyectaron células de cáncer renal humano UG-K3 ($1,5 \times 10^6$ células por ratón) en los flancos de ratones individuales. Se dejó que los tumores crecieran sin tratar hasta que alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm³. En el día 0 cuando los tumores alcanzaron 100 mm³, los animales se asignaron aleatoriamente a las siguientes cohortes: un grupo H16-7.8mcMMAF, un grupo H16-7.8vcMMAE, y un grupo H16-1.11mcMMAF, y un grupo H16-1.11vcMMAE, un control de PBS, y un grupo tratado con MAb-vcMMAE control. Todos los conjugados de fármaco y anticuerpo (ADC) se dosificaron a 10 mg/kg una vez en el día 0. La cantidad de cada ADC administrada se basa en el peso corporal individual de cada animal obtenido inmediatamente antes de la dosificación. El control de PBS se dosificó a 150µl por animal. El crecimiento de los tumores se controló empleando mediciones con calibrador cada 3 a 4 días. Se calculó el volumen del tumor como la anchura²×longitud/2, en la que la anchura es la dimensión más pequeña y la longitud es la dimensión más grande.

40 Los resultados demuestran que los ADC de H16-7.8vcMMAE y H16-1.11vcMMAE no inhiben el crecimiento de formación de tumores. Además, ambos H16-7.8mcMMAF y H16-1.11mcMMAF inhiben significativamente el crecimiento de formación de tumores UG-K3 durante los primeros treinta (30) días. Después del día treinta (30), el H16-7.8mcMMAF produjo un efecto significativamente más notable cuando se compara con H16-1.11mcMMAF (figura 13).

45 **Ejemplo 8: Ensayos clínicos humanos para el tratamiento y el diagnóstico de carcinomas humanos mediante el uso de ADC de 161P2F10B**

50 Los ADC de 161P2F10B, que se unen específicamente a 161P2F10B, se emplean según la presente invención y se usan en el tratamiento de ciertos tumores, preferiblemente los listados en la tabla I. Con respecto a cada una de estas indicaciones, se consiguieron dos estrategias clínicas.

55 I.) Terapia adyuvante: En la terapia adyuvante, los pacientes se tratan con ADC de 161P2F10B en combinación con un agente quimioterapéutico o un agente neoplásico y/o con terapia de radiación o sus combinaciones. Las dianas de cáncer primario, tal como las listadas en la tabla I, se tratan con protocolos convencionales mediante la adición de ADC de 161P2F10B a la terapia de primera y segunda línea convencional. Los diseños de los protocolos abordan la eficacia, según se evalúa mediante los siguientes ejemplos, que incluye, pero no se limita a la reducción de la

masa tumoral de lesiones primarias o metastásicas, el aumento de la supervivencia sin progresión, la supervivencia global, la mejora en la salud de los pacientes, la estabilización de la enfermedad, así como la capacidad para reducir las dosis habituales de la quimioterapia convencionales y otros agentes biológicos. Estas reducciones en la dosificación permiten una terapia adicional y/o prolongada mediante la reducción de la toxicidad relacionada con la dosis del agente quimioterapéutico o biológico. Los ADC de 161P2F10B se utilizan en varios ensayos clínicos de adyuvantes en combinación con agentes quimioterapéuticos o antineoplásicos.

II.) Monoterapia: Con respecto al uso de los ADC de 161P2F10B en la monoterapia de tumores, los ADC de 161P2F10B se administran a los pacientes sin un agente quimioterapéutico o antineoplásico. En una realización, la monoterapia se realiza clínicamente en pacientes con cáncer en estadio final con enfermedad metastásica extendida. Los diseños de los protocolos abordan la eficacia, según se evalúa mediante los siguientes ejemplos, que incluye, pero no se limita a la reducción de la masa tumoral de lesiones primarias o metastásicas, el aumento de la supervivencia sin progresión, la supervivencia global, la mejora en la salud de los pacientes, la estabilización de la enfermedad, así como la capacidad para reducir las dosis habituales de la quimioterapia convencionales y otros agentes biológicos.

Dosificación

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada. Por ejemplo, puede administrarse una única inyección en embolada, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Una forma de dosificación unitaria, tal como se emplea en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas de dosificación unitarias de la invención viene dictada y depende directamente de (a) las características exclusivas del anticuerpo y del efecto terapéutico o profiláctico concreto que se va a lograr, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de formación de compuestos, tales como la utilización de un compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Un ejemplo de intervalo no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz de un ADC de 161P2F10B administrado en combinación según la invención es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/kg, al menos 1 mg/kg, al menos 2 mg/kg, al menos 3 mg/kg, o al menos 4 mg/kg. Otros ejemplos de intervalos no limitantes son, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 mg/kg, o por ejemplo, de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 5 mg/kg, o por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 7,5 mg/kg. La realización de dosis alta de la invención se refiere a una dosificación mayor que 10 mg/kg. Debe advertirse que los valores de dosificación pueden variar según el tipo y la gravedad del trastorno que se va a aliviar, y pueden incluir dosis únicas o múltiples. También debe entenderse que, para cualquier sujeto concreto, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o que supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación indicados en la presente son solo ejemplos y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

Plan de desarrollo clínico ("Clinical Development Plan", CDP)

El CDP hace un seguimiento y desarrolla los tratamientos de los ADC de 161P2F10B con respecto a la terapia adyuvante o la monoterapia. En un principio se realizan estudios de toxicología preclínicos en sujetos no humanos (por ejemplo, ratones, monos, etc.) empleando protocolos convencionales conocidos en la técnica. El H16-7.8mcMMAF demostró ser bien tolerado en los estudios de toxicología no humanos. Los ensayos clínicos humanos inicialmente demostraron ser seguros y después confirmaron su eficacia en dosis repetidas. Los ensayos son abiertos y comparan la quimioterapia convencional con la terapia convencional más ADC de 161P2F10B. Tal como puede apreciarse, un criterio no limitante que puede utilizarse con respecto al alistamiento de pacientes es la existencia de niveles de expresión de 161P2F10B en sus tumores, según se determina mediante una biopsia.

Al igual que con cualquier producto terapéutico basado en infusiones de anticuerpos o proteínas, los problemas de seguridad se relacionan principalmente con (i) el síndrome de liberación de citoquinas, es decir, hipotensión, fiebre, convulsiones, escalofríos; (ii) el desarrollo de una respuesta inmunogénica al material (es decir, el desarrollo de anticuerpos humanos por parte del paciente contra el producto terapéutico de anticuerpo, o una respuesta de HAHA); y (iii) una toxicidad hacia células normales que expresan 161P2F10B. Se emplean ensayos convencionales y de seguimiento para controlar cada uno de estos problemas de seguridad. Se ha descubierto que los MAb de 161P2F10B son seguros tras su administración a seres humanos.

Ejemplo 9: Conjugación del fármaco y anticuerpo a H16-7.8 Caracterización del MAb

I) Cartografiado de péptidos mediante espectrometría de masas

Se realizó un análisis de cartografiado de péptidos. Este método se emplea para confirmar la identidad del H16-7.8mcMMAF y distinguirlo del anticuerpo nativo (H16-7.8). Los H16-7.8mcMMAF y H16-7.8 obtenidos se trataron con ditioneitol (DTT) para reducir los enlaces disulfuro, seguido de una alquilación de las cisteínas libres resultantes. Se empleó guanidina en esta etapa para asegurar la desnaturalización completa de la proteína. Después de una diálisis para eliminar la guanidina, las muestras se digirieron con una endoproteinasa específica, Lys-C. La Lys-C rompe los enlaces peptídicos en el lado C-terminal de los restos lisina. Los péptidos resultantes se analizaron mediante una cromatografía en fase inversa acoplada con una espectrometría de masa. Los tiempos de retención en fase inversa y las proporciones de masa a carga observadas de los picos se compararon entre H16-7.8mcMMAF y H16-7.8. El análisis de LC-MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas) se realizó empleando un WATERS Acquity UPLC acoplado a un espectrómetro de masas a WATERS Q-TOFp. La muestra digerida se aplicó a un columna YMC C18 y se eluyó con un gradiente de acetonitrilo que contenía ácido trifluoroacético. Los mapas de péptidos representativos para H16-7.8mcMMAF y H16-7.8 se muestran en la figura 14.

Los tres cromatogramas de la figura 14 parecen idénticos, excepto por los picos indicados por un asterisco y una flecha. Tal como puede observarse en la figura, las intensidades de los picos, indicadas por un asterisco, se redujeron en el anticuerpo conjugado, comparado con el anticuerpo nativo. Los picos marcados con una flecha representan nuevos picos que aparecen en el mapa de péptidos del anticuerpo conjugado. De modo específico, se cree que los picos marcados con un asterisco o con una flecha son un péptido destinado para la conjugación y el péptido conjugado resultante, respectivamente. La figura 15 muestra una porción de los espectros de masas del pico marcado con un asterisco. El valor de masa de la señal que ha cambiado durante la conjugación se indica con el signo "más". Este péptido con un m/z aproximado de 970,4 (estado de carga +3) se identificó como C225-K250 que se origina de la región de bisagra de la cadena pesada y contiene los sitios de conjugación esperados.

Para identificar los picos recién aparecidos, que se cree que son el péptido conjugado de la figura 14, se realizó un análisis de LC-MS empleando la técnica de adquisición de datos de energía elevada (MSE). La figura 16 muestra los cromatogramas de iones extraídos (XIC) para los mapas de péptidos de H16-7.8mcMMAF y H16-7.8 empleando el m/z de 619,4. Este ion se corresponde con un fragmento de ion del resto de fármaco. Los picos observados en XIC a 619,4 son casi idénticos a los picos marcados con una flecha en la figura 14. Además, no se detectaron estos picos en el cromatograma del anticuerpo nativo. Estas observaciones sugieren que los picos detectados en los XIC a un m/z de 619,4 son aparentemente péptidos conjugados al fármaco y se identifican por sus valores de masa intacta. El resultado se resume en la tabla V. Estos resultados sugieren que, en el caso del conjugado, los péptidos predominantes son los conjugados a 2 fármacos en la región de bisagra de la cadena pesada. Estos datos son coherentes con los datos obtenidos por el otro método ortogonal, tal como un análisis de DAR.

II) Análisis de masa intacta mediante LC-MS

Se determinó la masa completa del H16-7.8mcMMAF desglucosilado mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo-ionización de electronebulización ("electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry", ESI-TOF). Esta técnica proporciona información directa acerca del valor de la proporción de fármaco a anticuerpo ("drug-to-antibody ratio", DAR). Las muestras de ensayo se diluyen con tampón fosfato de sodio 250 mM, pH 7,5, y después se incubaron durante la noche a 37 °C con glicopeptidasa F. Las muestras se inyectaron en una columna PLRP™ (Varian Technology), se equilibraron a 90 °C, y se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo/agua. Los picos de las muestras se analizaron mediante un sistema Acquity UPLC acoplado a un espectrómetro de masas WATERS Synapt (Waters) y las masas se reconstruyeron a partir de los datos brutos mediante el programa informático MaxEnt1. En la figura 17 se muestra un ejemplo de un perfil espectral de masas para el H16-7.8mcMMAF desglucosilado. El anticuerpo conjugado al fármaco predominante es una especie que porta una carga de 4 fármacos. Esta observación, que incluye la abundancia de anticuerpo no conjugado en H16-7.8mcMMAF, resulta coherente con los resultados obtenidos por los otros métodos ortogonales, tales como DAR mediante RP-HPLC, cartografiado de péptidos y ensayo de HIC.

III) Análisis de la proporción de fármaco a anticuerpo (DAR) mediante RP-HPLC

Se realizó un análisis de fármaco a anticuerpo (DAR) para la determinación cuantitativa mediante HPLC de la cantidad relativa de la carga de fármaco en cada cadena ligera y cadena pesada. Los análisis de DAR se realizaron empleando una columna analítica PLRP-S, de 2,1 mm × 50 mm, con una fase móvil A que consistía en ácido fórmico al 2,0%, y una fase móvil B que consistía en ácido fórmico al 2,0% más acetonitrilo al 90%. Para la preparación de la muestra, el anticuerpo conjugado con el fármaco se redujo completamente con DTT y después se separó en la cadena L, la cadena L conjugada con el fármaco, la cadena H y las cadenas H conjugadas con el fármaco basándose en la cantidad de carga del fármaco. Se eluyeron 50 µg de muestra empleando un caudal de 0,5 ml/min, con detección a 280 nm. La proporción molar de la proporción de fármaco a anticuerpo (DAR) se define mediante la siguiente ecuación.

$$DAR = \left(\sum_{n=0}^1 \left(\frac{AUC_{Ligera, n}}{AUC_{Total, Ligera}} \times n \right) + \sum_{n=0}^5 \left(\frac{AUC_{Pesada, n}}{AUC_{Total, Pesada}} \times n \right) \right) \times 2$$

en la que:

DAR - proporción molar de fármaco a anticuerpo

n - número de fármacos mcMMAF por cadena de Ab

5 *AUC*_{Ligera, n}, *AUC*_{Pesada, n} - área bajo la curva para la cadena ligera o pesada de anticuerpo con *n* fármacos, respectivamente;

*AUC*_{Total, Ligera(Pesada)} - área de pico bajo la curva de la cadena ligera o pesada.

10 Este método se ha calificado empleando material de H16-7.8mcMMAF. Los parámetros evaluados incluyen la especificidad, la precisión, la repetibilidad, y la precisión de los intermedios. En la figura 18 se muestra un perfil de *DAR* representativo para H16-7.8mcMMAF. El valor de *DAR* es de 4,0. La muestra se sometió a un análisis de LC-MS empleando las mismas condiciones de HPLC de este método para identificar el pico observado. Los resultados se resumen en la tabla VI. La identificación del pico de los resultados de *DAR* obtenidos durante la calificación de este método ha sido confirmada ortogonalmente mediante LC-MS.

IV) Afinidad de unión

15 Se ensayaron H16-7.8 y H16-7.8mcMMAF para su afinidad de unión a 161P2F10B expresado sobre células KU812 (células de leucemia mielógena crónica humana, ATCC). Brevemente, doce (12) diluciones de H16-7.8 o H16-7.8mcMMAF se incubaron con células KU812 (50.000 células por pocillo) durante la noche a 4 °C a una concentración final de 160 nM a 0,004 nM. Al final de la incubación, las células se lavaron y se incubaron con anticuerpo de detección anti-hlgG-PE durante 45 min a 4 °C. Después de lavar los anticuerpos de detección no unidos, las células se analizaron mediante FACS.

20 Los valores de MFI se introdujeron en el programa informático Graphpad Prism y se analizaron empleando la ecuación de un único sitio de unión (hipérbolo) de $Y = B_{max} \cdot X / (K_d + X)$ para generar las curvas de saturación de H16-7.8 y H16-7.8mcMMAF. *B*_{max} es el valor de MFI en la unión máxima de H16-7.8 o H16-7.8mcMMAF a KU812; *K*_d es la afinidad de unión de H16-7.8 o H16-7.8mcMMAF, que es la concentración de H16-7.8 o H16-7.8mcMMAF necesaria para alcanzar la unión semimáxima. La afinidad calculada (*K*_d) de H16-7.8 y H16-7.8mcMMAF es de 0,08 nM y 0,25 nM a 161P2F10B expresado sobre la superficie de células KU812, respectivamente (*n* = 4).

V) Citotoxicidad

30 El H16-7.8, el H16-7.8mcMMAF y un ADC de control negativo se diluyeron en serie por separado y se añadieron a una placa de 96 pocillos que contenía células KU812, que expresan endógenamente 161P2F10B sobre la superficie celular. Después de seis días de incubación, se añade el reactivo Alamar Blue® a la mezcla de anticuerpos y células. AlamarBlue® es un indicador de la viabilidad celular que emplea el poder reductor natural de las células vivas para convertir la resazurina en la molécula fluorescente resorufina. La resazurina se reduce a resorufina, que produce una fluorescencia roja muy brillante. Las células viables convierten continuamente la resazurina en resorufina, generando con ello una medición cuantitativa de la viabilidad y la citotoxicidad. Se evalúa el porcentaje de citotoxicidad de H16-7.8mcMMAF empleando unidades de fluorescencia obtenidas de modo espectrofotométrico utilizando el lector de microplacas Synergy 4 Hybrid Multi-Mode (540/35, 620/40 nm). El intervalo lineal del ensayo es de aproximadamente 3,9 a 1000 ng/ml. Existen 9 puntos en la curva patrón: la mayor concentración de H16-7.8mcMMAF es de 1000 ng/ml, seguida de ocho diluciones en serie 1 a 2 y un blanco (0).

Se calcula el porcentaje de supervivencia empleando la siguiente fórmula:

40 $\% \text{ de supervivencia} = (X - \text{blanco}) / (\text{no tratadas} - \text{blanco}) \times 100$

Actividad de citotoxicidad específica de H16-7.8mcMMAF sobre las células KU812: IC50 0,15 nM.

El H16-7.8 y el ADC control (anticuerpo (anticuerpo no-anti-161P2F10B)-mcMMAF) no presentan actividad de citotoxicidad sobre las células KU812.

Tablas

Tabla I: Tejidos que expresan 161P2F10B cuando hay malignidad

Riñón
 Colon
 Pulmón
 Ovario
 Mama
 Linfoma
 Hueso
 Útero
 Páncreas
 Hígado
 Próstata

Tabla II: Abreviaturas de los aminoácidos

UNA SOLA LETRA	TRES LETRAS	NOMBRE COMPLETO
F	Phe	fenilalanina
L	Leu	leucina
S	Ser	serina
Y	Tyr	tirosina
C	Cys	cisteína
W	Trp	triptófano
P	Pro	prolina
H	His	histidina
Q	Gln	glutamina
R	Arg	arginina
I	Ile	isoleucina
M	Met	metionina
T	Thr	treonina
N	Asn	asparagina
K	Lys	lisina
V	Val	valina
A	Ala	alanina
D	Asp	ácido aspártico
E	Glu	ácido glutámico
G	Gly	glicina

Tabla III: Matriz de sustitución de aminoácidos

5 Adaptada de la matriz de sustitución de aminoácidos 9.0 BLOSUM62 del programa informático GCG (matriz de sustitución en bloque). Cuanto más alto es el valor, más probable es encontrar una sustitución en proteínas naturales relacionadas.

A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	.
4	0	-2	-1	-2	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	-1	-1	1	0	0	-3	-2	A
	9	-3	-4	-2	-3	-3	-1	-3	-1	-1	-3	-3	-3	-3	-1	-1	-1	-2	-2	C
		6	2	-3	-1	-1	-3	-1	-4	-3	1	-1	0	-2	0	-1	-3	-4	-3	D
			5	-3	-2	0	-3	1	-3	-2	0	-1	2	0	0	-1	-2	-3	-2	E
				6	-3	-1	0	-3	0	0	-3	-4	-3	-3	-2	-2	-1	1	3	F
					6	-2	-4	-2	-4	-3	0	-2	-2	-2	0	-2	-3	-2	-3	G
						8	-3	-1	-3	-2	1	-2	0	0	-1	-2	-3	-2	2	H
							4	-3	2	1	-3	-3	-3	-3	-2	-1	3	-3	-1	I
								5	-2	-1	0	-1	1	2	0	-1	-2	-3	-2	K
									4	2	-3	-3	-2	-2	-2	-1	1	-2	-1	L
										5	-2	-2	0	-1	-1	-1	1	-1	-1	M
											6	-2	0	0	1	0	-3	-4	-2	N
												7	-1	-2	-1	-1	-2	-4	-3	P
													5	1	0	-1	-2	-2	-1	Q
														5	-1	-1	-3	-3	-2	R
															4	1	-2	-3	-2	S
																5	0	-2	-2	T
																	4	-3	-1	V
																		11	2	W
																			7	Y

Tabla IV: Valores de MFI FACS en células Ku812

nM	H16-7.8	H16-7.8mcMMAF
160	99	108
80	92	102
40	98	108
20	89	97
10	75	89
5	71	80
2,5	65	68

ES 2 668 645 T3

nM	H16-7.8	H16-7.8mcMMAF
1,3	59	60
0,63	57	57
0,31	58	54
0,16	53	47
0,078	47	37
0,039	36	30
0,020	27	20
0,010	18	14
0,0049	13	11
0,0024	9	8
0,0012	7	7
0,0006	6	6
0,0003	6	6
0,0002	6	5
0,0001	5	5

Tabla V: Resumen de los resultados de la identificación de picos en los péptidos conjugados con fármacos. Los sitios de conjugación potencial (restos cisteína) se indican en negrita y subrayado.

Pico n.º	Masa predominante observada	Masa calculada	Intento de identificación	Identificación de la secuencia
1	1754,81	1736,51	<u>S</u> ₂₀₈ <u>F</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>C</u> ₂₁₄ + 1mcMMAF + H ₂ O, Cadena ligera	SEQ ID NO:9
2	1736,82	1736,51	<u>S</u> ₂₀₈ <u>F</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>C</u> ₂₁₄ + 1mcMMAF, Cadena ligera	SEQ ID NO:9
3	4679,29	4643,72	<u>C</u> ₂₂₅ <u>C</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>K</u> ₂₄₉ + 2mc, MMAF + 2H ₂ O, Cadena pesada	SEQ ID NO:10
4	4661,29	4643,72	<u>C</u> ₂₂₅ <u>C</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>K</u> ₂₄₉ + 2mc MMAF + H ₂ O, Cadena pesada	SEQ ID NO:10
5	4643,20	4643,72	<u>C</u> ₂₂₅ <u>C</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>K</u> ₂₄₉ + 2mc, MMAF, Cadena pesada	SEQ ID NO:10
6	4704,39	4643,72	<u>C</u> ₂₂₅ <u>C</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>K</u> ₂₄₉ + 2mc, MMAF, Cadena pesada	SEQ ID NO:10
7	4644,38	4643,72	<u>C</u> ₂₂₅ <u>C</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>K</u> ₂₄₉ + 2mc, MMAF, Cadena pesada	SEQ ID NO:10
8	4626,27	4643,72	<u>C</u> ₂₂₅ <u>C</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>K</u> ₂₄₉ + 2mc, MMAF-H ₂ O, Cadena pesada	SEQ ID NO:10

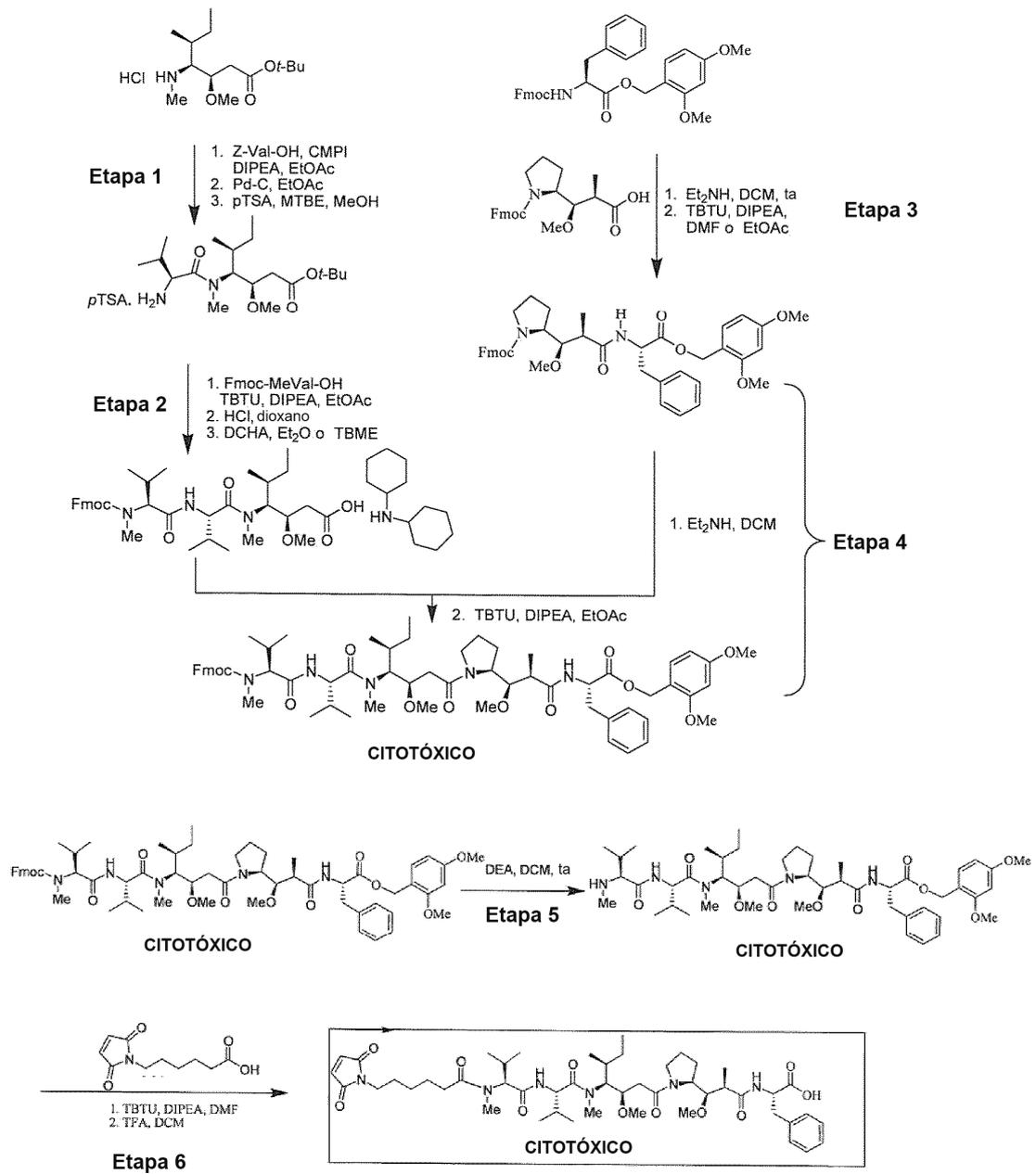
5

Tabla VI: Resultados de la identificación de los picos del análisis de DAR mediante LC-MS

ES 2 668 645 T3

Pico n.º	Masa observada	Diferencia de masa con un pico no conjugado	Asignaciones
L0	23596,1055	N/A	Cadena L no conjugada
L1	24521,7031	925,6	Cadena L conjugada con 1 fármaco
H0	50304,9102	N/A	Cadena H no conjugada
H1	51230,3984	925,5	Cadena H conjugada con 1 fármaco
H2	52155,9023	1851,0	Cadena H conjugada con 2 fármacos
H3	53085,2813	2780,4	Cadena H conjugada con 3 fármacos
H4	54006,7422	3701,8	Cadena H conjugada con 4 fármacos
H5	54929,6002	4624,7	Cadena H conjugada con 5 fármacos

Tabla VII: Esquema sintético de mcMMAF



ES 2 668 645 T3

ttt gaa gac acc tgt gtg gaa tca act cga ata tgg atg tgc aat aaa	343
Phe Glu Asp Thr Cys Val Glu Ser Thr Arg Ile Trp Met Cys Asn Lys	
85 90 95 100	
ttt cgt tgt gga gag acc aga tta gag gcc agc ctt tgc tct tgt tca	391
Phe Arg Cys Gly Glu Thr Arg Leu Glu Ala Ser Leu Cys Ser Cys Ser	
105 110 115	
gat gac tgt ttg cag agg aaa gat tgc tgt gct gac tat aag agt gtt	439
Asp Asp Cys Leu Gln Arg Lys Asp Cys Cys Ala Asp Tyr Lys Ser Val	
120 125 130	
tgc caa gga gaa acc tca tgg ctg gaa gaa aac tgt gac aca gcc cag	487
Cys Gln Gly Glu Thr Ser Trp Leu Glu Glu Asn Cys Asp Thr Ala Gln	
135 140 145	
cag tct cag tgc cca gaa ggg ttt gac ctg cca cca gtt atc ttg ttt	535
Gln Ser Gln Cys Pro Glu Gly Phe Asp Leu Pro Pro Val Ile Leu Phe	
150 155 160	
tct atg gat gga ttt aga gct gaa tat tta tac aca tgg gat act tta	583
Ser Met Asp Gly Phe Arg Ala Glu Tyr Leu Tyr Thr Trp Asp Thr Leu	
165 170 175 180	
atg cca aat atc aat aaa ctg aaa aca tgt gga att cat tca aaa tac	631
Met Pro Asn Ile Asn Lys Leu Lys Thr Cys Gly Ile His Ser Lys Tyr	
185 190 195	
atg aga gct atg tat cct acc aaa acc ttc cca aat cat tac acc att	679
Met Arg Ala Met Tyr Pro Thr Lys Thr Phe Pro Asn His Tyr Thr Ile	
200 205 210	
gtc acg ggc ttg tat cca gag tca cat ggc atc att gac aat aat atg	727
Val Thr Gly Leu Tyr Pro Glu Ser His Gly Ile Ile Asp Asn Asn Met	
215 220 225	
tat gat gta aat ctc aac aag aat ttt tca ctt tct tca aag gaa caa	775
Tyr Asp Val Asn Leu Asn Lys Asn Phe Ser Leu Ser Ser Lys Glu Gln	
230 235 240	
aat aat cca gcc tgg tgg cat ggg caa cca atg tgg ctg aca gca atg	823
Asn Asn Pro Ala Trp Trp His Gly Gln Pro Met Trp Leu Thr Ala Met	
245 250 255 260	
tat caa ggt tta aaa gcc gct acc tac ttt tgg ccc gga tca gaa gtg	871
Tyr Gln Gly Leu Lys Ala Ala Thr Tyr Phe Trp Pro Gly Ser Glu Val	
265 270 275	
gct ata aat ggc tcc ttt cct tcc ata tac atg cct tac aac gga agt	919
Ala Ile Asn Gly Ser Phe Pro Ser Ile Tyr Met Pro Tyr Asn Gly Ser	
280 285 290	
gtc cca ttt gaa gag agg att tct aca ctg tta aaa tgg ctg gac ctg	967
Val Pro Phe Glu Glu Arg Ile Ser Thr Leu Leu Lys Trp Leu Asp Leu	
295 300 305	
ccc aaa gct gaa aga ccc agg ttt tat acc atg tat ttt gaa gaa cct	1015
Pro Lys Ala Glu Arg Pro Arg Phe Tyr Thr Met Tyr Phe Glu Glu Pro	
310 315 320	
gat tcc tct gga cat gca ggt gga cca gtc agt gcc aga gta att aaa	1063
Asp Ser Ser Gly His Ala Gly Gly Pro Val Ser Ala Arg Val Ile Lys	
325 330 335 340	

ES 2 668 645 T3

gcc tta cag gta gta gat cat gct ttt ggg atg ttg atg gaa ggc ctg 1111
Ala Leu Gln Val Val Asp His Ala Phe Gly Met Leu Met Glu Gly Leu
345 350 355

aag cag cgg aat ttg cac aac tgt gtc aat atc atc ctt ctg gct gac 1159
Lys Gln Arg Asn Leu His Asn Cys Val Asn Ile Ile Leu Leu Ala Asp
360 365 370

cat gga atg gac cag act tat tgt aac aag atg gaa tac atg act gat 1207
His Gly Met Asp Gln Thr Tyr Cys Asn Lys Met Glu Tyr Met Thr Asp
375 380 385

tat ttt ccc aga ata aac ttc ttc tac atg tac gaa ggg cct gcc ccc 1255
Tyr Phe Pro Arg Ile Asn Phe Phe Tyr Met Tyr Glu Gly Pro Ala Pro
390 395 400

cgc atc cga gct cat aat ata cct cat gac ttt ttt agt ttt aat tct 1303
Arg Ile Arg Ala His Asn Ile Pro His Asp Phe Phe Ser Phe Asn Ser
405 410 415 420

gag gaa att gtt aga aac ctc agt tgc cga aaa cct gat cag cat ttc 1351
Glu Glu Ile Val Arg Asn Leu Ser Cys Arg Lys Pro Asp Gln His Phe
425 430 435

aag ccc tat ttg act cct gat ttg cca aag cga ctg cac tat gcc aag 1399
Lys Pro Tyr Leu Thr Pro Asp Leu Pro Lys Arg Leu His Tyr Ala Lys
440 445 450

aac gtc aga atc gac aaa gtt cat ctc ttt gtg gat caa cag tgg ctg 1447
Asn Val Arg Ile Asp Lys Val His Leu Phe Val Asp Gln Gln Trp Leu
455 460 465

gct gtt agg agt aaa tca aat aca aat tgt gga gga ggc aac cat ggt 1495
Ala Val Arg Ser Lys Ser Asn Thr Asn Cys Gly Gly Gly Asn His Gly
470 475 480

tat aac aat gag ttt agg agc atg gag gct atc ttt ctg gca cat gga 1543
Tyr Asn Asn Glu Phe Arg Ser Met Glu Ala Ile Phe Leu Ala His Gly
485 490 495 500

ccc agt ttt aaa gag aag act gaa gtt gaa cca ttt gaa aat att gaa 1591
Pro Ser Phe Lys Glu Lys Thr Glu Val Glu Pro Phe Glu Asn Ile Glu
505 510 515

gtc tat aac cta atg tgt gat ctt cta cgc att caa cca gca cca aac 1639
Val Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Arg Ile Gln Pro Ala Pro Asn
520 525 530

aat gga acc cat ggt agt tta aac cat ctt ctg aag gtg cct ttt tat 1687
Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Val Pro Phe Tyr
535 540 545

gag cca tcc cat gca gag gag gtg tca aag ttt tct gtt tgt ggc ttt 1735
Glu Pro Ser His Ala Glu Glu Val Ser Lys Phe Ser Val Cys Gly Phe
550 555 560

gct aat cca ttg ccc aca gag tct ctt gac tgt ttc tgc cct cac cta 1783
Ala Asn Pro Leu Pro Thr Glu Ser Leu Asp Cys Phe Cys Pro His Leu
565 570 575 580

caa aat agt act cag ctg gaa caa gtg aat cag atg cta aat ctc acc 1831
Gln Asn Ser Thr Gln Leu Glu Gln Val Asn Gln Met Leu Asn Leu Thr

ES 2 668 645 T3

585					590					595					
caa gaa gaa ata	aca gca aca gtg	aaa gta aat ttg	cca ttt ggg agg	1879	Gln Glu Glu Ile Thr Ala Thr Val Lys Val Asn Leu Pro Phe Gly Arg	600	605	610							
cct agg gta ctg	cag aag aac gtg	gac cac tgt ctc	ctt tac cac agg	1927	Pro Arg Val Leu Gln Lys Asn Val Asp His Cys Leu Leu Tyr His Arg	615	620	625							
gaa tat gtc agt	gga ttt gga aaa gct	atg agg atg ccc	atg tgg agt	1975	Glu Tyr Val Ser Gly Phe Gly Lys Ala Met Arg Met Pro Met Trp Ser	630	635	640							
tca tac aca gtc	ccc cag ttg gga gac	aca tgc cct ctg	cct ccc act	2023	Ser Tyr Thr Val Pro Gln Leu Gly Asp Thr Ser Pro Leu Pro Pro Thr	645	650	655	660						
gtc cca gac tgt	ctg cgg gct gat	gtc agg gtt cct	cct tct gag agc	2071	Val Pro Asp Cys Leu Arg Ala Asp Val Arg Val Pro Pro Ser Glu Ser	665	670	675							
caa aaa tgt tcc	ttc tat tta gca gac	aag aat atc acc	cac ggc ttc	2119	Gln Lys Cys Ser Phe Tyr Leu Ala Asp Lys Asn Ile Thr His Gly Phe	680	685	690							
ctc tat cct cct	gcc agc aat aga	aca tca gat agc	caa tat gat gct	2167	Leu Tyr Pro Pro Ala Ser Asn Arg Thr Ser Asp Ser Gln Tyr Asp Ala	695	700	705							
tta att act agc	aat ttg gta cct	atg tat gaa gaa	ttc aga aaa atg	2215	Leu Ile Thr Ser Asn Leu Val Pro Met Tyr Glu Glu Phe Arg Lys Met	710	715	720							
tgg gac tac ttc	cac agt gtt ctt	ctt ata aaa cat	gcc aca gaa aga	2263	Trp Asp Tyr Phe His Ser Val Leu Leu Ile Lys His Ala Thr Glu Arg	725	730	735	740						
aat gga gta aat	gtg gtt agt gga	cca ata ttt gat	tat aat tat gat	2311	Asn Gly Val Asn Val Ser Gly Pro Ile Phe Asp Tyr Asn Tyr Asp	745	750	755							
ggc cat ttt gat	gct cca gat gaa	att acc aaa cat	tta gcc aac act	2359	Gly His Phe Asp Ala Pro Asp Glu Ile Thr Lys His Leu Ala Asn Thr	760	765	770							
gat gtt ccc atc	cca aca cac tac	ttt gtg gtg ctg	acc agt tgt aaa	2407	Asp Val Pro Ile Pro Thr His Tyr Phe Val Val Leu Thr Ser Cys Lys	775	780	785							
aac aag agc cac	aca ccg gaa aac	tgc cct ggg tgg	ctg gat gtc cta	2455	Asn Lys Ser His Thr Pro Glu Asn Cys Pro Gly Trp Leu Asp Val Leu	790	795	800							
ccc ttt atc atc	cct cac cga cct	acc aac gtg gag	agc tgt cct gaa	2503	Pro Phe Ile Ile Pro His Arg Pro Thr Asn Val Glu Ser Cys Pro Glu	805	810	815	820						
ggg aaa cca gaa	gct ctt tgg gtt	gaa gaa aga ttt	aca gct cac att	2551	Gly Lys Pro Glu Ala Leu Trp Val Glu Glu Arg Phe Thr Ala His Ile	825	830	835							
gcc cgg gtc cgt	gat gta gaa ctt	ctc act ggg ctt	gac ttc tat cag	2599											

ES 2 668 645 T3

Ala Arg Val Arg Asp Val Glu Leu Leu Thr Gly Leu Asp Phe Tyr Gln
 840 845 850

gat aaa gtg cag cct gtc tct gaa att ttg caa cta aag aca tat tta 2647
 Asp Lys Val Gln Pro Val Ser Glu Ile Leu Gln Leu Lys Thr Tyr Leu
 855 860 865

cca aca ttt gaa acc act att taa cttaataatg tctacttaat atataattta 2701
 Pro Thr Phe Glu Thr Thr Ile
 870 875

ctgtataaag taattttggc aaaatataag tgattttttc tggagaattg taaaataaag 2761
 ttttctattt ttcttataaa aaaaaaccgg aattccgggc ttgggaggct gaggcaggag 2821
 actcgttga acccgggagg cagaggttc agtgagccaa gattgcgcca ttgcactcca 2881
 gagcctgggt gacagagcaa gactacatct caaaaaataa ataaataaaa taaaagtaac 2941
 aataaaaata aaaagaacag cagagagaat gagcaaggag aaatgtcaca aactattgca 3001
 aaatactggt aactggggt ggctctccaa gaagatactg gaatctctc agccatttgc 3061
 ttttcagaag tagaaaccag caaaccacct ctaagcggag aacatacgat tctttattaa 3121
 gtagctctgg ggaaggaag aataaaagt gatagctccc tgattgggaa aaaatgcaca 3181
 attaataaag aatgaagatg aaagaaagca tgcttatggt gtaacacaaa aaaaattcac 3241
 aaacgttggg ggaaggaaaa cagtatagaa aacattactt taactaaaag ctggaaaaat 3301
 tttcagttgg gatcgcactg acaaaaaagaa cgggatttcc aggcataaag ttggcgtgag 3361
 ctacagaggg caccatgtgg ctcagtgga gacccttcaa gattcaaatg tccatttgac 3421
 agagcaaagg cacttcgcaa ggagaagggt ttaaattatg ggtccaaaag ccaagtggta 3481
 aagcgagcaa ttgcagcat aactgcttct cctagacagg gctgagtggg caaaatacga 3541
 cagtacacac agtgactatt agccactgcc agaaacaggc tgaacagccc tgggagacaa 3601
 gggaaagcag gtggtgggag ttgttcatgg agagaaagga gagttttaga accagcacat 3661
 ccaactggaga tgctgggcca ccagaccctc cccagtcaat aaagtctggt gcctcatttg 3721
 atctcagcct catcatgacc ctggagagac cctgatacca tctgccagtc cccgacagct 3781
 taggcactcc ttgccatcaa cctgaccccc cgagtgggtc tccaggctcc ctgccccacc 3841
 cattcagccc ggaattc 3858

<210> 2
 <211> 875
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> característica miscelánea
 10 <222> (1)...(875)
 <223> variante 2 de 161P2F10B

<400> 2
 Met Glu Ser Thr Leu Thr Leu Ala Thr Glu Gln Pro Val Lys Lys Asn
 1 5 10 15
 Thr Leu Lys Lys Tyr Lys Ile Ala Cys Ile Val Leu Leu Ala Leu Leu
 20 25 30
 Val Ile Met Ser Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Arg Lys Leu
 35 40 45
 Glu Lys Gln Gly Ser Cys Arg Lys Lys Cys Phe Asp Ala Ser Phe Arg
 50 55 60
 Gly Leu Glu Asn Cys Arg Cys Asp Val Ala Cys Lys Asp Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Cys Cys Trp Asp Phe Glu Asp Thr Cys Val Glu Ser Thr Arg Ile Trp
 85 90 95
 Met Cys Asn Lys Phe Arg Cys Gly Glu Thr Arg Leu Glu Ala Ser Leu
 100 105 110
 Cys Ser Cys Ser Asp Asp Cys Leu Gln Arg Lys Asp Cys Cys Ala Asp
 115 120 125
 Tyr Lys Ser Val Cys Gln Gly Glu Thr Ser Trp Leu Glu Glu Asn Cys
 130 135 140
 Asp Thr Ala Gln Gln Ser Gln Cys Pro Glu Gly Phe Asp Leu Pro Pro
 145 150 155 160

15

ES 2 668 645 T3

Val Ile Leu Phe Ser Met Asp Gly Phe Arg Ala Glu Tyr Leu Tyr Thr
 165 170 175
 Trp Asp Thr Leu Met Pro Asn Ile Asn Lys Leu Lys Thr Cys Gly Ile
 180 185 190
 His Ser Lys Tyr Met Arg Ala Met Tyr Pro Thr Lys Thr Phe Pro Asn
 195 200 205
 His Tyr Thr Ile Val Thr Gly Leu Tyr Pro Glu Ser His Gly Ile Ile
 210 215 220
 Asp Asn Asn Met Tyr Asp Val Asn Leu Asn Lys Asn Phe Ser Leu Ser
 225 230 235 240
 Ser Lys Glu Gln Asn Asn Pro Ala Trp Trp His Gly Gln Pro Met Trp
 245 250 255
 Leu Thr Ala Met Tyr Gln Gly Leu Lys Ala Ala Thr Tyr Phe Trp Pro
 260 265 270
 Gly Ser Glu Val Ala Ile Asn Gly Ser Phe Pro Ser Ile Tyr Met Pro
 275 280 285
 Tyr Asn Gly Ser Val Pro Phe Glu Glu Arg Ile Ser Thr Leu Leu Lys
 290 295 300
 Trp Leu Asp Leu Pro Lys Ala Glu Arg Pro Arg Phe Tyr Thr Met Tyr
 305 310 315 320
 Phe Glu Glu Pro Asp Ser Ser Gly His Ala Gly Gly Pro Val Ser Ala
 325 330 335
 Arg Val Ile Lys Ala Leu Gln Val Val Asp His Ala Phe Gly Met Leu
 340 345 350
 Met Glu Gly Leu Lys Gln Arg Asn Leu His Asn Cys Val Asn Ile Ile
 355 360 365
 Leu Leu Ala Asp His Gly Met Asp Gln Thr Tyr Cys Asn Lys Met Glu
 370 375 380
 Tyr Met Thr Asp Tyr Phe Pro Arg Ile Asn Phe Phe Tyr Met Tyr Glu
 385 390 395 400
 Gly Pro Ala Pro Arg Ile Arg Ala His Asn Ile Pro His Asp Phe Phe
 405 410 415
 Ser Phe Asn Ser Glu Glu Ile Val Arg Asn Leu Ser Cys Arg Lys Pro
 420 425 430
 Asp Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Thr Pro Asp Leu Pro Lys Arg Leu
 435 440 445
 His Tyr Ala Lys Asn Val Arg Ile Asp Lys Val His Leu Phe Val Asp
 450 455 460
 Gln Gln Trp Leu Ala Val Arg Ser Lys Ser Asn Thr Asn Cys Gly Gly
 465 470 475 480
 Gly Asn His Gly Tyr Asn Asn Glu Phe Arg Ser Met Glu Ala Ile Phe
 485 490 495
 Leu Ala His Gly Pro Ser Phe Lys Glu Lys Thr Glu Val Glu Pro Phe
 500 505 510
 Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Arg Ile Gln
 515 520 525
 Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys
 530 535 540
 Val Pro Phe Tyr Glu Pro Ser His Ala Glu Glu Val Ser Lys Phe Ser
 545 550 555 560
 Val Cys Gly Phe Ala Asn Pro Leu Pro Thr Glu Ser Leu Asp Cys Phe
 565 570 575
 Cys Pro His Leu Gln Asn Ser Thr Gln Leu Glu Gln Val Asn Gln Met
 580 585 590
 Leu Asn Leu Thr Gln Glu Glu Ile Thr Ala Thr Val Lys Val Asn Leu
 595 600 605
 Pro Phe Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Asn Val Asp His Cys Leu
 610 615 620
 Leu Tyr His Arg Glu Tyr Val Ser Gly Phe Gly Lys Ala Met Arg Met
 625 630 635 640
 Pro Met Trp Ser Ser Tyr Thr Val Pro Gln Leu Gly Asp Thr Ser Pro
 645 650 655
 Leu Pro Pro Thr Val Pro Asp Cys Leu Arg Ala Asp Val Arg Val Pro

ES 2 668 645 T3

```

        660                665                670
Pro Ser Glu Ser Gln Lys Cys Ser Phe Tyr Leu Ala Asp Lys Asn Ile
        675                680                685
Thr His Gly Phe Leu Tyr Pro Ala Ser Asn Arg Thr Ser Asp Ser
        690                695                700
Gln Tyr Asp Ala Leu Ile Thr Ser Asn Leu Val Pro Met Tyr Glu Glu
705                710                715                720
Phe Arg Lys Met Trp Asp Tyr Phe His Ser Val Leu Leu Ile Lys His
        725                730                735
Ala Thr Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly Pro Ile Phe Asp
        740                745                750
Tyr Asn Tyr Asp Gly His Phe Asp Ala Pro Asp Glu Ile Thr Lys His
        755                760                765
Leu Ala Asn Thr Asp Val Pro Ile Pro Thr His Tyr Phe Val Val Leu
770                775                780
Thr Ser Cys Lys Asn Lys Ser His Thr Pro Glu Asn Cys Pro Gly Trp
785                790                795                800
Leu Asp Val Leu Pro Phe Ile Ile Pro His Arg Pro Thr Asn Val Glu
        805                810                815
Ser Cys Pro Glu Gly Lys Pro Glu Ala Leu Trp Val Glu Glu Arg Phe
        820                825                830
Thr Ala His Ile Ala Arg Val Arg Asp Val Glu Leu Leu Thr Gly Leu
        835                840                845
Asp Phe Tyr Gln Asp Lys Val Gln Pro Val Ser Glu Ile Leu Gln Leu
        850                855                860
Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Phe Glu Thr Thr Ile
865                870                875

```

5 <210> 3
 <211> 1440
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> característca miscelánea
 <222> (1)...(1440)
 <223> cadena pesada de H16-7.8

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (34)...(1440)

```

<400> 3
tttctgagag tcctggacct cctgtgcaag aac atg aaa cac ctg tgg ttc ttc 54
                               Met Lys His Leu Trp Phe Phe
                               1           5

ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg gtc ctg tcc cag gtg cag ctg 102
Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Val Gln Leu
        10                15                20

cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tca cag acc ctg tcc ctc 150
Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu
        25                30                35

acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc agc agt ggt ggt tac tac tgg 198
Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp
        40                45                50                55

agc tgg atc cgc cag cac cca ggg aag ggc ctg gag tgg att ggg atc 246
Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile
        60                65                70

```

ES 2 668 645 T3

atc	tat	tac	agt	ggg	agc	acc	tac	tac	aac	ccg	tcc	ctc	aag	agt	cga	294
Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	
			75					80					85			
ggt	acc	ata	tca	gta	gac	acg	tct	aag	aac	cag	ttc	tcc	ctg	aag	ctg	342
Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	
		90					95					100				
aac	tct	gtg	act	gcc	gcg	gac	acg	gcc	gtg	ttt	tac	tgt	gcg	aga	gtg	390
Asn	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Phe	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	
	105					110					115					
gct	ata	gtg	act	acg	atc	ccg	ggc	ggt	atg	gac	gtc	tgg	ggc	caa	ggg	438
Ala	Ile	Val	Thr	Thr	Ile	Pro	Gly	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	
	120				125					130					135	
acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	gcc	tcc	acc	aag	ggc	cca	tcg	gtc	ttc	486
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
			140						145					150		
ccc	ctg	gcg	ccc	tgc	tcc	agg	agc	acc	tcc	gag	agc	aca	gcg	gcc	ctg	534
Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	
			155					160					165			
ggc	tgc	ctg	gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa	ccg	gtg	acg	gtg	tcg	tgg	582
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
		170					175						180			
aac	tca	ggc	gct	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	acc	ttc	cca	gct	gtc	cta	630
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
	185					190					195					
cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc	gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	678
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Pro	Val	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
	200				205						210				215	
agc	aac	ttc	ggc	acc	cag	acc	tac	acc	tgc	aac	gta	gat	cac	aag	ccc	726
Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	
			220						225					230		
agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aca	ggt	gag	cgc	aaa	tgt	tgt	gtc	gag	774
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	
			235					240						245		
tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cca	cct	gtg	gca	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	822
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
			250				255						260			
ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	870
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
	265					270					275					
gtc	acg	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	ccc	gag	gtc	cag	918
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	
	280					285				290					295	
ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	966
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
			300						305					310		
cca	cgg	gag	gag	cag	ttc	aac	agc	acg	ttc	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	1014
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	

ES 2 668 645 T3

	315		320		325		
acc gtt gtg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag							1062
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys							
	330		335		340		
gtc tcc aac aaa ggc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa							1110
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys							
	345		350		355		
acc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc							1158
Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser							
	360		365		370		375
cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa							1206
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys							
			380		385		390
ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag							1254
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln							
			395		400		405
ccg gag aac aac tac aag acc aca cct ccc atg ctg gac tcc gac ggc							1302
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly							
			410		415		420
tcc ttc ttc ctt tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag							1350
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln							
			425		430		435
cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac							1398
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn							
			440		445		450
cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa							1440
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys							
			460		465		

<210> 4
 <211> 468
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> característca miscelánea
 10 <222> (1)...(468)
 <223> cadena pesada de H16-7.8

<400> 4
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45
 Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys

15

				85					90					95			
Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala		
			100					105					110				
Val	Phe	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Ala	Ile	Val	Thr	Thr	Ile	Pro	Gly	Gly		
			115					120					125				
Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser		
			130			135							140				
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr		
			145		150					155					160		
Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro		
				165					170					175			
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val		
			180					185						190			
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser		
			195				200						205				
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr		
			210			215					220						
Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val		
			225		230						235				240		
Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val		
				245						250				255			
Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu		
			260					265						270			
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser		
			275				280						285				
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu		
			290			295					300						
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr		
			305			310					315				320		
Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn		
				325						330				335			
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro		
			340					345					350				
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln		
			355				360						365				
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val		
			370			375					380						
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val		
			385		390					395					400		
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro		
				405						410				415			
Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr		
			420					425					430				
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val		
			435				440					445					
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu		
			450			455						460					
Ser	Pro	Gly	Lys														
			465														

<210> 5

<211> 744

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica miscelánea

10 <222> (1)...(744)

<223> cadena ligera de H16-7.8

<220>

<221> CDS

15 <222> (43)...(744)

<400> 5

ES 2 668 645 T3

```

aggagtagaa aatgagcaaa actgacaagt caaggcagga ag atg ttg cca tca 54
                               Met Leu Pro Ser
                               1

caa ctc att ggg ttt ctg ctg ctc tgg gtt cca gcc tcc agg ggt gaa 102
Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala Ser Arg Gly Glu
 5                               10                               15                               20

att gtg ctg act cag tct cca gac ttt cag tct gtg act cca aag gag 150
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys Glu
                               25                               30                               35

aaa gtc acc atc acc tgc cgg gcc agt cag agc att ggt att agc tta 198
Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ile Ser Leu
                               40                               45                               50

cac tgg tac cag cag aaa cca gat cag tct cca aag ctc ctc atc aag 246
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys
                               55                               60                               65

tat gct tcc cag tcc ttc tca ggg gtc ccc tcg agg ttc agt ggc agt 294
Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 70                               75                               80

gga tct ggg aca gat ttc acc ctc acc atc aat agc ctg gaa gct gaa 342
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu
 85                               90                               95                               100

gat gct gca acg tat tac tgt cat cag agt agg agt ttc ccg tgg acg 390
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Arg Ser Phe Pro Trp Thr
                               105                               110                               115

ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cga act gtg gct gca cca 438
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
                               120                               125                               130

tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act 486
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
                               135                               140                               145

gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa 534
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
                               150                               155                               160

gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag 582
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
                               165                               170                               175                               180

agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc 630
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
                               185                               190                               195

acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc 678
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
                               200                               205                               210

tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc 726
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
                               215                               220                               225

aac agg gga gag tgt tag 744
Asn Arg Gly Glu Cys
                               230

```

5 <210> 6
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> característica miscelánea

ES 2 668 645 T3

<222> (1)...(233)

<223> cadena ligera de H16-7.8

<400> 6

```

Met Leu Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
 1          5          10          15
Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val
 20          25          30
Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
 35          40          45
Gly Ile Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys
 50          55          60
Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg
 65          70          75          80
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
 85          90          95
Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Arg Ser
 100         105         110
Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115         120         125
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130         135         140
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145         150         155         160
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165         170         175
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180         185         190
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195         200         205
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210         215         220
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225         230

```

5

<210> 7

<211> 468

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> característca miscelánea

<222> (1)...(468)

15 <223> cadena pesada de H16-7.8

<400> 7

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1          5          10          15
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20          25          30

```

ES 2 668 645 T3

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45
 Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 85 90 95
 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Phe Tyr Cys Ala Arg Val Ala Ile Val Thr Thr Ile Pro Gly Gly
 115 120 125
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
 145 150 155 160
 Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 165 170 175
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 180 185 190
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 195 200 205
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
 210 215 220
 Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
 225 230 235 240
 Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
 245 250 255
 Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285
 His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 305 310 315 320
 Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
 340 345 350
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415
 Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460
 Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 8
 <211> 233
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> característica miscelánea
 10 <222> (1)...(233)
 <223> cadena ligera de H16-7.8

<400> 8

ES 2 668 645 T3

Met Leu Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val
 20 25 30
 Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
 35 40 45
 Gly Ile Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys
 50 55 60
 Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
 85 90 95
 Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Cys His Gln Ser Arg Ser
 100 105 110
 Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 9

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> péptido de cadena ligera construido sintéticamente

<400> 9

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

1

5

<210> 10

15 <211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> péptido de cadena pesada construido sintéticamente

<400> 10

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Gly Pro Ser

1

5

10

15

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

25 20

25

<210> 11

<211> 369

<212> ADN

30 <213> Homo sapiens

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (1)...(369)

35 <223> region variable de cadena pesada de H16-7.8

ES 2 668 645 T3

<400> 11

```
cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtgggtggtt actactggag ctggatccgc 120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggtt gggatcatct attacagtgg gagcacctac 180
tacaaccogt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgaactctgt gactgccgcg gacacggccg tgttttactg tgcgagagtg 300
gctatagtga ctacgatccc gggcggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
gtctcctca 369
```

<210> 12

- 5 <211> 452
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

<220>

- 10 <221> característica miscelánea
- <222> (1)...(452)
- <223> region variable de cadena ligera de H16-7.8

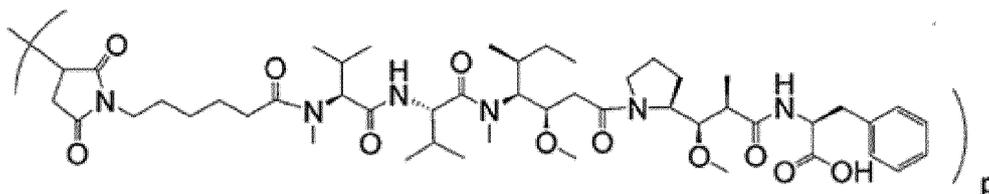
<400> 12

```
gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
atcacctgcc gggccagtc gagcattggt attagcttac actggtacca gcagaaacca 120
gatcagtcct caaagctcct catcaagtat gttcccagc ctttctcagg ggtcccctcg 180
aggttcagtg gcagtggttc tgggacagat ttcacctca ccatcaatag cctggaagct 240
gaagatgctg caacgtatta ctgtcatcag agtaggagtt tcccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgaaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg ga 452
```

15

REIVINDICACIONES

- 1.- Un conjugado de fármaco y anticuerpo que comprende un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une específicamente a una proteína 161P2F10B que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, y en el que el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la región V_H de SEQ ID NO:7, desde el resto 20 a 142, y la región V_L de SEQ ID NO:8, desde el resto 20 a 127, y en el que dicho anticuerpo se conjuga con monometil auristatina F (MMAF) empleando un conector.
- 2.- El conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el fragmento de unión al antígeno es un fragmento Fab, F(ab')₂ o Fv.
- 3.- El conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano.
- 4.- El conjugado de fármaco y anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se produce de modo recombinante.
- 5.- El conjugado de fármaco y anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el conector es maleimidocaproilo.
- 6.- El conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo, o su fragmento, se conjuga con la siguiente estructura:



en la que p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12.

- 7.- El conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo consiste en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID NO:7 desde el resto 20 al 468, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEQ ID NO:8 desde el resto 20 al 233.
- 8.- El conjugado de fármaco y anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en terapia.
- 9.- Un conjugado de fármaco y anticuerpo según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en un método para inhibir el crecimiento de células de cáncer en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto el conjugado de fármaco y anticuerpo.
- 10.- Un conjugado de fármaco y anticuerpo según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en un método para tratar un tumor en un mamífero, que comprende tratar el mamífero con una cantidad eficaz del conjugado de fármaco y anticuerpo.
- 11.- Un conjugado de fármaco y anticuerpo según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en un método para reducir el crecimiento tumoral en un mamífero, comprendiendo dicho método tratar el mamífero con una cantidad eficaz de una combinación del conjugado de fármaco y anticuerpo y radiación.
- 12.- Un conjugado de fármaco y anticuerpo según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en un método para reducir el crecimiento tumoral en un mamífero, comprendiendo dicho método tratar el mamífero con una cantidad eficaz de una combinación del conjugado de fármaco y anticuerpo y un agente quimioterapéutico.
- 13.- Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de fármaco y anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en una forma de dosis unitaria humana.
- 14.- Una composición farmacéutica según se define en la reivindicación 13, para su uso en un método de tratamiento del cáncer.
- 15.- La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 14, en la que el cáncer es cáncer renal o cáncer hepático.

ES 2 668 645 T3

Figura 1: Secuencia de ADNc (SEQ ID NO:1) y de aminoácidos (SEQ ID NO:2) del variante 2 de 161P2F10B. Se muestra la secuencia de 3858 nucleótidos del variante 2 de 161P2F10B.

```

1                                     M E S T L T
1 ctactttattctgataaaacaggtctatgcagctaccaggacaATGGAATCTACGTTGAC
7  L A T E Q P V K K N T L K K Y K I A C I
61 TTTAGCAACGGAACAACCTGTTAAGAAGAACAACCTCTTAAGAAATATAAAAATAGCTTGCAT
27  V L L A L L V I M S L G L G L G L G L R
121 TGTTCTTCTTGCTTTGCTGGTGATCATGTCACTTGGATTAGGCCTGGGGCTTGGACTCAG
47  K L E K Q G S C R K K C F D A S F R G L
181 GAAACTGGAAAAGCAAGGCAGCTGCAGGAAGAAGTGCTTTGATGCATCATTTAGAGGACT
67  E N C R C D V A C K D R G D C C W D F E
241 GGAGAACTGCCGGTGTGATGTGGCATGTAAAGACCGAGGTGATTGCTGCTGGGATTTTGA
87  D T C V E S T R I W M C N K F R C G E T
301 AGACACCTGTGTGGAATCAACTCGAATATGGATGTGCAATAAATTCGTTGTGGAGAGAC
107 R L E A S L C S C S D D C L Q R K D C C
361 CAGATTAGAGGCCAGCCTTTGCTCTTGTTCAGATGACTGTTTGCAGAGGAAAGATTGCTG
127 A D Y K S V C Q G E T S W L E E N C D T
421 TGCTGACTATAAGAGTGTGGCAAGGAGAAACCTCATGGCTGGAAGAAAACCTGTGACAC
147 A Q Q S Q C P E G F D L P P V I L F S M
481 AGCCCAGCAGTCTCAGTGCCCGAAGGGTTTGACCTGCCACCAGTTATCTTGTTTTCTAT
167 D G F R A E Y L Y T W D T L M P N I N K
541 GGATGGATTTAGAGCTGAATATTTATACACATGGGATACTTTAATGCCAAATATCAATAA
187 L K T C G I H S K Y M R A M Y P T K T F
601 ACTGAAAACATGTGGAATTCATTCAAAATACATGAGAGCTATGTATCCTACAAAACCTT
207 P N H Y T I V T G L Y P E S H G I I D N
661 CCCAAATCATTACACCATTGTACGGGCTTGTATCCAGAGTCACATGGCATCATTGACAA
227 N M Y D V N L N K N F S L S S K E Q N N
721 TAATATGTATGATGTAAATCTCAACAAGAATTTTCACTTTCTTCAAAGGAACAAAATAA
247 P A W W H G Q P M W L T A M Y Q G L K A
781 TCCAGCCTGGTGGCATGGGCAACCAATGTGGCTGACAGCAATGTATCAAGGTTTAAAAGC
267 A T Y F W P G S E V A I N G S F P S I Y
841 CGCTACCTACTTTTGGCCCGGATCAGAAGTGCTATAAATGGCTCCTTTCCTTCCATATA
287 M P Y N G S V P F E E R I S T L L K W L
901 CATGCCTTACAACGGAAGTGTCCCATTTGAAGAGAGGATTCTACACTGTAAAATGGCT
307 D L P K A E R P R F Y T M Y F E E P D S
961 GGACCTGCCCAAAGCTGAAAGACCCAGGTTTATACCATGTATTTTGAAGAACCTGATTC
327 S G H A G G P V S A R V I K A L Q V V D
1021 CTCTGGACATGCAGGTGGACCAGTCAGTGCCAGAGTAATTAAGCCTTACAGGTAGTAGA
347 H A F G M L M E G L K Q R N L H N C V N
1081 TCATGCTTTTGGGATGTTGATGGAAGGCCTGAAGCAGCGGAATTTGCACAACCTGTGTCAA
367 I I L L A D H G M D Q T Y C N K M E Y M
1141 TATCATCCTTCTGGCTGACCATGGAATGGACCAGACTTATTGTAACAAGATGGAATACAT
387 T D Y F P R I N F F Y M Y E G P A P R I
1201 GACTGATTATTTTCCCAGAATAAACTTCTTCTACATGTACGAAGGCCTGCCCCCGCAT

```

ES 2 668 645 T3

Figura 1-2

407 R A H N I P H D F F S F N S E E I V R N
1261 CCGAGCTCATAATATACCTCATGACTTTTTTAGTTTAAATTCTGAGGAAATGTTAGAAA
427 L S C R K P D Q H F K P Y L T P D L P K
1321 CCTCAGTTGCCGAAAACCTGATCAGCATTTCAAGCCCTATTTGACTCCTGATTTGCCAAA
447 R L H Y A K N V R I D K V H L F V D Q Q
1381 GCGACTGCACTATGCCAAGAACGTCAGAATCGACAAAAGTTCATCTCTTTGTGGATCAACA
467 W L A V R S K S N T N C G G G N H G Y N
1441 GTGGCTGGCTGTTAGGAGTAAATCAAATACAAATGTGGAGGAGCAACCATGGTTATAA
487 N E F R S M E A I F L A H G P S F K E K
1501 CAATGAGTTTAGGAGCATGGAGGCTATCTTTCTGGCACATGGACCCAGTTTAAAGAGAA
507 T E V E P F E N I E V Y N L M C D L L R
1561 GACTGAAGTTGAACCATTTGAAAATATTGAAGTCTATAACCTAATGTGTGATCTTCTACG
527 I Q P A P N N G T H G S L N H L L K V P
1621 CATTCAACCAGCACCAACAATGGAACCCATGGTAGTTTAAACCATCTTCTGAAGGTGCC
547 F Y E P S H A E E V S K F S V C G F A N
1681 TTTTATGAGCCATCCCATGCAGAGGAGGTGTCAAAGTTTCTGTTGTGGCTTTGCTAA
567 P L P T E S L D C F C P H L Q N S T Q L
1741 TCCATTGCCACAGAGTCTCTTGACTGTTTCTGCCCTCACCTACAAAATAGTACTCAGCT
587 E Q V N Q M L N L T Q E E I T A T V K V
1801 GGAACAAGTGAATCAGATGCTAAATCTCACCCAAGAAGAATAACAGCAACAGTGAAGT
607 N L P F G R P R V L Q K N V D H C L L Y
1861 AAATTTGCCATTTGGGAGGCCTAGGGTACTGCAGAAGAACGTGGACCACTGTCTCCTTAA
627 H R E Y V S G F G K A M R M P M W S S Y
1921 CCACAGGGAATATGTGAGTGGATTTGGAAAAGCTATGAGGATGCCCATGTGGAGTTCATA
647 T V P Q L G D T S P L P P T V P D C L R
1981 CACAGTCCCCAGTTGGGAGACACATCGCCTCTGCCTCCCACTGTCCAGACTGTCTGCG
667 A D V R V P P S E S Q K C S F Y L A D K
2041 GGCTGATGTCAGGGTTCTCCTTCTGAGAGCCAAAATGTTCCCTTCTATTTAGCAGACAA
687 N I T H G F L Y P P A S N R T S D S Q Y
2101 GAATATCACCCACGGCTTCTCTATCCTCCTGCCAGCAATAGAACATCAGATAGCCAATA
707 D A L I T S N L V P M Y E E F R K M W D
2161 TGATGCTTTAATTACTAGCAATTTGGTACCTATGTATGAAGAATTCAGAAAAATGTGGGA
727 Y F H S V L L I K H A T E R N G V N V V
2221 CTACTTCCACAGTGTCTTCTTATAAAACATGCCACAGAAAGAAATGGAGTAAATGTGGT
747 S G P I F D Y N Y D G H F D A P D E I T
2281 TAGTGGACCAATATTTGATTATAATTATGATGGCCATTTTGTGCTCCAGATGAAATTAC
767 K H L A N T D V P I P T H Y F V V L T S
2341 CAAACATTTAGCCAACACTGATGTTCCCATCCCAACACACTACTTTGTGGTGTGACCAG
787 C K N K S H T P E N C P G W L D V L P F
2401 TTGTAAAAACAAGAGCCACACACCGGAAAACCTGCCCTGGGTGGCTGGATGTCCTACCCTT
807 I I P H R P T N V E S C P E G K P E A L
2461 TATCATCCCTCACCGACCTACCAACGTGGAGAGCTGTCTGAAGGTAAACCAGAAGCTCT
827 W V E E R F T A H I A R V R D V E L L T
2521 TTGGGTGGAAGAAAGATTACAGCTCACATGCCCCGGTCCGTGATGTAGAACTTCTCAC
847 G L D F Y Q D K V Q P V S E I L Q L K T

ES 2 668 645 T3

Figura 1-3

```
2581 TGGGCTTGACTTCTATCAGGATAAAGTGCAGCCTGTCTCTGAAATTTTGCAACTAAAGAC
867 Y L P T F E T T I *
2641 ATATTTACCAACATTTGAAACCACTATTTAAActtaataatgtctacttaatatataattt
2701 actgtataaagtaatthttggcaaaatataagtgatthtttctggagaattgtaaaataaa
2761 gttttctatthttccttaaaaaaaaaaccggaattccgggcttgggaggctgaggcagga
2821 gactcgcttgaacccgggaggcagaggttgacgtgagccaagattgcgccattgcactcc
2881 agagcctgggtgacagagcaagactacatctcaaaaaataaataaaataaaataaaagtaa
2941 caataaaataaaagaacagcagagagaatgagcaaggagaaatgtcacaactattgac
3001 aaaatactggttacactgggttgctctccaagaagatactggaatctcttcagccatttg
3061 cttttcagaagtagaaaccagcaaacaccctctaagcgggagaacatacgattctttatta
3121 agtagctctggggaaggaaagaataaaaagttgatagctccctgattgggaaaaaatgcac
3181 aattaataaagaatgaagatgaaagaaagcatgcttatggttgtaacacaaaaaaattca
3241 caaacgttggtggaaggaaaacagtatagaaaacattactttaactaaaagctggaaaaa
3301 ttttcagttgggatgagactgacaaaaagaacgggatttccaggcataaaagttggcgtga
3361 gctacagagggcaccatgtggctcagtggaagacccttcaagattcaaagttccatttga
3421 cagagcaaaggcacttcgcaaggagaagggtttaaattatgggtccaaaagccaagtgg
3481 aaagcgagcaatthtcagcataactgcttctcctagacagggctgagtgggcaaaatacg
3541 acagtacacacagtgactattagccactgccagaaacaggctgaacagccctgggagaca
3601 aggaaggcaggtggtgggagttgttcatggagagaaaggagagttttagaaccagcaca
3661 tccactggagatgctgggcccaccagacccctcccagtcaataaagtctggtgcctcattt
3721 gatctcagcctcatcatgaccctggagagaccctgataccatctgccagtccccgacagc
3781 ttaggcactccttgccatcaacctgacccccgagtggttctccaggctccctgccccac
3841 ccattcaggccggaattc
```

Figura 2:

Figura 2A: Secuencia de ADNc (SEQ ID NO:3) y de aminoácidos (SEQ ID NO:4) de la cadena pesada de H16-7.8.

M K H L W F F L L

1 TTTCTGAGAGTCTGGACCTCCTGTGCAAGAACATGAAACACCTGTGGTTCTTCTCCTG
 L V A A P R W V L S Q V Q L Q E S G P G

61 CTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCCTGTCCCAGGTGCAGCTGCAGGATCGGGCCAGGA
 L V K P S Q T L S L T C T V S G S I S

121 CTGGTGAAGCCTTACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGC
 S G G Y Y W S W I R Q H P G K G L E W I

181 AGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGCCTGGAGTGGATT
 G I I Y Y S G S T Y Y N P S L K S R V T

241 GGGATCATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACC
 I S V D T S K N Q F S L K L N S V T A A

301 ATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACTGCCGCG
 D T A V F Y C A R V A I V T T I P G G M

361 GACACGGCCGTGTTTTACTGTGCGAGAGTGGCTATAGTACTACGATCCCGGGCGGTATG
 D V W G Q G T T V T V S S A S T K G P S

421 GACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCCCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCG
 V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C

481 GTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGC
 L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T

541 CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGTGAACCTCAGGCGCTCTGACC
 S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S

601 AGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCCCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGC
 V V T V P S S N F G T Q T Y T C N V D H

661 GTGGTGACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCAC
 K P S N T K V D K T V E R K C C V E C P

721 AAGCCAGCAACACCAAGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCA
 P C P A P P V A G P S V F L F P P K P K

781 CCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAG
 D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H

841 GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTCGCTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
 E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K

901 GAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
 T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V

961 ACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTT
 V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L

1021 GTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCCTC
 P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V

1081 CCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG
 Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L

1141 TACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTG
 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E

1201 GTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
 N N Y K T T P P M L D S D G S F F L Y S

1261 AACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTTACAGC
 K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M

1321 AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
 H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *

1381 CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

ES 2 668 645 T3

Figura 2B: Secuencia de ADNc (SEQ ID NO:5) y de aminoácidos (SEQ ID NO:6) de la cadena ligera de H16-7.8.

M L P S Q L

1 AGGAGTAGAAAATGAGCAAACTGACAAGTCAAGGCAGGAAGATGTTGCCATCACAACTC
 I G F L L L W V P A S R G E I V L T Q S
 61 ATTGGGTTTCTGCTGCTCTGGGTCCAGCCTCCAGGGTGAAATTGTGCTGACTCAGTCT
 P D F Q S V T P K E K V T I T C R A S Q
 121 CCAGACTTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAAAGTCACCATCACCTGCCGGCCAGTCAG
 S I G I S L H W Y Q Q K P D Q S P K L L
 181 AGCATTGGTATTAGCTTACACTGGTACCAGCAGAAACCAGATCAGTCTCCAAAGTCCTC
 I K Y A S Q S F S G V P S R F S G S G S
 241 ATCAAGTATGCTTCCCAGTCCTTCTCAGGGGTCCCCTCGAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCT
 G T D F T L T I N S L E A E D A A T Y Y
 301 GGGACAGATTTACCCTCACCATCAATAGCTGGAAGCTGAAGATGCTGCAACGTATTAC
 C H Q S R S F P W T F G Q G T K V E I K
 361 TGTCATCAGAGTAGGAGTTTCCCGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAA
 R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S
 421 CGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCACATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
 G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q
 481 GGAAGTGCCTCTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG
 W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D
 541 TGGAAGGTGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC
 S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E
 601 AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG
 K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K
 661 AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG
 S F N R G E C *
 721 AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

Figura 3:

Figura 3A: Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:7) de la cadena pesada de H16-7.8

1 MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VOLOESGPGL VKPSQTLTSLT CTVSGGSISS
 51 GGYYWSWIRO HPGKLEWIG IYYSGSTYY NPSLKSRTVI SVDTSKNQFS
 101 LKLNSTVAAD TAVFYCARVA IVTTIPGGMD VWGOGTTTVV SSASTKGPSV
 151 FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
 201 SSGLYLSLSSV VTVPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP
 251 CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV
 301 DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP
 351 APIEKTISKI KGQPREPOVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
 401 EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSMH
 451 EALHNHYTQK SLSLSPGK

Figura 3B: Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:8) de la cadena ligera de H16-7.8

1 MLPSQLIGFL LLWVPASRGE IVLTQSPDFQ SVTPKEKVTI TCRASOSIGI
 51 SLHWYQOKPD QSPKLLIKYA SOSFSGVPSR FSGSGSGTDF TLTINSLEAE
 101 DAATYYCHQS RSPFWTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS
 151 VVCLLNNFYF REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL
 201 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC

Figura 4

Figura 4A: Alineamiento de la región variable de cadena pesada de H16-7.8 (SEQ ID NO:11) con la línea germinal humana VH4-31/D5-12/JH6

```

<-----FWR1----->
H16-7.8 1 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCACAGGACTGGTGAAGCCCTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACACTGTCTCTGGTGG 80
VH4-31 1 .....T..... 80
D5-12
JH6
-----> <-----CDR1-----> <-----FWR2-----> <----->
H16-7.8 81 CTCCATCAGC AGTGGTGGTTACTACTGGAGC TGGATCCGCCAGCACCAGGGAAGGGCCCTGGAGTGGATGGG ATCATCT 160
VH4-31 81 ..... 160
D5-12
JH6
-----> <-----CDR2-----> <----->
H16-7.8 161 ATTACAGTGGGAGCACCTACTACAAACCCGTCCCTCAAGAGT CGAGTTACCATATCAGTAGACACCGTCTAAGAACAGTTC 240
VH4-31 161 ..... 240
D5-12
JH6
-----FWR3----->
H16-7.8 241 TCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACTGCGCGGACACGGCCGTGTTTACTGTGCGAGA GTGGCTATAGTACTACGATCCC 320
VH4-31 241 .....A..... 298
D5-12 1 .....A.....G..... 20
JH6
----->
H16-7.8 321 GGGCGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGACCACGGTCAACCGTCTCCTCA 369
VH4-31
D5-12
JH6 17 .....G..... 62

```

Figura 4B: Alineamiento de la región variable de cadena ligera de H16-7.8 (SEQ ID NO:12) con la línea germinal humana A26/JK1

```

<-----FWR1-----> <-----
H16-7.8 100 GAAATTTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTTCACTGTGACTCCAAAGGAGAAAAGTACCATCACCTGC CGGGCCAGTCA 179
A26 1 ..... 80
JK1 -----

-----CDR1----- <-----FWR2-----> <-----CDR2
H16-7.8 180 GAGCATTGGTATTAGCTTACAC TGGTACCAGCAGAAAACAGATCAGTCTCCAAGCTCCTCATCAAG TATGCTTCCCAGT 259
A26 81 .....G..... 160
JK1 -----

-----> <-----FWR3-----
H16-7.8 260 CCTTCTCA GGGTCCCCTCGAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCAACCCTCACCATCAATAGCCTGGAAAGCT 339
A26 161 ..... 240
JK1 -----

----->
H16-7.8 340 GAAGATGCTGCAACGTATTACTGT CATCAGAGTAGGAGTTTCCCGTGGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAA 419
A26 241 .....T..... 281
JK1 1 ----- 36

H16-7.8 420 ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTTGAATCTGGAACTGCCCTCTGTTGTGT 499
A26 -----
JK1 37 ..... 38

H16-7.8 500 GCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGAAGGTGGA 551
A26 -----
JK1 -----

```

Figura 5: Expresión recombinante de H16-7.8 en células CHO

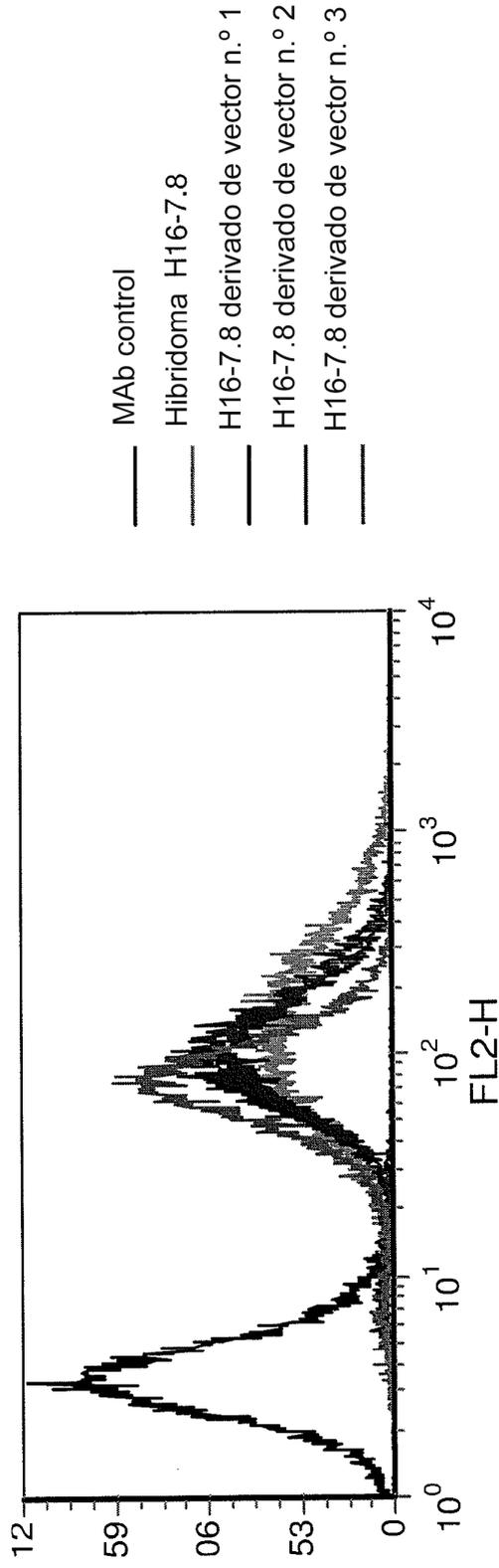
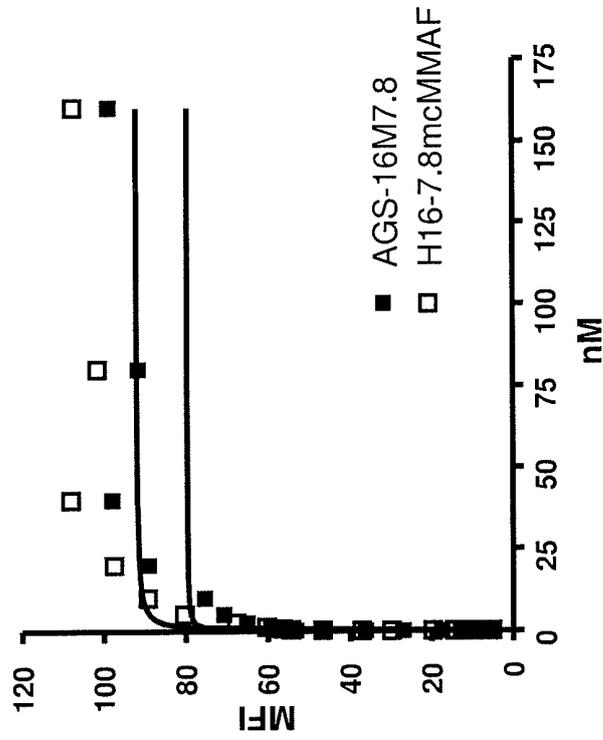


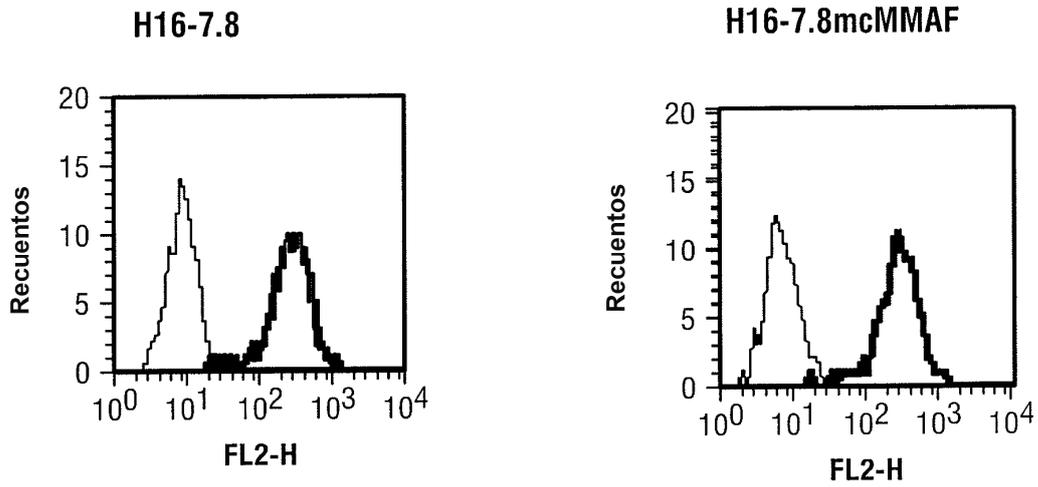
Figura 6: Afinidad y unión a células de H16-7.8 y H16-7.8mcMMAF



	H16-7.8	H16-7.8mcMMAF
BMAX	80	92
KD (nM)	0,06	0,19

Figura 7: Unión de H16-7.8 y H16-7.8mcMMAF a células de cáncer renal

UG-K3:



RXF-393:

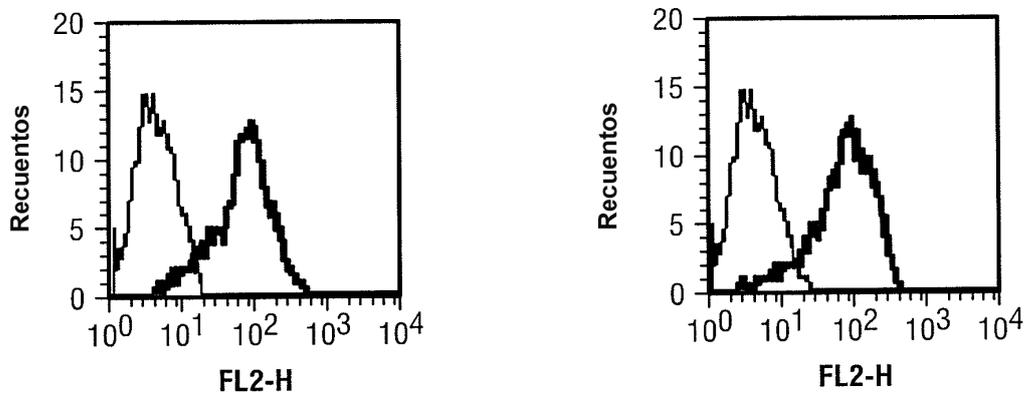
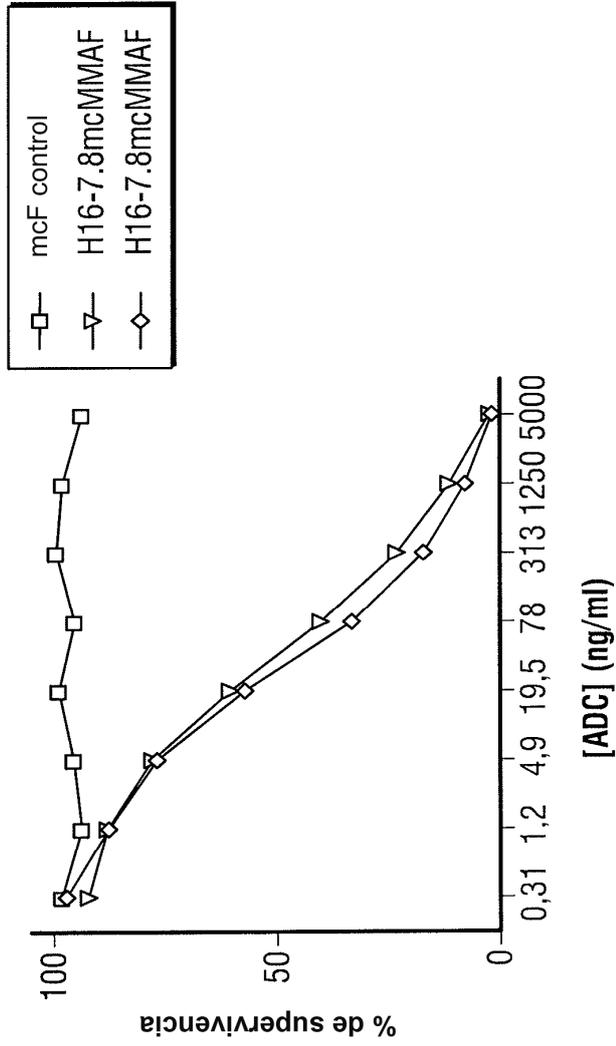


Figura 8: Citotoxicidad de H16-7.8mcMMAF en células KU812



ADC	CI50 (nM)
ADC control	N/A
H16-7.8mcMMAF	0,2
H16-7.8mcMMAF	0,1

Figura 9: Eficacia de H16-7.8mcMMAF en xenoinjerto de cáncer renal humano UG-K3 establecido subcutáneamente en ratones SCID

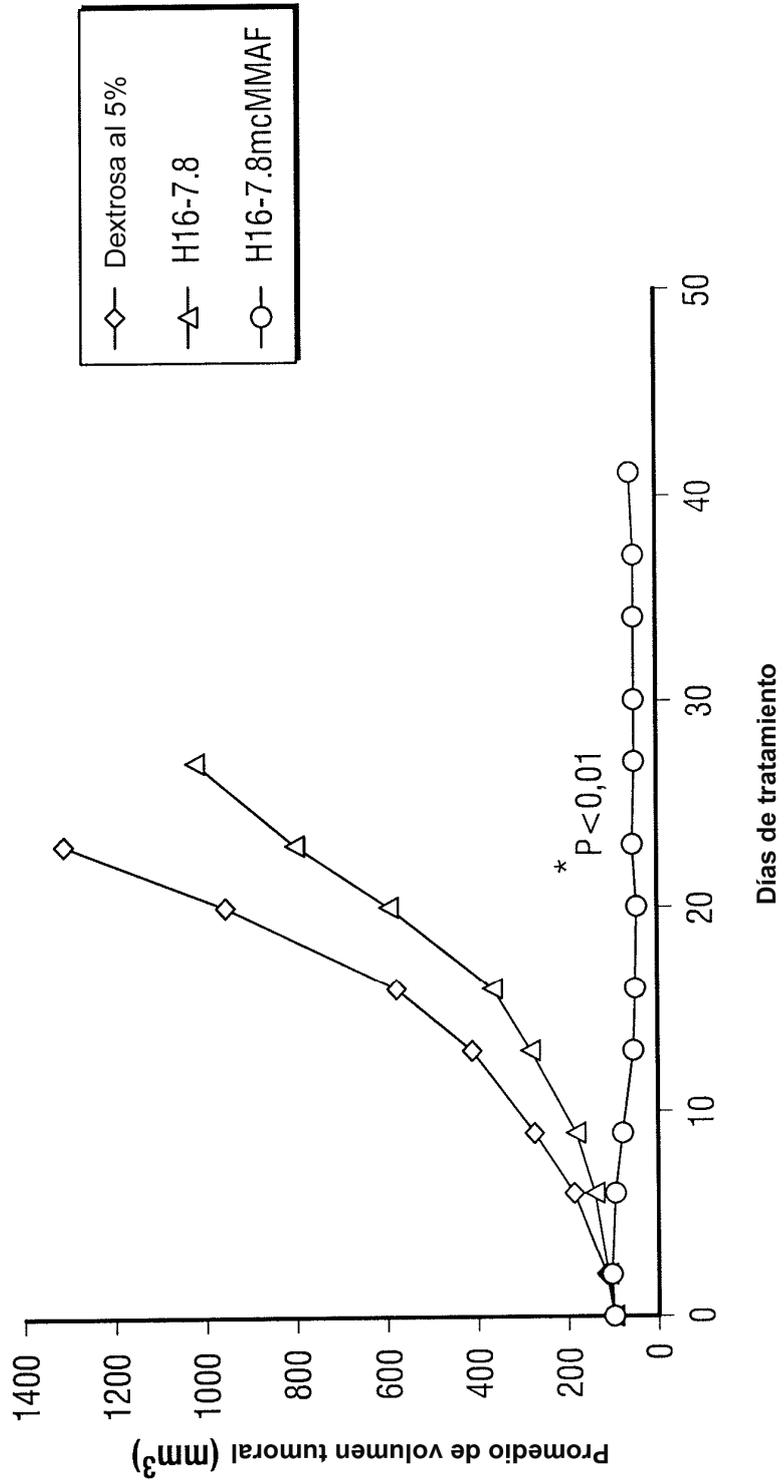


Figura 10: Inhibición potente de xenoinjertos de cáncer renal establecido de modo ortotópico con diferentes dosis y programas de H16-7.8mcMMAF

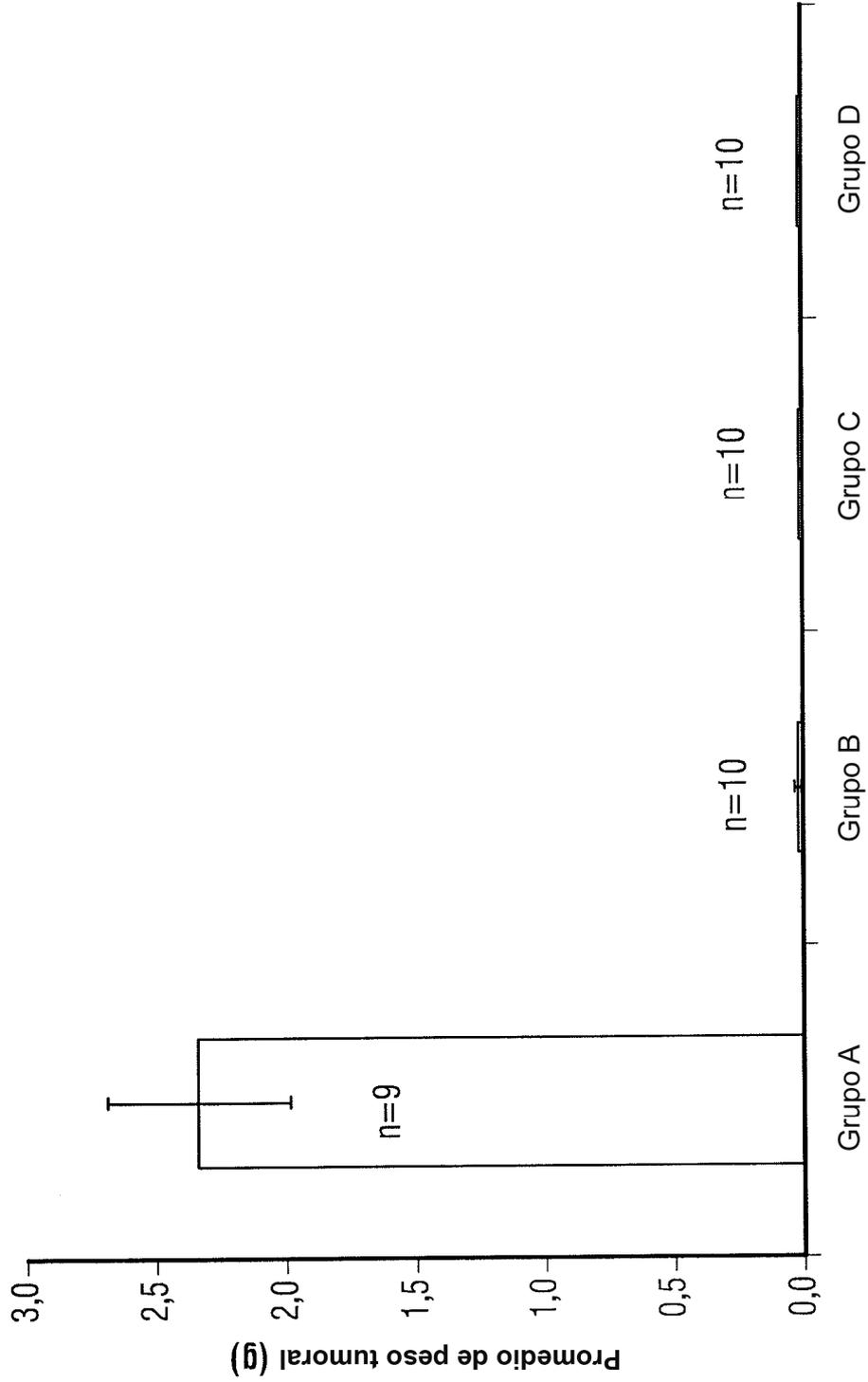


Figura 11: Eficacia de H16-7.8mcMMAF en xenoinjerto de cáncer renal humano RXF-393 establecido subcutáneamente en ratones SCID

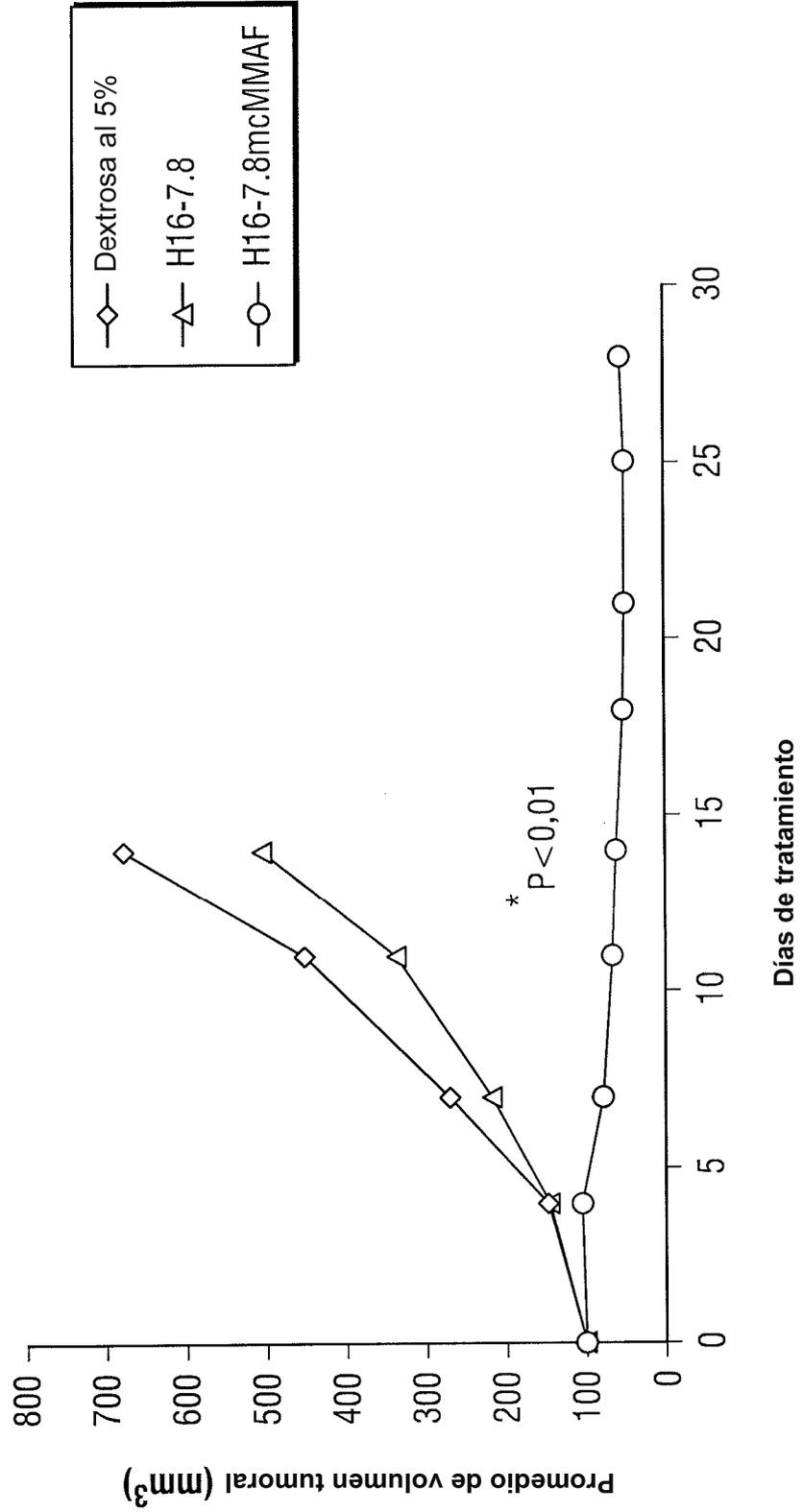


Figura 12: Estudio de eficacia de H16-7.8mcMMAF comparado con H16-7.8 en cáncer renal humano SKRC-01 en ratones SCID

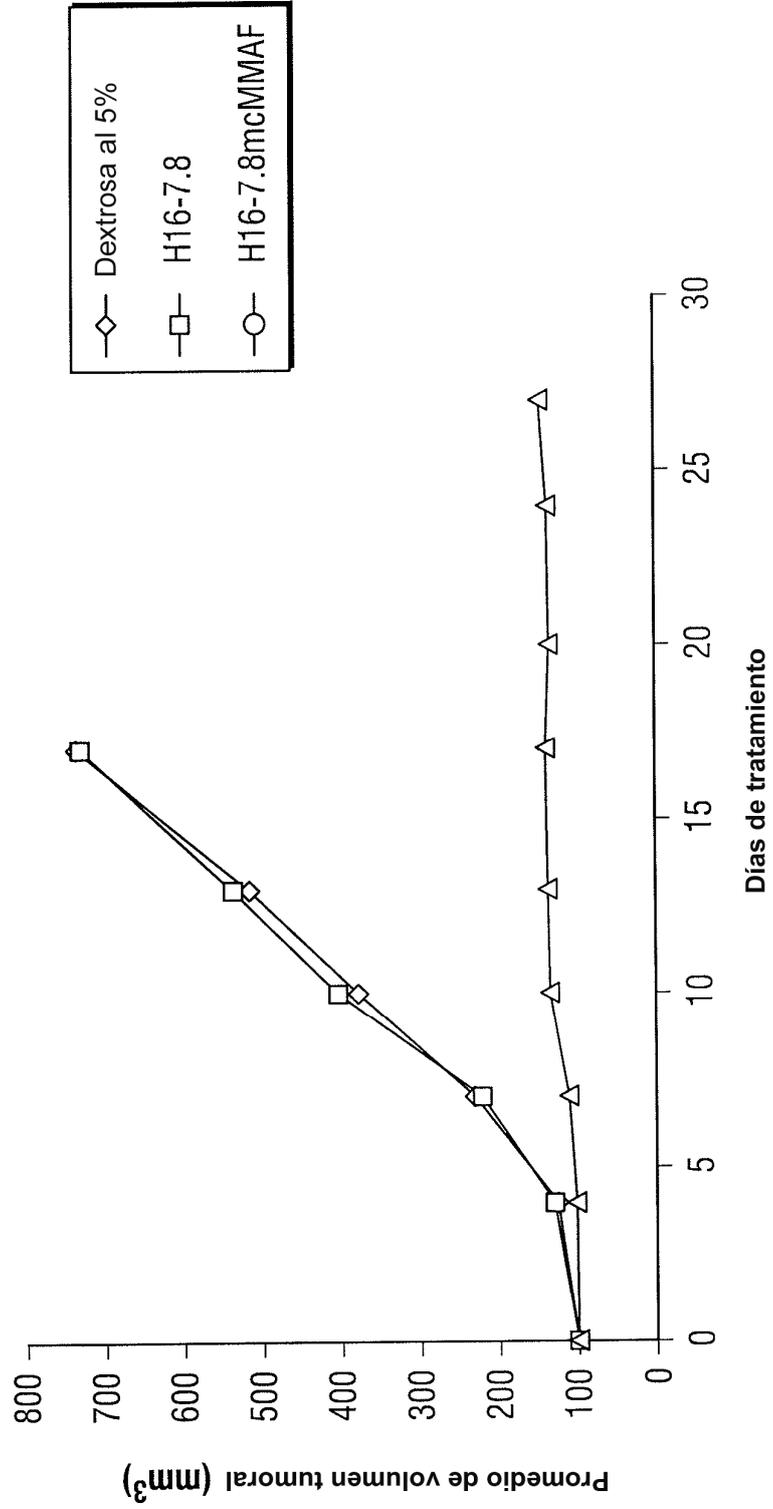


Figura 13: Eficacia de H16-7.8mcMMAF comparado con otros conjugados de fármaco y anticuerpo (ADC) de 161P2F10B en xenoinjertos de UG-K3 establecidos de modo subcutáneo en ratones SCID

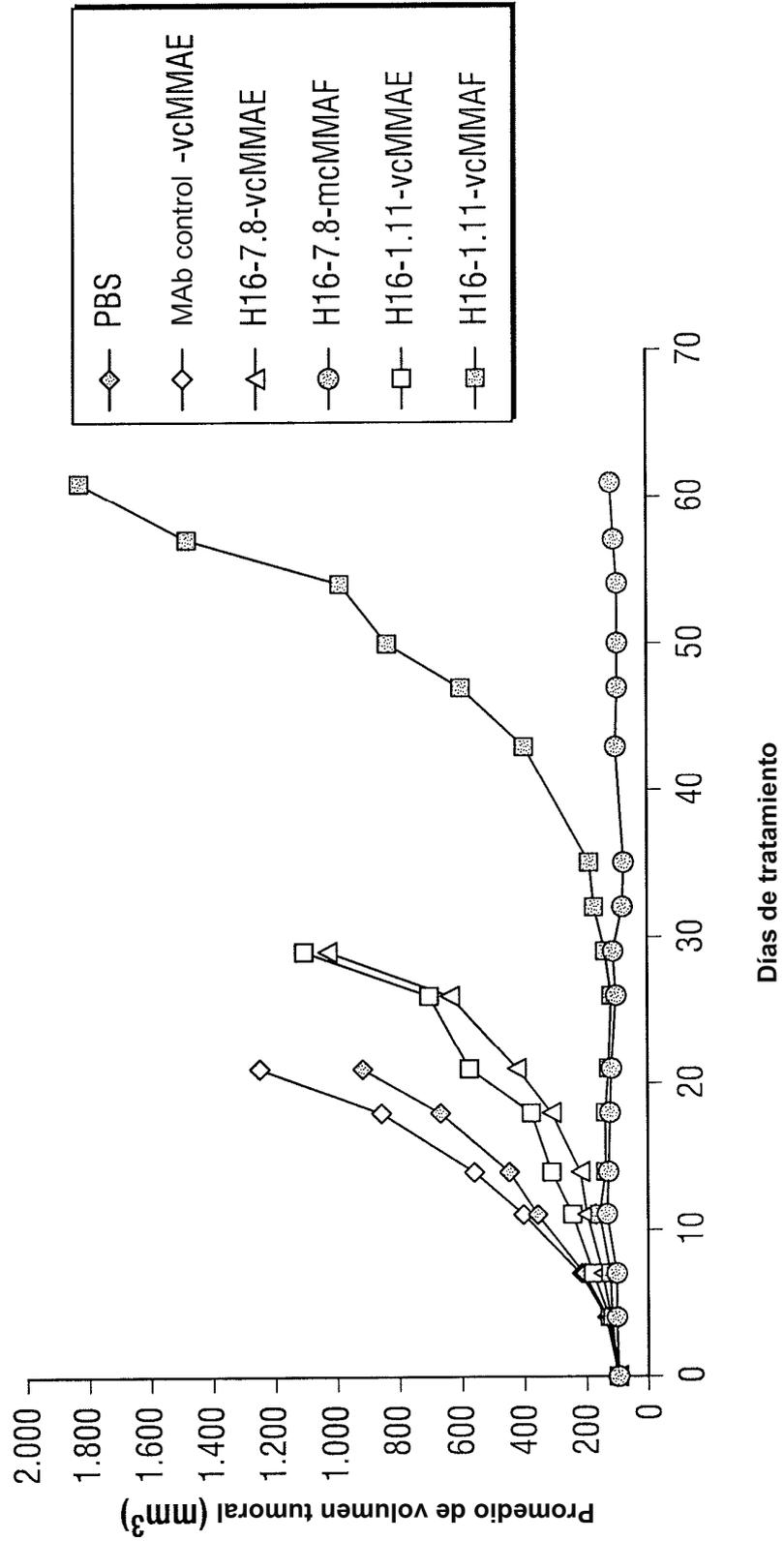


Figura 14: Mapas de péptidos de H16-7.8mcMMAF y H16-7.8

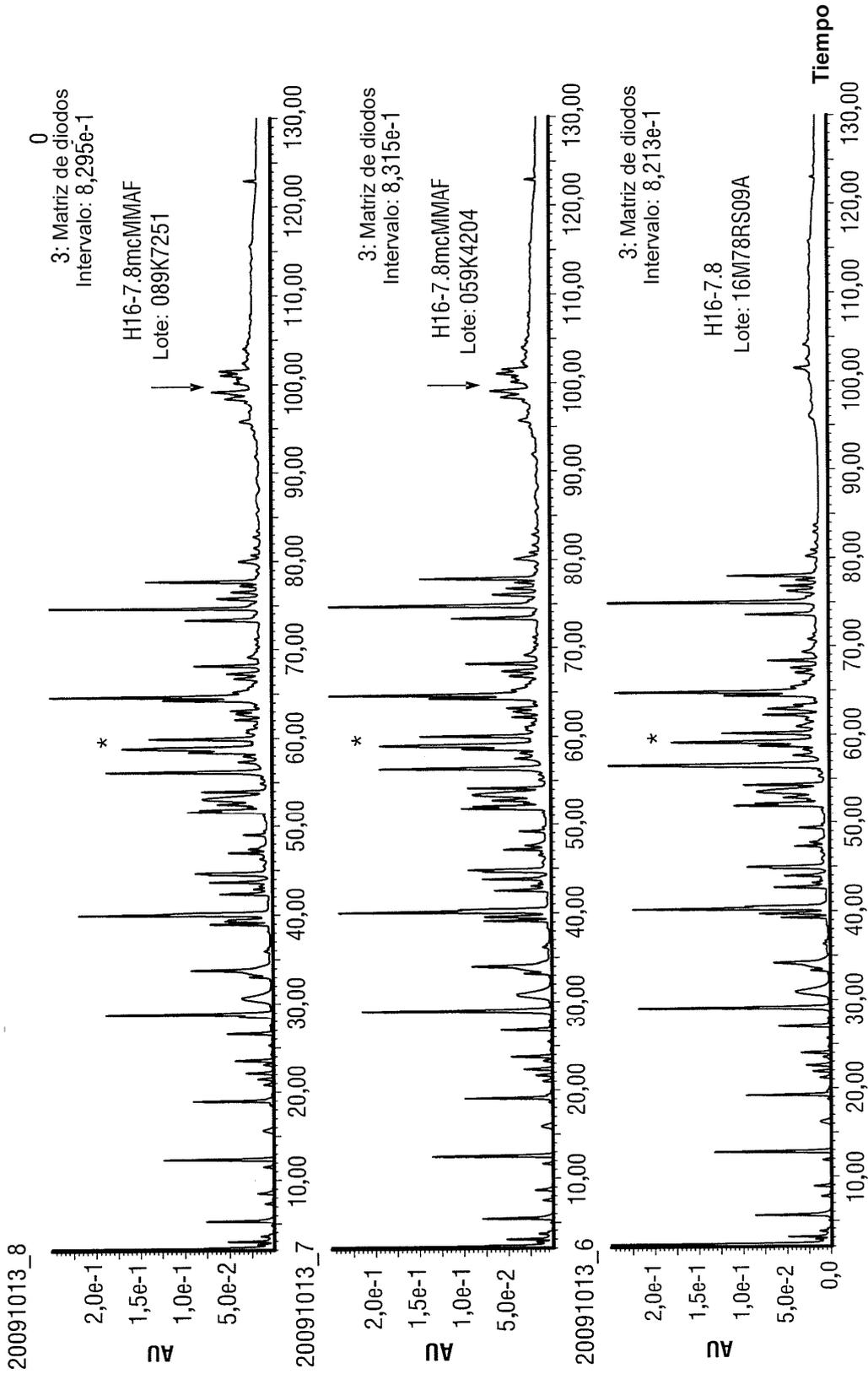
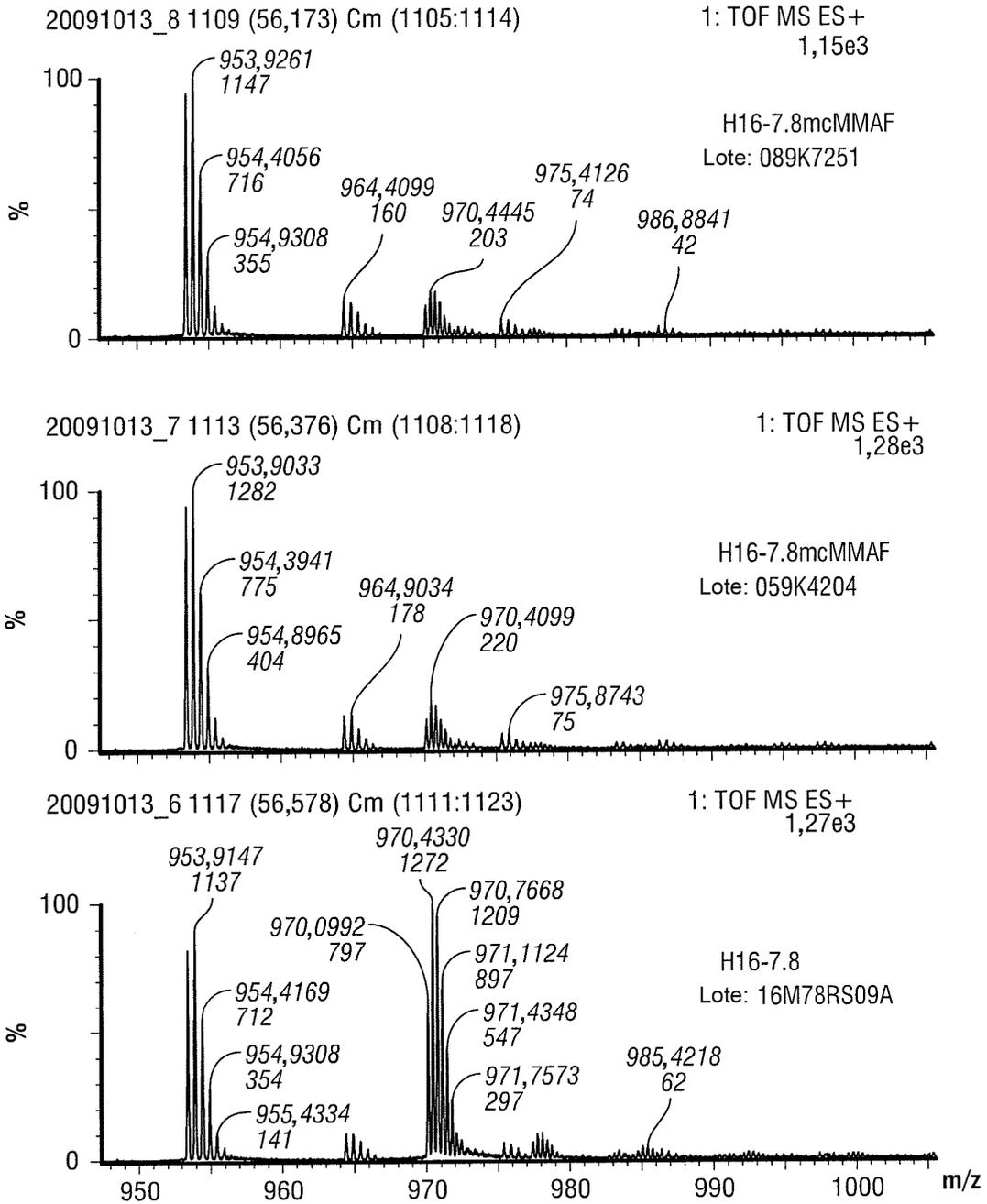
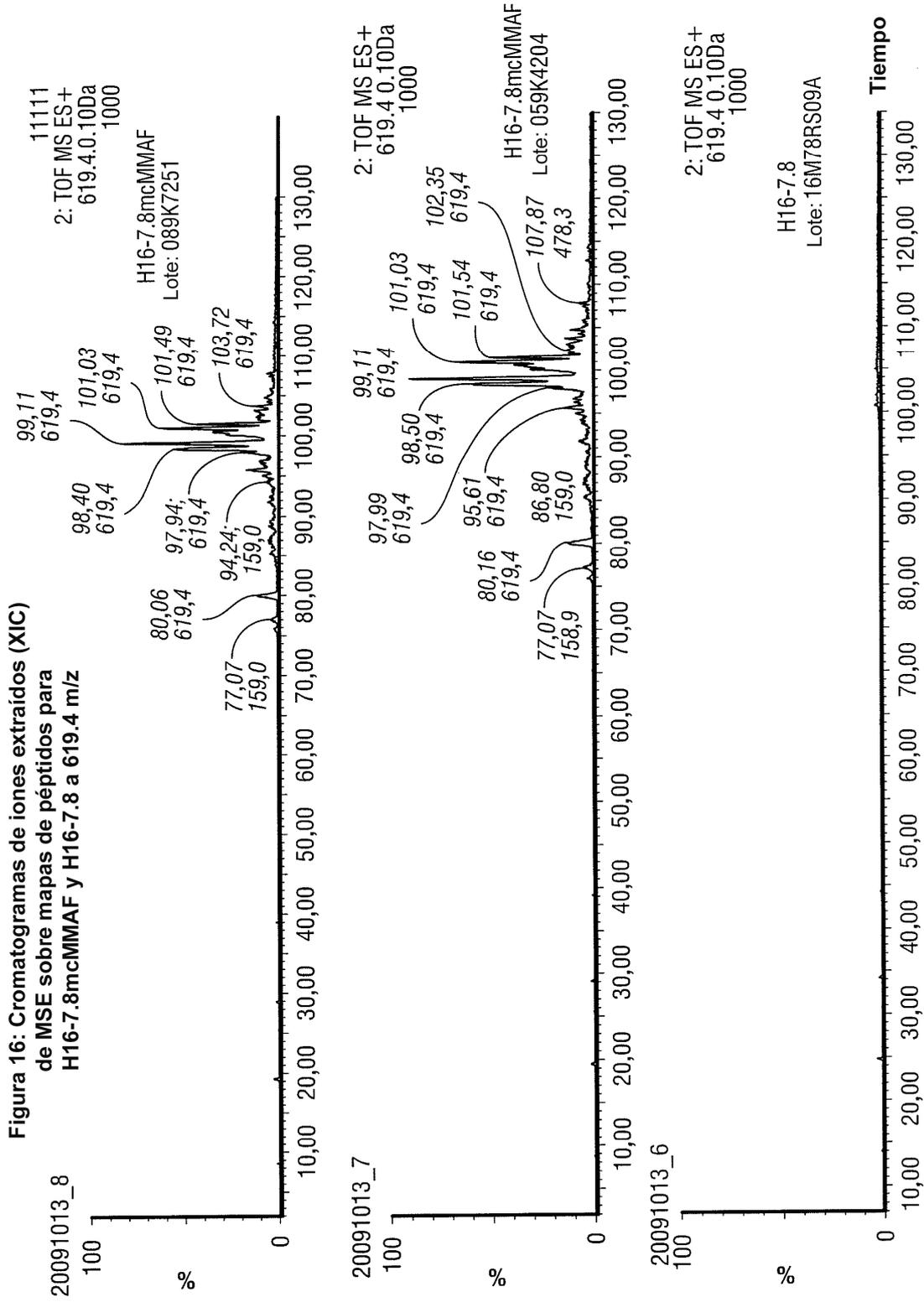


Figura 15: Espectro de masas del pico (*) de H16-7.8mcMMAF y H16-7.8





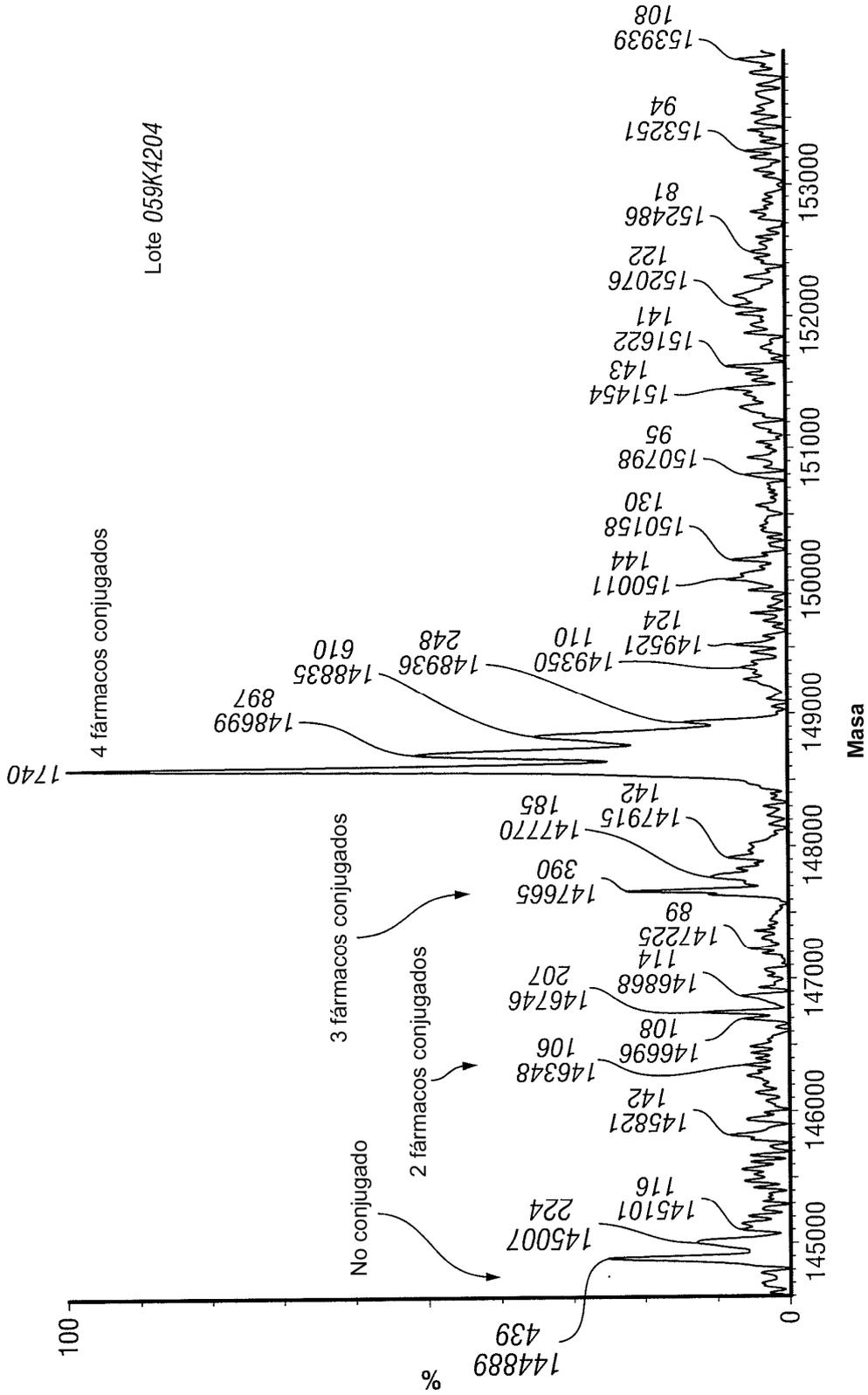


Figura 17(a): Ejemplos de espectros que muestran los perfiles de masa de H16-7.8mcMMAF desglycosilado

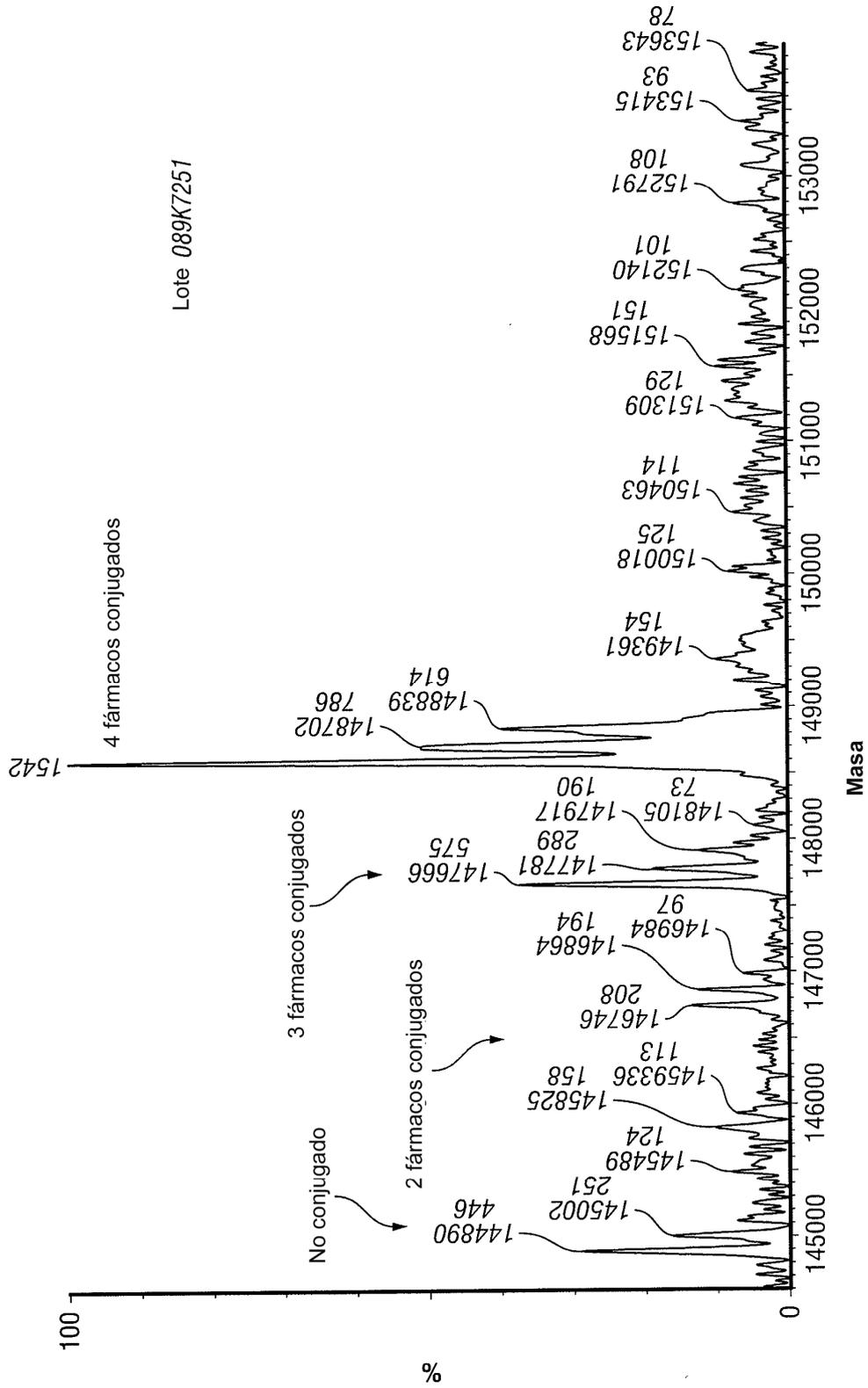


Figura 17(b): Ejemplos de espectros que muestran los perfiles de masa de H16-7.8mcMMAF desglucosilado

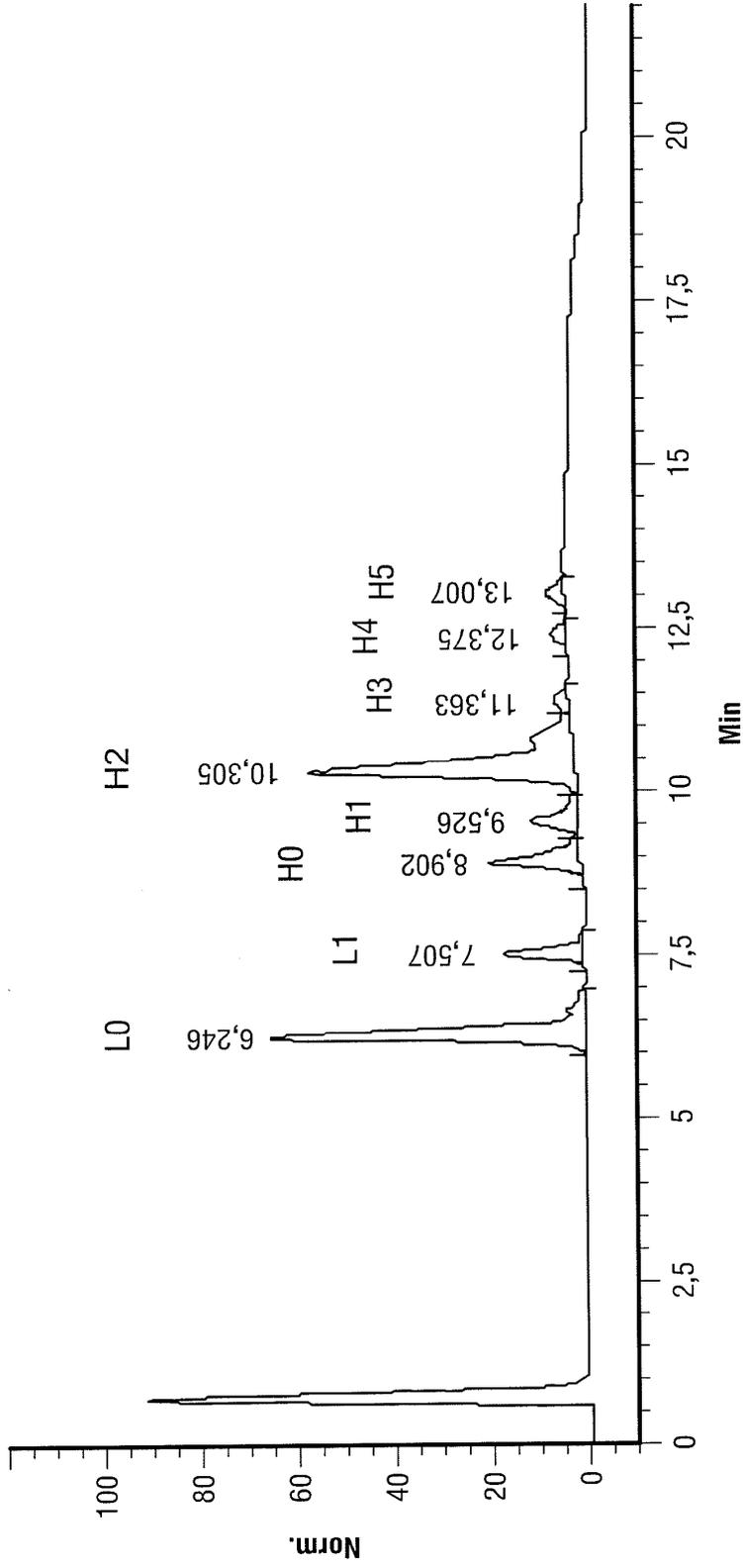


Figura 18: Perfil de proporción de fármaco a anticuerpo (DAR) de H16-7.8mcMMAF