

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 624**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2011 PCT/US2011/054054**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2012 WO12047724**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2011 E 11831345 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2621526**

54 Título: **Conjugados de anticuerpos y fármacos (CAF) que se unen a las proteínas 191P4D12**

30 Prioridad:

29.09.2010 US 387933 P

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

10.09.2018

73 Titular/es:

**AGENSYS, INC. (50.0%)
2225 Colorado Avenue
Santa Monica, CA 90404 , US y
SEATTLE GENETICS, INC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SATPAEV, DAULET;
MORRISON, ROBERT, KENDALL;
MORRISON, KAREN JANE, MEYRICK;
GUDAS, JEAN;
JAKOBOVITS, AYA;
TORGOV, MICHAEL y
AN, ZILI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 680 624 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 anticuerpos y fármacos (CAF) que se unen a las proteínas 191P4D12

Campo de la invención

5 La invención descrita en la presente memoria se refiere a anticuerpos, fragmentos de unión y conjugados de anticuerpo y fármaco (CAF) de los mismos, que se unen a proteínas, denominadas 191P4D12. La invención se refiere además a métodos y composiciones pronósticas, profilácticas y terapéuticas útiles en el tratamiento de cánceres que expresan 191P4D12.

Antecedentes de la invención

10 El cáncer es la segunda causa principal de muerte humana después de la enfermedad coronaria. En todo el mundo, millones de personas mueren de cáncer cada año. Solo en los Estados Unidos, según informa la Sociedad Estadounidense del Cáncer, el cáncer causa la muerte de más de medio millón de personas al año, con más de 1,2 millones de casos nuevos diagnosticados por año. Si bien las muertes por enfermedades del corazón han disminuido significativamente, las que resultan del cáncer generalmente están en aumento. En la primera parte del próximo siglo, se predice que el cáncer se convertirá en la principal causa de muerte.

15 En todo el mundo, varios tipos de cáncer se destacan como las principales causas de muerte. En particular, los carcinomas de pulmón, próstata, mama, colon, páncreas, ovario y vejiga representan las principales causas de muerte por cáncer. Estos y casi todos los otros carcinomas comparten una característica letal común. Con muy pocas excepciones, la enfermedad metastásica de un carcinoma es fatal. Además, incluso para aquellos pacientes con cáncer que inicialmente sobreviven a sus cánceres primarios, la experiencia común ha demostrado que sus
20 vidas están dramáticamente alteradas. Muchos pacientes con cáncer experimentan fuertes ansiedades impulsadas por la conciencia de la posibilidad de recurrencia o fracaso del tratamiento. Muchos pacientes con cáncer experimentan debilitaciones físicas después del tratamiento. Además, muchos pacientes con cáncer experimentan una recurrencia.

25 En todo el mundo, el cáncer de próstata es el cuarto cáncer más prevalente en los hombres. En América del Norte y el norte de Europa, es, con mucho, el cáncer más común en los hombres y es la segunda causa de muerte por cáncer en los hombres. Solo en los Estados Unidos, más de 30.000 hombres mueren anualmente de esta enfermedad, solo superada por el cáncer de pulmón. A pesar de la magnitud de estas cifras, todavía no existe un tratamiento efectivo para el cáncer de próstata metastásico. La prostatectomía quirúrgica, la radioterapia, la terapia de ablación hormonal, la castración quirúrgica y la quimioterapia continúan siendo las principales modalidades de
30 tratamiento. Desafortunadamente, estos tratamientos son ineficaces para muchos y a menudo se asocian con consecuencias indeseables.

35 En el frente diagnóstico, la falta de un marcador del tumor de próstata que pueda detectar con precisión los tumores localizados en estadio temprano sigue siendo una limitación significativa en el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad. Aunque el ensayo del antígeno específico de próstata en suero (PSA) ha sido una herramienta muy útil, su especificidad y utilidad general se considera ampliamente como carente en varios aspectos importantes.

40 El progreso en la identificación de marcadores específicos adicionales para el cáncer de próstata se ha mejorado con la generación de xenoinjertos de cáncer de próstata que pueden recapitular diferentes etapas de la enfermedad en ratones. Los xenoinjertos LAPC (cáncer de próstata de Los Ángeles) son xenoinjertos de cáncer de próstata que han sobrevivido a pasajes en ratones inmunodeficientes combinados (SCID) y han demostrado la capacidad de imitar la transición de la dependencia de andrógenos a la independencia androgénica (Klein et al., 1997, Nat. Med. 3: 402). Los marcadores de cáncer de próstata más recientemente identificados incluyen PCTA-1 (Su et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) (Pinto et al., Clin Cancer Res 1996 Sep. 2 (9): 1445 - 51), STEAP (Hubert, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 7 de diciembre; 96 (25): 14523 - 8) y antígeno prostático de células madre (PSCA) (Reiter et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735).

45 Mientras que los marcadores previamente identificados como PSA han facilitado los esfuerzos para diagnosticar y tratar el cáncer de próstata, existe la necesidad de identificar marcadores adicionales y dianas terapéuticas para la próstata y cánceres relacionados con el fin de mejorar aún más el diagnóstico y la terapia. Se estima que 130.200 casos de cáncer colorrectal ocurrieron en 2000 en los Estados Unidos, incluidos 93.800 casos de cáncer de colon y 36.400 de cáncer de recto.

50 Los cánceres colorrectales son el tercer tipo de cáncer más común en hombres y mujeres. Las tasas de incidencia disminuyeron significativamente durante 1992-1996 (-2,1% por año). La investigación sugiere que estas disminuciones se han debido a un aumento en el cribado y la eliminación de pólipos, lo que previene la progresión de pólipos a cánceres invasivos. Hubo una estimación de 56.300 muertes (47.700 por cáncer de colon, 8.600 por cáncer de recto) en 2000, lo que representa aproximadamente el 11% de todas las muertes por cáncer en los
55 Estados Unidos.

En la actualidad, la cirugía es la forma más común de terapia para el cáncer colorrectal, y para los cánceres que no se han dispersado, a menudo es curativa. La quimioterapia, o quimioterapia más radiación, se administra antes o después de la cirugía a la mayoría de los pacientes cuyo cáncer ha perforado profundamente la pared del intestino o se ha dispersado a los ganglios linfáticos. En ocasiones se necesita una colostomía permanente (creación de una
 5 abertura abdominal para la eliminación de los desechos corporales) para el cáncer de colon y con poca frecuencia se requiere para el cáncer de recto. Sigue existiendo la necesidad de modalidades efectivas de diagnóstico y tratamiento para el cáncer colorrectal.

De todos los casos nuevos de cáncer en los Estados Unidos, el cáncer de vejiga representa aproximadamente el 5 por ciento en los hombres (el quinto neoplasma más común) y el 3 por ciento en las mujeres (el octavo neoplasma más común). La incidencia aumenta lentamente, al mismo tiempo que aumenta la población de mayor edad. En
 10 1998, se estimaba que había 54.500 casos, incluidos 39.500 en hombres y 15.000 en mujeres. La incidencia ajustada por edad en los Estados Unidos es de 32 por 100.000 para los hombres y ocho por 100.000 en las mujeres. La proporción histórica masculina/femenina de 3:1 puede estar disminuyendo en relación con los patrones de tabaquismo en las mujeres. Se estima que hubo 11.000 muertes por cáncer de vejiga en 1998 (7.800 en hombres y
 15 3.900 en mujeres). La incidencia y la mortalidad del cáncer de vejiga aumentan fuertemente con la edad y será un problema creciente a medida que la población envejezca.

La mayoría de los cánceres de vejiga se repiten en la vejiga. El cáncer de vejiga se trata con una combinación de resección transuretral de la vejiga (RTU) y quimioterapia o inmunoterapia intravesical. La naturaleza multifocal y recurrente del cáncer de vejiga señala las limitaciones de la RTU. La mayoría de los cánceres musculares invasivos
 20 no se curan con la RTU sola. La cistectomía radical y la derivación urinaria son los medios más efectivos para eliminar el cáncer, pero tienen un impacto innegable en la función urinaria y sexual. Sigue existiendo una necesidad significativa de modalidades de tratamiento que sean beneficiosas para los pacientes con cáncer de vejiga.

Se estima que hubo 164.100 nuevos casos de cáncer de pulmón y bronquios en 2000, lo que representa el 14% de todos los diagnósticos de cáncer en los EE. UU. La tasa de incidencia del cáncer pulmonar y bronquial está
 25 disminuyendo significativamente en los hombres, desde un máximo de 86,5 por 100.000 en 1984 a 70,0 en 1996. En la década de 1990, la tasa de aumento entre las mujeres comenzó a disminuir. En 1996, la tasa de incidencia en mujeres fue de 42,3 por 100.000.

El cáncer pulmonar y bronquial causó una estimación de 156.900 muertes en 2000, lo que representa el 28% de todas las muertes por cáncer. Durante 1992-1996, la mortalidad por cáncer de pulmón disminuyó significativamente
 30 entre los hombres (-1,7% por año) mientras que las tasas para las mujeres todavía estaban aumentando significativamente (0,9% por año). Desde 1987, han muerto más mujeres cada año por cáncer de pulmón que por cáncer de mama, que, durante más de 40 años, fue la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres. La disminución de la incidencia del cáncer de pulmón y las tasas de mortalidad muy probablemente se debieron a la
 35 disminución de las tasas de tabaquismo en los últimos 30 años; sin embargo, la disminución de los patrones de tabaquismo entre las mujeres es inferior a la de los hombres. Es preocupante que, aunque el consumo de tabaco entre los adultos se ha reducido, el consumo de tabaco en los jóvenes está aumentando nuevamente.

Las opciones de tratamiento para el cáncer pulmonar y bronquial están determinadas por el tipo y el estadio del cáncer e incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia. Para muchos cánceres localizados, la cirugía suele ser el
 40 tratamiento de elección. Debido a que la enfermedad generalmente se ha diseminado cuando se descubre, a menudo se necesita radioterapia y quimioterapia en combinación con la cirugía. La quimioterapia sola o combinada con radiación es el tratamiento de elección para el cáncer de pulmón de células pequeñas; en este régimen, un gran porcentaje de pacientes experimentan remisión, que en algunos casos es de larga duración. Sin embargo, existe una necesidad constante de tratamiento efectivo y enfoques de diagnóstico para los cánceres de pulmón y
 bronquios.

Se calcula una estimación de que habrá 182.800 nuevos casos invasivos de cáncer de mama entre las mujeres en los Estados Unidos durante el año 2000. Además, se esperaba que cerca de 1.400 nuevos casos de cáncer de
 45 mama se diagnosticaran en hombres en 2000. Después de aumentar alrededor del 4% por año en la década de 1980, las tasas de incidencia del cáncer de mama en las mujeres se han estabilizado en la década de 1990 a alrededor de 110,6 casos por 100.000.

Solo en los EE. UU. hubo una estimación de 41.200 muertes (40.800 mujeres, 400 hombres) en 2000 debido al
 50 cáncer de mama. El cáncer de mama ocupa el segundo lugar entre las muertes por cáncer en las mujeres. Según los datos más recientes, las tasas de mortalidad disminuyeron significativamente durante 1992-1996, siendo las mayores disminuciones en las mujeres más jóvenes, tanto blancas como negras. Estas disminuciones fueron probablemente el resultado de una detección más temprana y un tratamiento mejorado.

Teniendo en cuenta las circunstancias médicas y las preferencias del paciente, el tratamiento del cáncer de mama puede incluir una tumorectomía (extirpación local del tumor) y la extirpación de los ganglios linfáticos debajo del
 55 brazo; mastectomía (extracción quirúrgica de la mama) y extirpación de los ganglios linfáticos debajo del brazo; radioterapia; quimioterapia; o terapia hormonal. A menudo, se usan dos o más métodos en combinación. Numerosos estudios han demostrado que, para la enfermedad en estadio temprano, las tasas de supervivencia a largo plazo

después de la lumpectomía más la radioterapia son similares a las tasas de supervivencia después de la mastectomía radical modificada. Los avances significativos en las técnicas de reconstrucción proporcionan varias opciones para la reconstrucción mamaria después de la mastectomía. Recientemente, dicha reconstrucción se realizó al mismo tiempo que la mastectomía.

5 La extirpación local del carcinoma ductal in situ (CDIS) con cantidades adecuadas de tejido mamario circundante normal puede prevenir la recurrencia local del CDIS. La radiación en la mama y/o el tamoxifeno pueden reducir la posibilidad de que ocurra CDIS en el resto del tejido mamario. Esto es importante porque el CDIS, si no se trata, puede convertirse en un cáncer de mama invasivo. Sin embargo, hay serios efectos secundarios o secuelas de estos tratamientos. Por lo tanto, existe la necesidad de tratamientos eficaces contra el cáncer de mama.

10 Se estima que hubo 23.100 nuevos casos de cáncer de ovario en los Estados Unidos en 2000. Representa el 4% de todos los cánceres entre las mujeres y ocupa el segundo lugar entre los cánceres ginecológicos. Durante 1992-1996, las tasas de incidencia del cáncer de ovario disminuyeron significativamente. Como consecuencia del cáncer de ovario, hubo una estimación de 14.000 muertes en 2000. El cáncer de ovario causa más muertes que cualquier otro cáncer del sistema reproductivo femenino.

15 La cirugía, la radioterapia y la quimioterapia son opciones de tratamiento para el cáncer de ovario. La cirugía generalmente incluye la extirpación de uno o ambos ovarios, las trompas de Falopio (salpingo-ooforectomía) y el útero (histerectomía). En algunos tumores muy tempranos, solo se eliminará el ovario involucrado, especialmente en mujeres jóvenes que desean tener hijos. Cuando la enfermedad está avanzada, se intenta eliminar toda la enfermedad intraabdominal para mejorar el efecto de la quimioterapia. Sigue existiendo una importante necesidad de opciones de tratamiento efectivas para el cáncer de ovario.

20 Se estima que hubo 28.300 nuevos casos de cáncer de páncreas en los Estados Unidos en 2000. En los últimos 20 años, las tasas de cáncer de páncreas han disminuido en los hombres. Las tasas entre las mujeres se han mantenido aproximadamente constantes, pero pueden estar empezando a disminuir. El cáncer de páncreas causó una estimación de 28.200 muertes en 2000 en los Estados Unidos. En los últimos 20 años, ha habido una ligera, pero significativa, disminución en las tasas de mortalidad entre los hombres (alrededor de -0,9% por año) mientras que las tasas han aumentado levemente entre las mujeres.

25 La cirugía, la radioterapia y la quimioterapia son opciones de tratamiento para el cáncer de páncreas. Estas opciones de tratamiento pueden extender la supervivencia y/o aliviar los síntomas en muchos pacientes, pero es probable que no produzcan una cura para la mayoría. Existe una necesidad significativa de opciones terapéuticas y de diagnóstico adicionales para los cánceres. Éstas incluyen el uso de anticuerpos, vacunas y moléculas pequeñas como modalidades de tratamiento. Además, también existe la necesidad de utilizar estas modalidades como herramientas de investigación para diagnosticar, detectar, controlar y promover el estado del arte en todas las áreas de tratamiento y estudios del cáncer.

30 La utilidad terapéutica de los anticuerpos monoclonales (mAbs) (G. Kohler y C. Milstein, Nature 256: 495-497 (1975)) se está realizando. Los anticuerpos monoclonales ahora han sido aprobados como terapias en trasplantes, cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades cardiovasculares e inflamación. Los diferentes isotipos tienen diferentes funciones efectoras. Tales diferencias en la función se reflejan en distintas estructuras tridimensionales para los diferentes isotipos de inmunoglobulinas (P.M. Alzari et al., Annual Rev. Immunol., 6: 555 - 580 (1988)).

35 Debido a que los ratones son convenientes para la inmunización y reconocen la mayoría de los antígenos humanos como extraños, los mAb contra dianas humanas con potencial terapéutico han sido típicamente de origen murino. Sin embargo, los mAbs murinos tienen desventajas inherentes como agentes terapéuticos humanos. Requieren una dosificación más frecuente ya que los mAbs tienen una semivida circulante más corta en humanos que los anticuerpos humanos. Más críticamente, la administración repetida de anticuerpos murinos para el sistema inmune humano hace que el sistema inmune humano responda al reconocer la proteína del ratón como extraña y generando una respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA). Dicha respuesta HAMA puede dar como resultado una reacción alérgica y la eliminación rápida del anticuerpo murino del sistema, lo que hace inútil el tratamiento con anticuerpos murinos. Para evitar tales efectos, se han intentado crear sistemas inmunes humanos en ratones.

40 Los intentos iniciales esperaban crear ratones transgénicos capaces de responder a antígenos con anticuerpos que tienen secuencias humanas (véase Bruggemann et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86: 6709-6713 (1989)), pero estaban limitados por la cantidad de ADN que podría mantenerse de manera estable por los vehículos de clonación disponibles. El uso de vectores de clonación del cromosoma artificial de levadura (YAC) condujo a la introducción de fragmentos de línea germinal grandes de locus de Ig humana en mamíferos transgénicos. Esencialmente, la mayoría de los genes de la región humana V, D y J dispuestos con el mismo espaciamiento encontrado en el genoma humano y las regiones constantes humanas se introdujeron en ratones usando YAC. Una de estas cepas de ratones transgénicos se conoce como ratones Xenomouse® y está disponible comercialmente en Amgen Fremont, Inc. (Fremont Calif.).

55 La solicitud de patente AU 2008 202 217 A1 (Agensys In.), 5 de junio de 2008, describe el gen de 191P4D12 (b) y su proteína codificada. Los anticuerpos o las células T reactivas con 191P4D12(b) pueden usarse en inmunización

activa o pasiva. Se menciona adicionalmente que los anticuerpos también pueden conjugarse con una enzima activadora anticancerosa pro-fármaco capaz de convertir el profármaco en su forma activa. Sin embargo, los anticuerpos no se caracterizan por sus secuencias y no se usan en combinación con monometil auristatinas como agente citotóxico como uno de los compuestos principales.

5 Sumario de la invención

La invención proporciona anticuerpos, fragmentos de unión y conjugados de anticuerpo y fármaco (CAF) de los mismos que se unen a proteínas 191P4D12 y fragmentos de polipéptidos de proteínas 191P4D12. En algunas realizaciones, la invención comprende anticuerpos completamente humanos conjugados con un agente terapéutico. En ciertas realizaciones, hay una condición de que toda la secuencia de ácidos nucleicos de la FIG. 3 no está codificada y/o la secuencia de aminoácidos completa de la FIG. 2 no está preparada. En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico completa de la FIG. 3 está codificada y/o la secuencia de aminoácidos completa de la FIG. 2 está preparada, cualquiera de los cuales están en formas de dosis unitarias humanas respectivas.

La invención proporciona además diversas composiciones inmunogénicas o terapéuticas, tales como conjugados de anticuerpo y fármaco, y estrategias para tratar cánceres que expresan 191P4D12, tales como los cánceres de tejidos enumerados en la Tabla I.

Breve descripción de las figuras

FIG. 1. El ADNc y la secuencia de aminoácidos de 191P4D12 se muestran en la FIG. 1. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 264 - 1796 que incluye el codón de parada.

20 Figs. 2A-B. Secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de anticuerpos 191P4D12. FIG. 2A. El ADNc y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada Ha22-2(2,4)6.1. El doble subrayado es la secuencia líder, subrayada está la región variable de la cadena pesada, y subrayada con una línea discontinua está la región constante IgG1 humana. FIG. 2B. El ADNc y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera Ha22-2(2,4)6.1. El doble subrayado es la secuencia líder, subrayada está la región variable de la cadena ligera, y subrayada con una línea discontinua está la región constante kappa humana.

25 Figs. 3A-B. Secuencias de aminoácidos de anticuerpos 191P4D12. FIG. 3A. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada Ha22-2(2,4)6.1. El doble subrayado es la secuencia líder, subrayada está la región variable de la cadena pesada, y subrayada con una línea discontinua está la región constante IgG1 humana. FIG. 3B. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera Ha22-2(2,4)6.1. El doble subrayado es la secuencia líder, subrayada está la región variable de la cadena ligera, y subrayada con una línea discontinua está la región constante kappa humana.

30 Figs. 4A-B. Alineación de anticuerpos Ha22-2(2,4)6.1 frente a la línea germinal de Ig humana. FIG. 4A. Alineación de la cadena pesada Ha22-2(2,4)6.1 con la línea germinal de Ig humana. FIG. 4B. Alineación de la cadena ligera Ha22-2(2,4)6.1 con la línea germinal de Ig humana.

35 Figs. 5A-B. Ensayos de unión de MAb Ha22-2(2,4)6.1. FIG. 5A: Se tiñeron células RAT-control y RAT-191P4D12 con mAb Ha22-2(2,4)6.1 de células hibridomas o CHO. La unión se detectó mediante citometría de flujo. Los resultados muestran que Ha22-2(2,4)6.1 MAb expresado de forma recombinante en células CHO se secreta y se une específicamente a la superficie celular 191P4D12. FIG. 5B: El MAb Ha22-2(2,4)6.1 de células de hibridoma o CHO se ensayó para determinar la unión a la proteína extracelular purificada 191P4D12 recombinante mediante ELISA. Los resultados muestran que la unión de la proteína 191P4D12 a Ha22-2(2,4)6.1 derivada de CHO e hibridoma era idéntica.

FIG. 6. Determinación de la afinidad Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE por FACS usando células PC3-Human-191P4D12. La afinidad es 0,69 Kd.

45 FIG. 7. Determinación de la afinidad Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE por FACS usando células PC3-Macaco Rhesus-191P4D12. La afinidad es 0,34 Kd.

FIG. 8. Determinación de la afinidad Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE por FACS usando células PC3-Rat-191P4D12. La afinidad es de 1,6 Kd.

50 Figs. 9A-D. Citotoxicidad celular mediada por Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE. FIG. 9A: Ensayo de citotoxicidad celular usando células PC3-Human-191P4D12. FIG. 9B: Ensayo de citotoxicidad celular usando células PC3-Macaco Rhesus-191P4D12. FIG. 9C: Ensayo de citotoxicidad celular usando células PC3-Rat-191P4D12. FIG. 9D: Ensayo de citotoxicidad celular usando células PC3-Neo.

FIG. 10. Mapeo de dominio de MAb Ha22-(2,4)6.1 por FACS.

FIG. 11. Mapeo de dominio MAb Ha22-2(2,4)6.1 por análisis de transferencia Western.

- FIG. 12. Evaluación del mAb Ha22-2(2,4)6.1 en el modelo de formación de tumor subcutáneo de xenoinjerto de cáncer de pulmón humano AG-L4 en ratones SCID. Los resultados muestran que los MAbs de 191P4D12 no inhibieron significativamente el crecimiento tumoral en el xenoinjerto de cáncer de pulmón humano AG-L4 en ratones SCID.
- 5 FIG. 13. Evaluación del mAb Ha22-2(2,4)6.1 en el modelo de formación tumoral subcutánea de xenoinjerto de cáncer pancreático humano HPAC en ratones SCID. Los resultados muestran que los MAbs de 191P4D12 no inhibieron el crecimiento tumoral en un xenoinjerto pancreático humano en ratones SCID en comparación con el anticuerpo de control.
- 10 FIG. 14. Evaluación del mAb Ha22-2(2,4)6.1 en el modelo de formación tumoral subcutánea de xenoinjerto de cáncer pancreático humano AG-Panc3 en ratones SCID. Los resultados muestran que los MAbs de 191P4D12 no inhibieron el crecimiento tumoral en un xenoinjerto pancreático humano en ratones SCID en comparación con el anticuerpo de control.
- 15 FIG. 15. Eficacia de Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE en xenoinjerto de cáncer de pulmón humano establecido por vía subcutánea AG-L4 en ratones SCID. Los resultados muestran que el tratamiento con Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de pulmón AG-L4 implantados por vía subcutánea en ratones atímicos en comparación con el control tratado y el no tratado.
- 20 FIG. 16. Eficacia de Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE en xenoinjerto de cáncer de mama humano subcutáneo BT-483 en ratones SCID. Los resultados muestran que el tratamiento con Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de tumor de mama BT-483 implantados por vía subcutánea en ratones SCID en comparación con los CAFs de control tratados y no tratados.
- FIG. 17. Eficacia de Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE en xenoinjerto de cáncer de vejiga humano establecido por vía subcutánea AG-B1 en ratones SCID. Los resultados muestran que el tratamiento con Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de vejiga AG-B1 en comparación con los CAF de control.
- 25 FIG. 18. Eficacia de Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE en el xenoinjerto de cáncer de páncreas humano establecido por vía subcutánea AG-Panc2 en ratones SCID. Los resultados muestran que el tratamiento con Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de páncreas AG-Panc2 en comparación con los CAF de control.
- 30 FIG. 19. Eficacia de Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE en xenoinjerto de cáncer de pulmón humano establecido por vía subcutánea AG-Panc4 en ratones SCID. Los resultados muestran que el tratamiento con Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de páncreas AG-Panc4 en comparación con los CAF de control.
- 35 FIG. 20. Eficacia de Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE a dosis comparativa en xenoinjerto de cáncer de vejiga humano establecido por vía subcutánea AG-B8 en ratones SCID. Los resultados muestran que el tratamiento con Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE a 10 mg/kg inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de vejiga AG-B8 en comparación con Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE a 5 mg/kg.
- 40 Figs. 21A-N. Detección de proteína 191P4D12 en muestras de pacientes con cáncer por IHC. Figs. 21A-B muestran muestras de cáncer de vejiga. Figs. 21C-D muestran muestras de cáncer de mama. Figs. 21E-F muestran muestras de cáncer de páncreas. Figs. 21G-H muestran muestras de cáncer de pulmón. Figs. 21I-J muestran muestras de cáncer de ovario. Figs. 21K-L muestran muestras de cáncer de esófago. FIG. 21M-N muestran muestras de cáncer de esófago.
- 45 Figs. 22A-B. Muestra las curvas de unión utilizadas para determinar la afinidad de Mab Ha22-2(2,4)6.1 y Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE a 191P4D12 recombinante purificado (aminoácidos ECD 1-348).
- Figs. 23A-D. Muestra la unión de Ha22-2(2,4)6.1 a células PC3 que expresan 191P4D12 (Figura 23A) y ortólogos de macaco cangrejero (Figura 23B), rata (Figura 23C) y ratón (Figura 23D).
- Figs. 24A-D. Muestra la unión de Ha22-2(2,4)6.1 al doble mutante A76I, S91N es similar a la unión del ortólogo murino.
- 50 FIG. 25. Muestra un modelo del dominio V de 191P4D12 basado en datos de la estructura cristalina publicados para miembros de la familia de proteínas que contienen el dominio Ig y 191P4D12 usando PyMOL. Se muestran las posiciones de Ala-76 (trazado punteado) y Ser-91 (trazado entramado).
- Figs. 26A-C. Muestra que la unión de Ha22-2(2,4)6.1 se une a células que expresan el dominio V (Figura 26A) así como a 191P4D12 de tipo salvaje (Figura 26B), pero no a las células que expresan el dominio C1C2 generadas anteriormente (Figura 26C).

Descripción detallada de la invención

Esquema de Secciones

I.) Definiciones

II.) Anticuerpos 191P4D12

III.) Conjugados de fármaco de anticuerpo Generalmente

5 III (A). Maitansinoides

III (B). Auristatinas y dolostatinas

III (C). Caliqueamicina

III (D). Otros agentes citotóxicos

IV.) Conjugados de fármaco de anticuerpo que se unen a 191P4D12

10 V.) Unidades de enlace

VI.) La unidad de estiramiento

VII.) La unidad de aminoácido

VIII.) La unidad espaciadora

IX.) La unidad de fármaco

15 X.) Carga farmacéutica

XI.) Métodos para determinar el efecto citotóxico de los CAF

XII.) Tratamiento del cáncer o de los cánceres que expresan 191P4D12

XIII.) 191P4D12 como un objetivo para la terapia basada en anticuerpos

XIV.) Cócteles CAF 191P4D12

20 XV) Terapia de combinación

XVI.) Kits/Artículos de fabricación

I.) Definiciones:

25 A menos que se defina lo contrario, todos los términos de la técnica, las anotaciones y otros términos científicos o terminología utilizados en la presente memoria pretenden tener los significados comúnmente entendidos por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en este documento para mayor claridad y/o para una referencia rápida, y la inclusión de tales definiciones en el presente documento no debe interpretarse necesariamente como una diferencia sustancial con respecto a lo que generalmente se entiende en la técnica. Muchas de las técnicas y procedimientos descritos o referenciados en la presente son bien entendidos y comúnmente empleados usando metodología

30 convencional por los expertos en la técnica, tales 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 corresponda, los procedimientos que implican el uso de kits y reactivos disponibles comercialmente generalmente se llevan a cabo de acuerdo con los protocolos y/o parámetros definidos por el fabricante, a menos que se indique lo contrario.

35 Cuando se utiliza un nombre comercial en el presente documento, la referencia al nombre comercial también se refiere a la formulación del producto, el medicamento genérico y el/los ingrediente(s) farmacéutico(s) activo(s) del producto de nombre comercial, a menos que el contexto indique lo contrario.

40 Las expresiones "cáncer avanzado", "cáncer avanzado localmente", "enfermedad avanzada" y "enfermedad localmente avanzada" significan cánceres que se han extendido a través de la cápsula de tejido relevante, y están destinados a incluir la enfermedad en estadio C según el sistema de la Asociación Americana de Urología (AUA), estadio de enfermedad C1-C2 bajo el sistema de Whitmore-Jewett, y la etapa T3-T4 y la enfermedad N+ bajo el sistema TNM (tumor, nudo, metástasis). En general, no se recomienda la cirugía para pacientes con enfermedad localmente avanzada, y estos pacientes tienen resultados sustancialmente menos favorables en comparación con pacientes que tienen cáncer clínicamente localizado (confinado al órgano).

La abreviatura "AFP" se refiere a dimetilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina-p-fenilendiamina (véase la Fórmula XVI infra).

La abreviatura "MMAE" se refiere a monometil auristatina E (véase la Fórmula XI más adelante).

5 La abreviatura "AEB" se refiere a un éster producido haciendo reaccionar auristatina E con ácido paraacetilbenzoico (ver Fórmula XX infra).

La abreviatura "AEVB" se refiere a un éster producido haciendo reaccionar auristatina E con ácido benzoilvalérico (véase la Fórmula XXI infra).

La abreviatura "MMAF" se refiere a dovalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina (véase la Fórmula XIV infra).

10 A menos que se 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 sub-combinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en él), siendo preferidos desde aproximadamente 1 a aproximadamente 8 los átomos de carbono. Ejemplos de grupos alquilo son metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, 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.

15 Los grupos alquilo, ya sea solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferiblemente de 1 a 3 grupos (y cualesquiera sustituyentes adicionales seleccionados de halógeno), que incluyen, pero sin limitación, -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, donde cada R' se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈ o -arilo, y en el que dicho -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -alquilo C₁-C₈, alqueno C₂-C₈ y grupos alquino C₂-C₈ pueden estar opcionalmente sustituidos adicionalmente con uno o más grupos que incluyen, pero sin limitación, 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, donde cada R" se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈ o -arilo.

20 A menos que se indique lo contrario, los términos "alqueno" y "alquino" se refieren a cadenas de carbono lineales y ramificadas que tienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y sub-combinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en ellas), 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 sin limitación, etileno o vinilo, alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutileno, -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 sin limitación, acetilénico, propargilo, acetilenilo, propinilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo y -3-metil-1-butenilo.

25 Los grupos alqueno y alquino, ya sea 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 sin limitación, -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, donde cada R' es independientemente seleccionado entre -H, -alquilo C₁-C₈, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈ o -arilo y en el que dicho -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -alquilo C₁-C₈, alqueno C₂-C₈ y grupos alquino C₂-C₈ pueden estar opcionalmente sustituidos adicionalmente con uno o más sustituyentes que incluyen, pero sin limitación, -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, donde cada R" se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈ o -arilo.

30 A menos que se 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 sub-combinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), siendo preferido desde aproximadamente 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono y con dos centros de radicales monovalentes derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno de los mismos o dos átomos de carbono diferentes de un alcano original. Los alquenos típicos incluyen, pero sin limitación, metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno, decaleno, 1,4-ciclohexileno y similares. Los grupos alqueno, ya sea 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

5 sin limitación, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueniilo C₂-C₈), -O-(alquiniilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)O', -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, donde cada R' se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, alqueniilo -C₂-C₈, alquiniilo-C₂-C₈, o -arilo y en el que dicho -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueniilo C₂-C₈), -O-(alquiniilo C₂-C₈), -arilo, -alquilo C₁-C₈, alqueniilo -C₂-C₈ y grupos alquiniilo -C₂-C₈ pueden estar opcionalmente sustituidos adicionalmente con uno o más sustituyentes que incluyen, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, alqueniilo C₂-C₈, alquiniilo C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueniilo C₂-C₈), -O-(alquiniilo 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, donde cada R" se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, alqueniilo-C₂-C₈, -alquiniilo C₂-C₈, o -arilo.

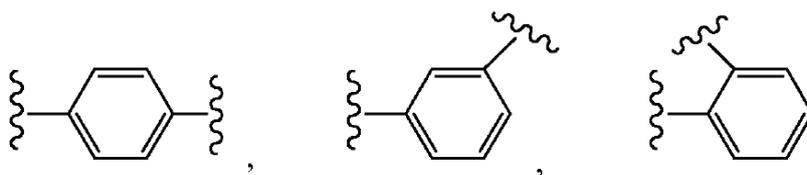
10 A menos que se indique lo contrario, el término "alqueniilo" se refiere a un grupo alqueniilo opcionalmente sustituido que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alqueniilo incluyen, por ejemplo, etenileno (-CH=CH-) y propenileno (-CH=CHCH₂-).

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

20 A menos que se 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 sub-combinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en él) derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillo aromático parental. Algunos grupos arilo están representados en las estructuras ejemplares como "Ar". Los grupos arilo típicos incluyen, pero sin limitación, radicales derivados de benceno, benceno sustituido, fenilo, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares.

25 Un grupo arilo, ya sea solo o como parte de otro grupo, puede estar opcionalmente sustituido con uno o más, preferiblemente de 1 a 5, o incluso de 1 a 2 grupos que incluyen, pero sin limitación, -halógeno, alquilo C₁-C₈, -alqueniilo C₂-C₈, alquiniilo C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueniilo C₂-C₈), -O-(alquiniilo 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, donde cada R' se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, alqueniilo-C₂-C₈, alquiniilo-C₂-C₈, o -arilo y en donde dicho alquilo C₁-C₈, alqueniilo-C₂-C₈, alquiniilo C₂-C₈, O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueniilo C₂-C₈), -O-(alquiniilo C₂-C₈) y -arilo pueden estar opcionalmente sustituidos adicionalmente con uno o más sustituyentes que incluyen, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, alqueniilo -C₂-C₈, alquiniilo-C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueniilo C₂-C₈), -O-(alquiniilo 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, donde cada R" se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, alqueniilo-C₂-C₈, alquiniilo C₂-C₈, o -arilo.

35 A menos que se indique lo contrario, el término "arileno" se refiere a un grupo arilo opcionalmente sustituido que es divalente (es decir, derivado por la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un sistema de anillo aromático original) y puede estar en el configuraciones orto, meta o para como se muestra en las siguientes estructuras con fenilo como el grupo arilo ejemplar.



40 Los grupos "-(alqueniilo C₁-C₈)arilo", "-(alqueniilo C₂-C₈)arilo" y "-(alquiniilo C₂-C₈)arilo" típicos incluyen, pero sin limitación, bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftilmetil-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-ilo y similares.

45 A menos que se indique lo contrario, el término "heterociclo" se refiere a un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o policíclico que tiene de 3 a 14 átomos en el anillo (también denominados miembros del anillo) donde al menos un átomo del anillo en al menos un anillo es un heteroátomo seleccionado entre N, O, P o S (y todas las combinaciones y sub-combinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono y heteroátomos en él). El heterociclo puede tener de 1 a 4 heteroátomos en el anillo seleccionados independientemente de N, O, P o S. Uno o más átomos de N, C o S en un heterociclo pueden oxidarse. Un heterociclo monocíclico preferiblemente tiene de 3 a 7 miembros de 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 de anillo (por ejemplo, de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados independientemente entre 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 dé como resultado una estructura estable.

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

5 Los ejemplos de grupos "heterociclo" incluyen a modo de ejemplo y sin limitación piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, bis-tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, bis-tetrahidropiranilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, octahidroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tiantrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizínilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, 4H-carbazolilo, carbazolilo, β -carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, bencisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolínulo e isatinoilo. Los grupos "heterociclo" preferidos incluyen, pero sin limitación, benzofuranilo, benzotiofenilo, indolilo, benzopirazolilo, cumarinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo.

20 Un grupo heterociclo, ya sea 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 sin limitación, -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, donde cada R' se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, o -arilo y en el que dicho -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -alquilo C₁-C₈, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈ y grupos -arilo pueden estar adicionalmente opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes que incluyen, pero no limitado 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, donde cada R" se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈ o arilo.

A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos unidos a carbono se pueden unir en las siguientes posiciones: posición 2, 3, 4, 5 ó 6 de una piridina; posición 3, 4, 5 ó 6 de una piridazina; posición 2, 4, 5 ó 6 de una pirimidina; posición 2, 3, 5 ó 6 de una pirazina; posición 2, 3, 4 ó 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol; posición 2, 4 ó 5 de un oxazol, imidazol o tiazol; posición 3, 4 ó 5 de un isoxazol, pirazol o isotiazol; posición 2 ó 3 de una aziridina; posición 2, 3 ó 4 de una azetidina; posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una quinolina; o posición 1, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una isoquinolina. Aún más típicamente, 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.

40 A modo de ejemplo y sin limitación, los heterociclos unidos por nitrógeno se pueden unir 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; posición 2 de un isoindol, o isoindolina; posición 4 de una morfolina; y la posición 9 de un carbazol, o β -carbolina. Aún más típicamente, los heterociclos unidos por nitrógeno incluyen 1-aziridilo, 1-azetidilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo y 1-piperidinilo.

A menos que se 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 en el anillo (y todas las combinaciones y sub-combinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en él) en donde todos los átomos del anillo son átomos de carbono. Los carbociclos monocíclicos tienen preferiblemente de 3 a 6 átomos en el anillo, aún más preferiblemente 5 ó 6 átomos en el anillo. Los carbociclos bicíclicos preferiblemente tienen de 7 a 12 átomos en el anillo, por ejemplo, dispuestos como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], o 9 ó 10 átomos en el anillo dispuestos como un sistema 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 carbohidratos preferiblemente tienen de 3 a 8 átomos de carbono en el anillo.

55 Los grupos carbocíclicos, ya sea solos o como parte de otro grupo, pueden ser opcionalmente sustituidos con, por ejemplo, uno o más grupos, preferiblemente 1 ó 2 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado de halógeno), que incluyen, pero sin limitación, -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, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, donde cada R' se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, o -arilo y en el que dicho -alquilo C₁-C₈, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), y los

5 grupos arilo pueden estar adicionalmente opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes que incluyen, pero sin limitación, 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, donde cada R" se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, alquenilo-C₂-C₈, alquinilo-C₂-C₈ o -arilo.

Los ejemplos de sustituyentes carbocíclicos 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.

10 Un "carbociclo", ya sea solo o como parte de otro grupo, se refiere a un grupo carbociclo opcionalmente sustituido como se definió anteriormente que es divalente (es decir, derivado por la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un sistema de anillo carbocíclico parenteral).

15 A menos que se indique lo contrario por contexto, un guión (-) designa el punto de unión a la molécula colgante. Por consiguiente, el término "-(alquileo C₁-C₈)arilo" o "alquileo C₁-C₈(arilo)" se refiere a un radical alquileo C₁-C₈ como se define en la presente, en donde el radical alquileo está unido a la molécula colgante en cualquiera de los átomos de carbono del radical alquileo y uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono del radical alquileo se reemplazan con un radical arilo como se define en este documento.

20 Cuando un grupo particular 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. El grupo puede, sin embargo, generalmente tener cualquier número de sustituyentes seleccionados de halógeno. Los grupos que están sustituidos están así indicados.

25 Se pretende que la definición de cualquier sustituyente o variable en una ubicación particular en una molécula sea independiente de sus definiciones en otra parte de esa molécula. Se entiende que los sustituyentes y los patrones de sustitución en los compuestos de esta invención pueden seleccionarse por un experto en la materia para proporcionar compuestos que sean químicamente estables y que se puedan sintetizar fácilmente mediante técnicas conocidas en la técnica, así como los métodos establecidos adelante en este documento.

30 Los grupos protectores, como se usan en la presente memoria, se refieren a grupos que bloquean selectivamente, temporal o permanentemente, un sitio reactivo en un compuesto multifuncional. Los grupos protectores de hidroxil adecuados para usar en la presente invención son farmacéuticamente aceptables y pueden o no necesitar ser escindidos del compuesto original después de la administración a un sujeto para que el compuesto sea activo. La escisión se realiza a través de procesos metabólicos normales dentro del cuerpo. Los grupos protectores hidroxil son bien conocidos en la técnica, véase, Protective Groups in Organic Synthesis, de TW Greene y PGM Wuts (John Wiley & sons, 3ª Edición), incorporados en este documento como referencia en su totalidad y para todos los fines e incluyen, por ejemplo, éter (por ejemplo, éteres alquílicos y silléteres que incluyen, por ejemplo, dialquilsililéter, 35 trialquilsililéter, dialquialcoxilsililéter), éster, carbonato, carbamato, sulfonato y grupos protectores de fosfato. Los ejemplos de grupos protectores de hidroxil incluyen, pero sin limitación, éter de metilo; metoximetil-éter, metiltiometil-éter, (fenildimetilsilil) metoximetil-éter, benciloximetil-éter, p-metoxibenciloximetil-éter, p-nitrobenciloximetil-éter, o-nitrobenciloximetil-éter, (4-metoxifenoxi) metil-éter, guayacolmetil-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, tetrahidropirani-éter, 1-metoxiciclohexil-éter, 4-metoxitetrahidropirani-éter, 4-metoxitetrahidropirani éter S,S-Dióxido, 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; éteres etílicos sustituidos tales como éter 1-etoxietilo, 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-éteres, p-clorofenil-éter, p-metoxifenil-éter, bencil-éter, p-metoxibencil-éter, 3,4-dimetoxibencil-éter, trimetilsilil-éter, trietilsilil-éter, tripropilsililéter, dimetil-isopropilsilil-éter, dietilisopropilsilil-éter, dimetilhexilsilil-éter, t-butildimetilsilil-éter, difenilmetsililil-éter, éster de benzoilformiato, éster de acetato, éster de cloroacetato, éster de dicloroacetato, éster de tricloroacetato, éster de trifluoroacetato, éster de metoxiacetato, éster de trifenilmetoxietacetato, éster de fenilacetato, éster de benzoato, carbonato de metilo y alquilo, 9-fluorenilmetilcarbonato de alquilo, carbonato de etilo y alquilo, carbonato de alquil 2,2,2-tricloroetilo, carbonato de 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetilo, alquilsulfonato, metanosulfonato, bencilsulfonato, tosionato, acetal de metileno, acetal de etilideno y acetal de t-butilmetilideno. Los grupos protectores preferidos están representados por las fórmulas - R^a, -Si(R^a)(R^a)(R^a), -C(O)R^a, -C(O)OR^a, -C(O)NH(R^a), -S(O)₂R^a, -S(O)₂OH, P(O)(OH)₂ y -P(O)(OH)OR^a, en donde R^a es alquilo C₁-C₂₀, alquenilo C₂-C₂₀, alquinilo C₂-C₂₀, alquileo C₁-C₂₀ (carbociclo), alquenileno -C₂-C₂₀ (carbociclo), alquinileno -C₂-C₂₀ (carbociclo), arilo -C₆-C₁₀, alquileo C₁-C₂₀ (arilo), alquenileno -C₂-C₂₀ (arilo), alquinileno -C₂-C₂₀ (arilo), alquileo -C₁-C₂₀ (heterociclo), -alquenileno -C₂-C₂₀ (heterociclo), o alquinileno -C₂-C₂₀ (heterociclo) donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileo, alquenileno, alquinilino, arilo, carbociclo y heterociclo, ya sean solos o como parte de otro grupo, están 60 opcionalmente sustituidos.

"Alterar el patrón de glicosilación nativo" pretende significar eliminar uno o más restos de carbohidrato encontrados en la secuencia nativa 191P4D12 (eliminando el sitio de glucosilación subyacente o eliminando la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa 191P4D12. Además, la frase incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, que implican un cambio en la naturaleza y las proporciones de los diversos restos de carbohidratos presentes.

El término "análogo" se refiere a una molécula que es estructuralmente similar o comparte atributos similares o correspondientes con otra molécula (por ejemplo, una proteína relacionada con 191P4D12). Por ejemplo, un análogo de una proteína 191P4D12 puede unirse específicamente por un anticuerpo o célula T que se une específicamente a 191P4D12.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio a menos que se indique claramente lo contrario. Por lo tanto, un "anticuerpo" puede ser de origen natural o artificial, tal como anticuerpos monoclonales producidos por tecnología de hibridoma convencional. Los anticuerpos 191P4D12 comprenden anticuerpos monoclonales y policlonales, así como fragmentos que contienen el dominio de unión a antígeno y/o una o más regiones determinantes de complementariedad de estos anticuerpos. Como se usa en este documento, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que se una específicamente a 191P4D12 y/o muestre la actividad biológica deseada y específicamente cubra anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multi-específicos (p. ej. , anticuerpos bi-específicos) y fragmentos de anticuerpos siempre que se unan específicamente a 191P4D12 y/o exhiban la actividad biológica deseada. Se puede usar cualquier anticuerpo específico en los métodos y composiciones proporcionados en este documento. Así, en una realización, el término "anticuerpo" abarca una molécula que comprende al menos una región variable de una molécula de inmunoglobulina de cadena ligera 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 cultivo celular, en fagos o en diversos animales, que incluyen, pero sin limitación, vacas, conejos, cabras, ratones, ratas, hámsters, conejillos de Indias, ovejas, perros, gatos, monos, chimpancés y simios. Por lo tanto, en una realización, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de mamífero. Las técnicas de fagos pueden usarse para aislar un anticuerpo inicial o para generar variantes con características de especificidad o avidéz alteradas. Tales técnicas son rutinarias y bien conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo se produce por medios recombinantes conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede producir un anticuerpo recombinante transfecando una célula huésped con un vector que comprenda una secuencia de ADN que codifica el anticuerpo. Se pueden usar uno o más vectores para transfectar la secuencia de ADN que expresa al menos una región VL y una VH en la célula huésped.

Las descripciones a modo de ejemplo de los medios recombinantes de generación y 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); and 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 en la mediación de la función deseada. Por lo tanto, está dentro del alcance de la invención que los anticuerpos puedan modificarse mediante sustituciones usando medios recombinantes. Típicamente, las sustituciones serán sustituciones conservadoras. Por ejemplo, al menos un aminoácido en la región constante del anticuerpo puede reemplazarse por un residuo diferente. Ver, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N° 5.624.821, la patente de EE.UU. N° 6.194.551, Solicitud N° WO 9958572; y Angal, et al., Mol. Immunol. 30: 105-08 (1993). La modificación en aminoácidos incluye delecciones, adiciones y sustituciones de aminoácidos. En algunos casos, dichos cambios se realizan para reducir las actividades no deseadas, por ejemplo, la citotoxicidad dependiente del complemento. Con frecuencia, los anticuerpos se marcan uniendo, ya sea de forma covalente o no covalente, una sustancia que proporciona una señal detectable. Se conoce una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación, y se muestran ampliamente en la literatura científica y de patentes. Estos anticuerpos se pueden cribar para unirse a 191P4D12 normal o defectuoso. Ver, por ejemplo, Antibody Engineering: A Practical Approach (Oxford University Press, 1996). Los anticuerpos adecuados con las actividades biológicas deseadas se pueden identificar mediante los siguientes ensayos in vitro que incluyen, entre otros: proliferación, migración, adhesión, crecimiento de agar blando, angiogénesis, comunicación célula-célula, apoptosis, transporte, transducción de señales y lo siguiente ensayos in vivo tales como la inhibición del crecimiento tumoral. Los anticuerpos proporcionados en este documento también pueden ser útiles en aplicaciones de diagnóstico. Como anticuerpos de captura o no neutralizantes, pueden cribarse la capacidad de unirse al antígeno específico sin inhibir la unión del receptor o la actividad biológica del antígeno. Como anticuerpos neutralizantes, los anticuerpos pueden ser útiles en ensayos de unión competitiva. También se pueden usar para cuantificar el 191P4D12 o su receptor.

La expresión "porción de unión a antígeno" o "fragmento de anticuerpo" de un anticuerpo (o simplemente "parte de anticuerpo"), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo 191P4D12 que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, 191P4D12 y variantes; Figura 1). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión "porción de

unión a 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 por un puente disulfuro en la región 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 dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permita formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); 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 incluirse dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se criban para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Como se usa en este documento, cualquier forma del "antígeno" puede usarse para generar un anticuerpo que sea específico para 191P4D12. Por lo tanto, el antígeno desencadenante puede ser un único epítipo, múltiples epítopos o la proteína completa sola o en combinación con uno o más agentes potenciadores de la inmunogenicidad conocidos en la técnica. El antígeno desencadenante puede ser una proteína aislada de longitud completa, una proteína de superficie celular (por ejemplo, inmunizando con células transfectadas con al menos una porción del antígeno), o una proteína soluble (por ejemplo, inmunizando únicamente con la porción de dominio extracelular de la proteína). El antígeno puede producirse en una célula genéticamente modificada. El ADN que codifica el antígeno puede ser genómico o no genómico (por ejemplo, ADNc) y codifica al menos una porción del dominio extracelular. Como se usa en este documento, el término "porción" se refiere al número mínimo de aminoácidos o ácidos nucleicos, según sea apropiado, que constituyen un epítipo inmunogénico del antígeno de interés. Se pueden emplear cualesquiera vectores genéticos adecuados para la transformación de las células de interés, que incluyen, pero sin limitación, vectores adenovíricos, plásmidos y vectores no virales, tales como lípidos catiónicos. En una realización, el anticuerpo de los métodos y composiciones de la presente memoria se unen específicamente al menos a una porción del dominio extracelular del 191P4D12 de interés.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente pueden conjugarse con un "agente bioactivo". Como se usa en el presente documento, la expresión "agente bioactivo" se refiere a cualquier compuesto sintético o de origen natural que se una al antígeno y/o potencie o medie un efecto biológico deseado para mejorar las toxinas que destruyen las células. En una realización, los fragmentos de unión útiles en la presente invención son fragmentos biológicamente activos. Como se usa en este documento, la expresión "biológicamente activo" se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse al epítipo antigénico deseado y ejercer directa o indirectamente un efecto biológico. Los efectos directos incluyen, pero sin limitación, la modulación, estimulación y/o inhibición de una señal de crecimiento, la modulación, estimulación y/o inhibición de una señal antiapoptótica, la modulación, estimulación y/o inhibición de una señal apoptótica o necrótica, modulación, estimulación y/o inhibición de la cascada de ADCC, y modulación, estimulación y/o inhibición de la cascada de CDC.

Los anticuerpos "bi-específicos" también son útiles en los presentes métodos y composiciones. Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo bi-específico" se refiere a un anticuerpo, típicamente un anticuerpo monoclonal, que tiene especificidades de unión para al menos dos epítopos antigénicos diferentes. En una realización, los epítopos son del mismo antígeno. En otra realización, los epítopos son de dos antígenos diferentes. Los métodos para producir anticuerpos bi-específicos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos bi-específicos pueden producirse de forma recombinante usando la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Milstein et al., Nature 305: 537 - 39 (1983). Alternativamente, los anticuerpos bi-específicos pueden prepararse usando un enlace químico. Véase, por ejemplo, Brennan, et al., Science 229: 81 (1985). Los anticuerpos bi-específicos incluyen fragmentos de anticuerpos bi-específicos. Ver, por ejemplo, Hollinger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6444 - 48 (1993), Gruber, et al., J. Immunol. 152:5368 (1994).

Los anticuerpos monoclonales descritos en este documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es o son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie particular o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos particular, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que se unan específicamente al antígeno diana y/o exhiban la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos Núm. 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 en la inhibición del crecimiento tumoral. Los ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes; por ejemplo, mostazas nitrogenadas, compuestos de etilenimina y alquilsulfonatos; antimetabolitos, por ejemplo, antagonistas de ácido fólico, purina o pirimidina; inhibidores mitóticos, por ejemplo, agentes anti-tubulina tales como alcaloides de vinca, auristatins y derivados de podofilotoxina; antibióticos citotóxicos; compuestos que

dañan o interfieren con la expresión o replicación del ADN, por ejemplo, aglutinantes del surco de menor importancia para el ADN; y antagonistas del receptor del factor de crecimiento. Además, los agentes quimioterapéuticos incluyen agentes citotóxicos (como se definen en la presente memoria), anticuerpos, moléculas biológicas y moléculas pequeñas.

- 5 El término "compuesto" se refiere y abarca el compuesto químico en sí mismo, así como, el explícitamente establecido o no, y a menos que el contexto aclare que deben excluirse los siguientes: formas amorfas y cristalinas del compuesto, incluyendo formas polimórficas, donde estas formas pueden ser parte de una mezcla o estar en aislamiento; formas de ácido libre y base libre del compuesto, que son típicamente las formas mostradas en las estructuras proporcionadas en este documento; isómeros del compuesto, los cuales se refieren a los isómeros ópticos, e isómeros tautoméricos, donde 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, incluidas las mezclas racémicas y no racémicas; donde un isómero puede estar en forma aislada o en una mezcla con uno o más isómeros diferentes; isótopos del compuesto, que incluyen compuestos que contienen deuterio y tritio, e incluyen compuestos que contienen radioisótopos, que incluyen radioisótopos efectivos terapéutica y diagnósticamente; formas multiméricas del compuesto, que incluyen formas dimericas, triméricas, etc.; sales del compuesto, preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables, que incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases, incluyendo sales que tienen contraiones orgánicos y contraiones inorgánicos, y que incluyen formas zwitteriónicas, donde si un compuesto está asociado con dos o más contraiones, los dos o más contraiones pueden ser los mismos o diferentes; y solvatos del compuesto, que incluyen hemisolvatos, monosolvatos, disolvatos, etc., que incluyen solvatos orgánicos y solvatos inorgánicos, incluyendo dichos solvatos inorgánicos hidratos; donde si un compuesto está asociado con dos o más moléculas de disolvente, las dos o más moléculas de disolvente pueden ser iguales o diferentes. En algunos casos, la referencia hecha en este documento a un compuesto de la invención incluirá una referencia explícita a una de las formas anteriores, por ejemplo, sales y/o solvatos; sin embargo, esta referencia es solo para énfasis, y no debe interpretarse como que excluye otras de las formas anteriores como se identificó anteriormente.

- Como se usa en el presente documento, la expresión "sustitución conservativa" se refiere a las sustituciones de aminoácidos que son conocidas por los expertos en esta técnica y pueden realizarse generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en esta técnica reconocen que, en general, las sustituciones de un único aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson, et al., MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4ª Edición 1987)). Dichas sustituciones a modo de ejemplo se realizan preferiblemente de acuerdo con los expuestos en la Tabla II y la(s) Tabla(s) III(a-b). Por ejemplo, tales cambios incluyen sustituir cualquiera de isoleucina (I), valina (V) y leucina (L) por cualquier otro de estos aminoácidos hidrófobos; ácido aspártico (D) para el ácido glutámico (E) y viceversa; glutamina (Q) para asparagina (N) y viceversa; y serina (S) para treonina (T) y viceversa. Otras sustituciones también pueden considerarse conservadoras, dependiendo del entorno del aminoácido particular y su papel en la estructura tridimensional de la proteína. Por ejemplo, la glicina (G) y la alanina (A) con frecuencia pueden ser intercambiables, al igual que la alanina (A) y la valina (V). La metionina (M), que es relativamente hidrofóbica, puede intercambiarse frecuentemente con leucina e isoleucina, y algunas veces con valina. La lisina (K) y la arginina (R) son frecuentemente intercambiables en lugares en los que la característica significativa del residuo de aminoácido es su carga y los diferentes pK de estos dos residuos de aminoácidos no son significativos. Aún otros cambios pueden considerarse "conservadores" en entornos particulares (ver, p. ej. Tabla III(a) en este documento; páginas 13-15 "Biochemistry" 2ª ED. Lubert Stryer ed (Universidad de Stanford); Henikoff et al., PNAS 1992 Vol 89 10915-10919; Lei et al., J Biol Chem 1995, 19 de mayo; 270 (20): 11882 - 11886). Otras sustituciones también son permisibles y pueden determinarse empíricamente o de acuerdo con sustituciones conservadoras conocidas.

- La expresión "agente citotóxico" se refiere a una sustancia que inhibe o previene la actividad de expresión de las células, la función de las células y/o causa la destrucción de las 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, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos. Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, pero sin limitación, auristatinas (por ejemplo, auristatina E, auristatina F, MMAE y MMAF), auroomicinas, maitansinoides, ricina, cadena A de ricina, combrestatina, duocarmicinas, dolastatinas, doxorubicina, daunorubicina, taxols, cisplatino, cc1065, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxiantracindiona, actinomicina, toxina diftérica, exotoxina de Pseudomonas (PE) A, PE40, abrina, cadena de abrina A, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, gelonina, mitogenina, reestructocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, caliqueamicina, inhibidor de Saponaria officinalis y glucocorticoides y otros agentes quimioterapéuticos, así como radioisótopos como At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹² o ²¹³, P³² e isótopos radiactivos de Lu que incluyen Lu¹⁷⁷. Los anticuerpos también pueden conjugarse con una enzima activadora anticancerosa pro-fármaco capaz de convertir el profármaco en su forma activa.

- Como se usa en este documento, el término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Al usar un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se

fuerzan a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión al antígeno. Los díacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, el documento EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 - 48 (1993).

5 El término "agotar", en el contexto del efecto de un agente de unión a 191P4D12 en células que expresan 191P4D12, se refiere a una reducción o eliminación del número de células que expresan 191P4D12.

10 La expresión "producto génico" se usa en el presente documento para indicar un péptido/proteína o ARNm. Por ejemplo, un "producto génico de la invención" a veces se denomina en este documento "secuencia de aminoácidos cancerígena", "proteína cancerosa", "proteína de un cáncer enumerado en la Tabla I", un "ARNm canceroso", "ARNm de un cáncer enumerado en la Tabla I", etc. En una realización, la proteína del cáncer está codificada por un ácido nucleico de la FIG. 1. La proteína del cáncer puede ser un fragmento, o alternativamente, ser la proteína de longitud completa codificada por los ácidos nucleicos de la FIG. 1. En una realización, se usa una secuencia de aminoácidos de cáncer para determinar la identidad o similitud de secuencia. En otra realización, las secuencias son variantes alélicas de origen natural de una proteína codificada por un ácido nucleico de la FIG. 1. En otra realización, las secuencias son variantes de secuencia como se describe adicionalmente en este documento.

15 Los anticuerpos "hetero-conjugados" son útiles en los presentes métodos y composiciones. Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo hetero-conjugado" se refiere a dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se pueden preparar usando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, que incluyen el uso de agentes de reticulación. Ver, por ejemplo, la patente de los EE.UU. No. 4.676.980.

20 El término "homólogo" se refiere a una molécula que exhibe homología con otra molécula, por ejemplo, que tiene secuencias de residuos químicos que son iguales o similares en las posiciones correspondientes.

25 En una realización, el anticuerpo proporcionado en este documento es un "anticuerpo humano". Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que esencialmente las secuencias completas de las secuencias de cadena ligera y cadena pesada, que incluyen las regiones determinantes complementarias (CDR), son de genes humanos. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se preparan mediante la técnica de trioma, la técnica de células B humanas (véase, por ejemplo, Kozbor, et al., Immunol. Today 4: 72 (1983), técnica de transformación de VEB (véase, por ejemplo, Cole et al., Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy 77-96 (1985)), o usando presentación de 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 tales anticuerpos de parcialmente a completamente humanos se conocen en la técnica y se puede usar cualquiera de tales técnicas. De acuerdo con una realización particularmente preferida, las secuencias de anticuerpo completamente humanas se preparan en un ratón transgénico diseñado por ingeniería genética para expresar genes de anticuerpos de cadena pesada y ligera humanos. Una descripción ejemplar de la preparación de ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos encontrados en la Solicitud N° WO 02/43478 y en la Patente de EE.UU. N° 6.657.103 (Abgenix) y su progenie. Las células B de ratones transgénicos que producen el anticuerpo deseado se pueden fusionar para formar líneas celulares de hibridoma para la producción continua del anticuerpo. Ver, por ejemplo, la patente de los EE.UU. Nos. 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).

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) así como anticuerpos humanos. Tales anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Véase, por ejemplo, Cabilly U.S. Pat. N° 4.816.567; Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 10029 - 10033; y Antibody Engineering: A Practical Approach (Oxford University Press 1996).

40 Los términos "inhibir" o "inhibición de", tal como se usan en el presente documento, significan reducir en una cantidad medible, o prevenir completamente.

45 Las frases "aislado" o "biológicamente puro" se refieren a un material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan al material tal como se encuentra en su estado nativo. Por lo tanto, los péptidos aislados de acuerdo con la invención preferiblemente no contienen materiales normalmente asociados con los péptidos en su entorno in situ. Por ejemplo, se dice que un polinucleótido está "aislado" cuando está sustancialmente separado de polinucleótidos contaminantes que corresponden o son complementarios a genes distintos de los genes 191P4D12 o que codifican polipéptidos distintos del producto del gen 191P4D12 o fragmentos del mismo. Cualquier experto en la materia puede emplear fácilmente procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos para obtener un polinucleótido de 191P4D12 aislado. Se dice que una proteína está "aislada", por ejemplo, cuando se emplean métodos físicos, mecánicos o químicos para eliminar las proteínas 191P4D12 de los

constituyentes celulares que normalmente están asociados con la proteína. Cualquier experto en la materia puede emplear fácilmente métodos de purificación convencionales para obtener una proteína 191P4D12 aislada. Alternativamente, una proteína aislada se puede preparar por medios químicos.

5 Los "marcadores" adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimio-luminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de tales marcadores incluyen las patentes de EE.UU. Nos. 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 este documento pueden ser útiles como el componente de unión a antígeno de fluoro-cuerpos. Ver, por ejemplo, Zeytun et al., Nat. Biotechnol. 21:1473-79 (2003).

10 El término "mamífero" se refiere a cualquier organismo clasificado como mamífero, que incluye ratones, ratas, conejos, perros, gatos, vacas, caballos y seres humanos. En una realización de la invención, el mamífero es un ratón. En otra realización de la invención, el mamífero es un ser humano.

15 Los términos "cáncer metastásico" y "enfermedad metastásica" se refieren a los cánceres que se han diseminado a los ganglios linfáticos regionales o a sitios distantes, y están destinados a incluir la enfermedad en estadio D bajo el sistema AUA y la etapa T × N × M + en el sistema TNM.

20 El término "modulador" o la expresión "compuesto de prueba" o "candidato a fármaco" o los equivalentes gramaticales que se usan en el presente documento describen cualquier molécula, por ejemplo, proteína, oligopéptido, molécula orgánica pequeña, polisacárido, polinucleótido, etc., que se probará según su capacidad de alterar directamente o indirectamente el fenotipo de cáncer o la expresión de una secuencia de cáncer, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico o proteína, o efectos de secuencias de cáncer (por ejemplo, señalización, expresión génica, interacción de proteínas, etc.). En un aspecto, un modulador neutralizará el efecto de una proteína de cáncer de la invención. Por "neutralizar" se entiende que se inhibe o bloquea una actividad de una proteína, junto con el efecto consiguiente sobre la célula. En otro aspecto, un modulador neutralizará el efecto de un gen, y su proteína correspondiente, de la invención normalizando los niveles de dicha proteína. En realizaciones preferidas, 25 los moduladores alteran los perfiles de expresión, o los ácidos nucleicos del perfil de expresión o las proteínas proporcionadas en este documento, o las rutas efectoras corriente abajo. En una realización, el modulador suprime un fenotipo del cáncer, p. ej., a una huella digital de tejido normal. En otra realización, un modulador indujo un fenotipo del cáncer. Generalmente, se ejecuta una pluralidad de mezclas de ensayo en paralelo con diferentes concentraciones de agente para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Típicamente, una de estas concentraciones sirve como un control negativo, es decir, a una concentración cero o por debajo del nivel de detección.

30 Los moduladores, los fármacos candidatos o los compuestos de ensayo abarcan numerosas clases químicas, aunque típicamente son moléculas orgánicas, preferiblemente pequeños compuestos orgánicos que tienen un peso molecular de más de 100 y menos de aproximadamente 2.500 Dalton. Las moléculas pequeñas preferidas son inferiores a 2000, o inferiores a 1500 o inferiores a 1000 o inferiores a 500 D. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente enlaces de hidrógeno, y típicamente 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 poli-aromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los moduladores también comprenden biomoléculas tales como péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos. Particularmente preferidos son los péptidos. Una clase de moduladores son los péptidos, por ejemplo, de aproximadamente cinco a aproximadamente 35 aminoácidos, prefiriéndose de aproximadamente cinco a aproximadamente 20 aminoácidos, y siendo particularmente preferido de aproximadamente 7 a aproximadamente 15. Preferiblemente, la proteína 35 moduladora del cáncer es soluble, incluye una región no transmembrana, y/o tiene una Cys N-terminal para ayudar en la solubilidad. En una realización, el extremo C del fragmento se mantiene como un ácido libre y el extremo N es una amina libre para ayudar en el acoplamiento, es decir, a la cisteína. En una realización, una proteína de cáncer de la invención se conjuga con un agente inmunogénico como se describe en el presente documento. En una realización, la proteína del cáncer se conjuga con BSA. Los péptidos de la invención, por ejemplo, de longitudes preferidas, se pueden unir entre sí o con otros aminoácidos para crear un péptido/proteína más largo. Los péptidos moduladores pueden ser digeridos de proteínas de origen natural como se describe anteriormente, péptidos aleatorios o péptidos aleatorios "sesgados". En una realización preferida, los moduladores basados en péptido/proteína son anticuerpos, y fragmentos de los mismos, como se definen en este documento.

40 La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único epítipo antigénico. Por el contrario, las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) incluyen típicamente una multitud de anticuerpos dirigidos contra (o específicos para) diferentes epítipos. En una realización, 45 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 epítipos antigénicos. El

modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar que requiera la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature 256: 495 (1975), o se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las 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 usualmente se unirán con al menos una Kd de aproximadamente 1 μ M, más habitualmente de al menos aproximadamente 300 nM, típicamente de al menos aproximadamente 30 nM, preferiblemente de al menos aproximadamente 10 nM, más preferiblemente de al menos aproximadamente 3 nM o mejor, generalmente determinado por ELISA.

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

"Farmacéuticamente aceptable" se refiere a una composición no tóxica, inerte y/o que es fisiológicamente compatible con humanos u otros mamíferos.

El término "polinucleótido" significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases o pares de bases de longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido, y está destinado a incluir formas de ADN y/o ARN de cadena simple o doble. En la técnica, este término se usa a menudo de forma intercambiable con "oligonucleótido". Un polinucleótido puede comprender una secuencia de nucleótidos descrita en la presente memoria en la que la timidina (T), como se muestra, por ejemplo, en la FIG. 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 la especificación, se usan designaciones estándar de tres letras o letras únicas para aminoácidos. En la técnica, este término se usa a menudo de forma intercambiable con "péptido" o "proteína".

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

Como se usa en el presente documento, la expresión "Fv monocatenario" o "scFv" o anticuerpo "monocatenario" se refiere a fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv, ver Pluckthun, The Pharmacology Of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

Como se usa en el presente documento, el término "específico", la expresión "se une específicamente" y la expresión "específicamente se une" se refieren a la unión selectiva del anticuerpo al epítipo del antígeno diana. Los anticuerpos pueden analizarse para determinar la especificidad de la unión comparando la unión al antígeno apropiado con la unión al antígeno irrelevante o a la mezcla de antígenos en un conjunto dado de condiciones. Si el anticuerpo se une al antígeno apropiado al menos 2, 5, 7, y preferiblemente 10 veces más que el antígeno irrelevante o la mezcla de antígenos, entonces se considera que es específico. En una realización, un anticuerpo específico es uno que solo se une al antígeno 191P4D12, pero que no se une al antígeno irrelevante. En otra realización, un anticuerpo específico es aquel que se une al antígeno 191P4D12 humano pero que no se une a un antígeno 191P4D12 no humano con 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor de homología de aminoácidos con el antígeno 191P4D12. En otra realización, un anticuerpo específico es uno que se une al antígeno 191P4D12 humano y se une al antígeno 191P4D12 murino, pero con un mayor grado de unión del antígeno humano. En otra realización, un anticuerpo específico es uno que se une al antígeno 191P4D12 humano y se une al antígeno 191P4D12 de los primates, pero con un mayor grado de unión del antígeno humano. En otra realización, el anticuerpo específico se une al antígeno 191P4D12 humano y a cualquier antígeno 191P4D12 no humano, pero con un mayor grado de unión del antígeno humano o cualquier combinación de los mismos.

Como se usa en este documento "tratar" o "terapéutico" y términos gramaticalmente relacionados, se refiere a cualquier mejora de cualquier consecuencia de la enfermedad, tal como supervivencia prolongada, menos morbilidad y/o una disminución de los efectos secundarios que son los subproductos de una modalidad alternativa terapéutica; como se aprecia fácilmente en la técnica, la erradicación completa de la enfermedad es una opción preferida pero no obligatoria para un acto de tratamiento.

El término "variante" se refiere a una molécula que exhibe una variación de un tipo o norma descrito, tal como una proteína que tiene uno o más residuos de aminoácidos diferentes en la(s) posición(es) correspondiente(s) de una proteína específicamente descrita (por ejemplo, la proteína 191P4D12 mostrada en la figura 1). Un análogo es un

ejemplo de una proteína variante. Las isoformas de empalme y corte y los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son otros ejemplos de variantes.

Las "proteínas 191P4D12" y/o las "proteínas relacionadas con 191P4D12" de la invención incluyen las específicamente identificadas en la presente (véase la figura 1), así como variantes alélicas, variantes de sustitución conservativa, análogos y homólogos que se pueden aislar/generar y caracterizar sin experimentación indebida siguiendo los métodos descritos en este documento o fácilmente disponibles en la técnica. También se incluyen proteínas de fusión que combinan partes de diferentes proteínas 191P4D12 o fragmentos de las mismas, así como proteínas de fusión de una proteína 191P4D12 y un polipéptido heterólogo. Tales proteínas 191P4D12 se denominan colectivamente proteínas relacionadas con 191P4D12, las proteínas de la invención, o 191P4D12. La expresión "proteína relacionada con 191P4D12" se refiere a un fragmento de polipéptido o una secuencia de proteína 191P4D12 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.

II.) Anticuerpos 191P4D12

Otro aspecto de la invención proporciona anticuerpos que se unen a proteínas relacionadas con 191P4D12 (véase la figura 1). En una realización, el anticuerpo que se une a las proteínas relacionadas con 191P4D12 es un anticuerpo que se une específicamente a la proteína 191P4D12 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. El anticuerpo que se une específicamente a la proteína 191P4D12 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 incluye anticuerpos que pueden unirse a otras proteínas relacionadas con 191P4D12. Por ejemplo, los anticuerpos que se unen a la proteína 191P4D12 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2 pueden unirse a proteínas relacionadas con 191P4D12 tales como las variantes de 191P4D12 y los homólogos o análogos de las mismas.

Los anticuerpos 191P4D12 de la invención son particularmente útiles en ensayos de pronóstico de cáncer (véase, por ejemplo, Tabla I), imágenes y metodologías terapéuticas. De forma similar, dichos anticuerpos son útiles en el tratamiento y/o pronóstico del cáncer de colon y otros, en la medida en que 191P4D12 también se expresa o se sobreexpresa en estos otros cánceres. Además, los anticuerpos expresados intracelularmente (por ejemplo, anticuerpos monocatenarios) son terapéuticamente útiles en el tratamiento de cánceres en los que está implicada la expresión de 191P4D12, tales como cánceres de colon avanzados o metastásicos u otros cánceres avanzados o metastásicos.

Diversos métodos para la preparación de anticuerpos, específicamente anticuerpos monoclonales, son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden preparar inmunizando un huésped mamífero adecuado usando una proteína, péptido o fragmento relacionado con 191P4D12, 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 se pueden usar proteínas de fusión de 191P4D12, tales como una proteína de fusión GST 191P4D12. En una realización particular, una proteína de fusión de GST que comprende la totalidad o la mayoría de la secuencia de aminoácidos de la FIG. 1 se produce y luego se usa como un inmunógeno para generar anticuerpos apropiados. En otra realización, se sintetiza una proteína relacionada con 191P4D12 y se usa como un inmunógeno.

Además, se usan técnicas de inmunización con ADN desnudo conocidas en la técnica (con o sin proteína 191P4D12 purificada o células que expresan 191P4D12) para generar una respuesta inmune al inmunógeno codificado (para una revisión, véase Donnelly et al., 1997, Ann. Rev. Immunol. 15: 617-648).

La secuencia de aminoácidos de una proteína 191P4D12 como se muestra en la FIG. 1 puede analizarse para seleccionar regiones específicas de la proteína 191P4D12 para generar anticuerpos. Por ejemplo, los análisis de hidrofobicidad e hidrofiliidad de una secuencia de aminoácidos de 191P4D12 se usan para identificar regiones hidrófilas en la estructura 191P4D12. Las regiones de una proteína 191P4D12 que muestran una estructura inmunogénica, así como otras regiones y dominios, pueden identificarse fácilmente usando otros diversos métodos conocidos en la técnica, tales como Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz o el análisis de Jameson-Wolf. Los perfiles de hidrofiliidad se pueden generar usando el método de Hopp, T. P. y Woods, K. R., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 3824-3828. Los perfiles de hidropática se pueden generar usando el método de Kyte, J. y Doolittle, R.F., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-132. El porcentaje (%) de perfiles de Residuos Accesibles se puede generar usando el método de Janin J., 1979, Nature 277: 491-492. Los perfiles de flexibilidad promedio se pueden generar usando el método de Bhaskaran R., Ponnuswamy P. K., 1988, Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255. Se pueden generar perfiles de viraje beta utilizando el método de Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1: 289-294. Por lo tanto, cada región identificada por cualquiera de estos programas o métodos está dentro del alcance de la presente invención. Los métodos preferidos para la generación de anticuerpos 191P4D12 se ilustran adicionalmente por medio de los ejemplos proporcionados en este documento. Los métodos para preparar una proteína o polipéptido para uso como un inmunógeno son bien conocidos en la técnica. También son bien conocidos en la técnica los métodos para preparar conjugados inmunogénicos de una proteína con un vehículo, tal como BSA, KLH u otra proteína transportadora. En algunas circunstancias, se usa la

conjugación directa usando, por ejemplo, reactivos de carbodiimida; en otros casos, los reactivos de enlace tales como los suministrados por Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., son efectivos. La administración de un inmunógeno de 191P4D12 a menudo se lleva a cabo mediante inyección durante un período de tiempo adecuado y con el uso de un adyuvante adecuado, como se entiende en la técnica. Durante el programa de inmunización, se pueden tomar títulos de anticuerpos para determinar la adecuación de la formación de anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales 191P4D12 pueden producirse por diversos medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se preparan líneas celulares inmortalizadas que secretan un anticuerpo monoclonal deseado usando la tecnología de hibridoma estándar de Kohler y Milstein o modificaciones que inmortalizan células B productoras de anticuerpos, como se conoce en general. Las líneas celulares inmortalizadas que secretan los anticuerpos deseados se criban mediante inmunoensayo en el que el antígeno es una proteína relacionada con 191P4D12. Cuando se identifica el cultivo celular inmortalizado apropiado, las células se pueden expandir y los anticuerpos pueden producirse a partir de cultivos in vitro o de fluido de ascitis.

Los anticuerpos o fragmentos de la invención también se pueden producir por medios recombinantes. Las regiones que se unen específicamente a las regiones deseadas de una proteína 191P4D12 también se pueden producir en el contexto de anticuerpos injertados de la región determinante de la complementariedad (CDR) o quiméricos con origen en múltiples especies. También se pueden producir anticuerpos humanizados o humanos de 191P4D12, y se prefieren para su uso en contextos terapéuticos. Los métodos para humanizar anticuerpos murinos y otros anticuerpos no humanos, sustituyendo una o más de las CDR de anticuerpos no humanos por secuencias de anticuerpos humanos correspondientes, son bien conocidos (véase, por ejemplo, Jones et al., 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323 - 327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239: 1534 - 1536). Ver también, Carter et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 y Sims et al., 1993, J. Immunol. 151: 2296.

En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención comprenden anticuerpos 191P4D12 completamente humanos (MAb 191P4D12). Diversos métodos en la técnica proporcionan medios para producir MAb 191P4D12 completamente humanos. Por ejemplo, una realización preferida proporciona técnicas que usan ratones transgénicos, inactivados para la producción de anticuerpos, modificados genéticamente con loci de cadenas pesadas y ligeras humanas denominadas Xenomouse (Amgen Fremont, Inc.). Una descripción ejemplar de la preparación de ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos se puede encontrar en la patente de EE.UU. No. 6.657.103. Ver, también, las patentes de los EE. UU. Nos. 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; y 5.545.806; y Mendez, et. al. Nature Genetics, 15: 146 - 156 (1998); Kellerman, S. A. y Green, L. L., Curr. Opin. Biotechnol 13, 593 - 597 (2002).

Además, los anticuerpos humanos de la invención se pueden generar usando el ratón HuMAb (Medarex, Inc.) que contiene miniloci del gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina pesadas (mu y gamma) humanas no reordenadas y ligeras kappa, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de la cadena mu y kappa endógenos (véase, por ejemplo, Lonberg, et al. (1994) Nature 368 (6474): 856 - 859).

En otra realización, se pueden generar anticuerpos completamente humanos de la invención usando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tales como un ratón que porta un transgén de cadena pesada humano y un transcromosoma de cadena ligera humana. Dichos ratones, denominados en la presente memoria "ratones KM", se describen en Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727 y la publicación PCT WO 02/43478 de Tomizuka, et al.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se pueden preparar usando métodos de presentación en fagos para explorar bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Dichos métodos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos se establecen en la técnica. Ver, por ejemplo: Pat. de EE. UU. Nos. 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner et al.; Pat. de EE. UU. Nos. 5.427.908 y 5.580.717 de Dower et al.; Pat. de EE. UU. Nos. 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty et al.; y la patente de los EE. UU. Nos. 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths et al.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se pueden preparar usando ratones SCID en los que las células inmunes humanas se han reconstituido de manera que se puede generar una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Dichos ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nos. 5.476.996 y 5.698.767 de Wilson et al.

En una realización preferida, los MABs de 191P4D12 de la invención comprenden regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo designado Ha22-2(2,4)6.1 producido por un hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) N° de Acceso: PTA -11267 (véase, figura 3), o regiones variables pesadas y ligeras que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera de Ha22-2(2,4)6.1, y en las que los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los MAB 191P4D12 de la invención. La región variable de la cadena pesada de Ha22-2(2,4)6.1 consiste en la secuencia de aminoácidos que varía desde el 20° residuo E hasta el 136° residuo de la SEQ ID N°: 7, y la región variable de la cadena ligera de Ha22-2(2,4)6.1 consiste en la secuencia de aminoácidos que varía desde el 23° residuo D hasta el 130° residuo R de la SEQ ID N°: 8. Como la región constante del anticuerpo de la invención, se puede elegir cualquier subclase de región constante. En una realización, se puede

usar la región constante de IgG1 humana como la región constante de la cadena pesada y la región constante Ig kappa humana como la región constante de la cadena ligera.

Por ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde:

5 (a) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% homóloga a la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada expuesta en la FIG. 3; y

(b) la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% homóloga a la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera expuesta en la FIG. 3.

10 En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos V_H y/o V_L pueden ser un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homólogas con las secuencias V_H y V_L expuestas en la FIG. 3.

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada humanizada y una región variable de cadena ligera humanizada, en donde:

15 (a) la región variable de la cadena pesada comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que tienen las secuencias de aminoácidos de las CDR de la región variable de la cadena pesada expuestas en la FIG. 3;

(b) la región variable de la cadena ligera comprende las CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de las CDR de la región variable de la cadena ligera expuestas en la FIG. 3.

20 Los anticuerpos modificados genéticamente de la invención incluyen aquellos en los que se han realizado modificaciones a restos de marco dentro de V_H y/o V_L (por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo). Típicamente, tales modificaciones de estructura se realizan para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es "revertir" uno o más residuos del marco a la secuencia correspondiente de la línea germinal. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido una mutación somática puede contener residuos de estructura que difieren de la secuencia de la línea germinal a partir de la cual se deriva el anticuerpo. Dichos residuos pueden identificarse comparando las secuencias de marco de anticuerpo con las secuencias de la línea germinal a partir de las cuales se deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región estructural a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden "retromutarse" a la secuencia de la línea germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR (por ejemplo, "retromutado" de leucina a metionina). También se pretende abarcar tales anticuerpos "retromutados" por la invención.

30 Otro tipo de modificación de marco implica la mutación de uno o más residuos dentro de la región marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar epítomos de células T y reducir así la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también se denomina "desinmunización" y se describe con más detalle en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2003/0153043 de Carr et al.

35 Además, o alternativo a las modificaciones realizadas dentro de las regiones marco o CDR, los anticuerpos de la invención pueden diseñarse para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como semivida en suero, fijación del complemento, unión al receptor de Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un MAb 191P4D12 de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, uno o más restos químicos se pueden unir al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del MAb. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación.

40 En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de manera que el número de residuos de cisteína en la región bisagra se altera, por ejemplo, aumenta o disminuye. Este enfoque se describe adicionalmente en la patente de EE.UU. N° 5.677.425 de Bodmer et al. El número de restos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada o aumentar o disminuir la estabilidad del MAb 191P4D12.

45 En otra realización, la región de bisagra Fc de un anticuerpo está mutada para disminuir la semivida biológica del MAb 191P4D12. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento de bisagra de Fc de manera que el anticuerpo tiene un enlace de proteína A estafilocócico (SpA) deteriorado con respecto a la unión de SpA del dominio de bisagra nativo. Este enfoque se describe con más detalle en la patente de EE.UU. N° 6.165.745 por Ward et al.

50 En otra realización, el MAb 191P4D12 se modifica para aumentar su semivida biológica. Varios enfoques son posibles. Por ejemplo, las mutaciones se pueden introducir como se describe en la patente de EE.UU. No. 6.277.375 a Ward. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o CL para contener un epítomo de unión al receptor natural tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de EE.UU. Nos. 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al.

En otras realizaciones más, la región Fc se altera reemplazando al menos un resto de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar la función o funciones efectoras del MAb 191P4D12. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de residuos aminoácidos específicos pueden reemplazarse con un resto de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector, pero retenga la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector al que se modifica la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 de complemento. Este enfoque se describe con más detalle en las patentes de EE.UU. Nos. 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter et al.

La reactividad de los anticuerpos 191P4D12 con una proteína relacionada con 191P4D12 puede establecerse mediante varios medios bien conocidos, que incluyen análisis de transferencia Western, inmunoprecipitación, ELISA y FACS usando, según sea apropiado, proteínas relacionadas con 191P4D12, células que expresan 191P4D12 o extractos de las mismas. Un anticuerpo 191P4D12 o un fragmento del mismo puede marcarse con un marcador detectable o conjugarse con una segunda molécula. Los marcadores detectables adecuados incluyen, pero sin limitación, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelante de metales o una enzima. Además, se generan anticuerpos bi-específicos específicos para dos o más epítopos de 191P4D12 usando métodos generalmente conocidos en la técnica. Los anticuerpos homodiméricos también se pueden generar mediante técnicas de entrecruzamiento conocidas en la técnica (por ejemplo, Wolff et al., *Cancer Res.* 53: 2560-2565).

En aún otra realización preferida, el MAb 191P4D12 de la invención es un anticuerpo que comprende una cadena pesada y ligera de un anticuerpo designado como Ha22-2(2,4)6.1. La cadena pesada de Ha22-2(2,4)6.1 consiste en la secuencia de aminoácidos que varía desde el 20° residuo E hasta el 466° residuo K de la SEQ ID NO: 7 y la cadena ligera de Ha22-2(2,4)6.1 consiste en una secuencia de aminoácidos que varía desde el 23° residuo D hasta el 236° residuo C de la secuencia SEQ ID NO: 8. La secuencia de los cuales se expone en la FIG. 2 y FIG. 3. En una realización preferida, Ha22-2(2,4)6.1 está conjugado con un agente citotóxico.

El hibridoma que produce el anticuerpo designado Ha22-2(2,4)6.1 se envió (a través de Federal Express) a la American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, Va. 20108 el 18 de agosto de 2010 y número de acceso asignado PTA-11267.

III.) Conjugados de anticuerpo y fármaco en general

En otro aspecto, la invención proporciona conjugados de anticuerpo-fármaco (CAFs), que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de bacterias, hongos, plantas o de origen animal, o fragmentos de los mismos) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado). En otro aspecto, la invención proporciona además métodos para usar los CAF. En un aspecto, un CAF comprende cualquiera de los MAb 191P4D12 de la presente invención unidos covalentemente a un agente citotóxico o a un agente detectable.

El uso de conjugados anticuerpo-fármaco para el suministro local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, medicamentos para matar 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; Pat. U.S. N° 4.975.278) permite la administración dirigida del resto del fármaco a los tumores, y la acumulación intracelular en el mismo, donde la administración sistémica de estos fármacos sin conjugar puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para las células normales así como para las células tumorales que se buscan eliminar (Baldwin et al. al., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986): 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). Se busca la máxima eficacia con la toxicidad mínima. Se ha mostrado que tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183 - 87). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland et al., (1986) *supra*). Las toxinas usadas en conjugados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como la toxina diftérica, 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 hacer valer sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen la unión a tubulina, la unión al ADN o la inhibición de la topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos de receptores de proteínas.

Ejemplos de conjugados de fármacos con anticuerpos son ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) que es un conjugado anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido contra el antígeno CD20 encontrado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y radioisótopos ¹¹¹In o ⁹⁰Y unidos por un ligante-quelante 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, el MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo y fármaco compuesto de un anticuerpo hu CD33 unido a caliqueamicina, se aprobó en 2000 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda por inyección (Drugs of the Future (2000) 25 (7): 686; patentes de los EE. UU. Nos. 4.970.198; 5.079.233; 5.585.089; 5.606.040; 5.693.762; 5.739.116; 5.767.285; 5.773.001).

- 5 Además, el Cantuzumab mertansine (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo y fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 unido mediante el enlazante disulfuro SPP al resto del fármaco maitansinoide, DM1, avanza a ensayos de Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como de colon, pancreático, gástrico y otros.

- 10 Además, MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de fármaco y anticuerpo compuesto por el anticuerpo monoclonal anti-próstata específico de membrana (PSMA) vinculado al resto fármaco maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el tratamiento potencial de tumores de próstata.

- 15 Finalmente, los péptidos auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron con anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específicos para CD30 en neoplasias hematológicas) (Doronina et al. (2003) Nature Biotechnology 21 (7): 778-784) y se encuentran en desarrollo terapéutico.

- Además, los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de CAFs se describen en este documento. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen cadena de difteria A, fragmentos no enlazantes activos de toxina diftérica, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantininas, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcin, crotina, inhibidor de *sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogenina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 octubre de 1993. Una variedad de radionucleidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al. (1987) Science, 238: 1098. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilén triaminapentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo (documento WO94/11026).
- 20
- 25
- 30

- 35 Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, auristatinas, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan en este documento.

III (A). Maitansinoides

- Los compuestos de maitansina adecuados para usar como restos de fármaco maitansinoide son bien conocidos en la técnica, y se pueden aislarse de fuentes naturales de acuerdo con métodos conocidos, producidos usando técnicas de ingeniería genética (véase Yu et al (2002) PNAS 99: 7968-7973), o análogos de maitansinol y de maitansinol preparados sintéticamente de acuerdo con métodos conocidos.
- 40

- Los restos de fármaco maitansinoide ilustrativos incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado, tal como: C-19-declorado (Patente de Estados Unidos N° 4.256.746) (preparado por reducción con hidruro de litio y aluminio de ansamitocina P2); C-20-hidroxi (o C-20-desmetil) +/- C-19-declorado (patente de EE.UU. Números 4.361.650 y 4.307.016) (preparado por desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* o decloración usando LAH); y C-20-demetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/- decloro (Patente de Estados Unidos N° 4.294.757) (preparado por acilación usando cloruros de acilo), y los que tienen modificaciones en otras posiciones
- 45

- Los restos de fármaco de maitansinoide a modo de ejemplo también incluyen aquellos que tienen modificaciones tales como: C-9-SH (Patente de Estados Unidos N° 4.424.219) (preparada mediante la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅); C-14-alcoximetilo (demetoxi/CH₂OR) (Patente de Estados Unidos N° 4.331.598); C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH₂OH o CH₂OAc) (Patente de Estados Unidos N° 4.450.254) (preparado a partir de *Nocardia*); C-15-hidroxi/aciloxi (Patente de Estados Unidos N° 4.364.866) (preparada mediante la conversión de maitansinol por *Streptomyces*); C-15-metoxi (patente de Estados Unidos Nos. 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de *Trewia nudiflora*); C-18-N-desmetilo (patente de Estados Unidos Nos. 4.362.663 y 4.322.348) (preparado por la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y 4,5-desoxi (Patente de Estados Unidos N° 4.371.533) (preparada por la reducción de tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).
- 50
- 55

Los CAF que contienen maitansinoides, los métodos para prepararlos y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. Nos. 5.208.020; 5.416.064; 6.441.163 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1,

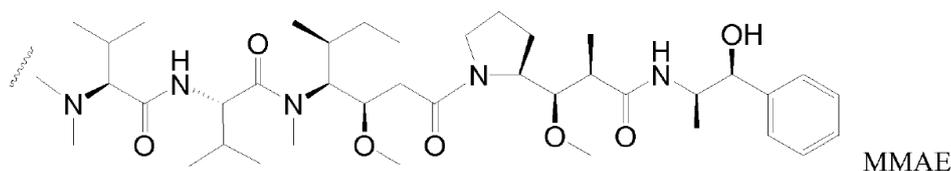
5 cuyas descripciones se incorporan expresamente en este documento por referencia. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) describió CAF que comprendían un maitansinoide designado como DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico para células de cáncer de colon cultivadas, y mostraba actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral in vivo. Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992) describen CAFs en los que se conjugó un maitansinoide a través de un enlazador disulfuro con el anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que une el oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se probó in vitro en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco alcanzó un grado de citotoxicidad similar al fármaco de maitansinoide libre, que podría incrementarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una baja citotoxicidad sistémica en ratones.

III (B). Auristatinas y Dolastatinas

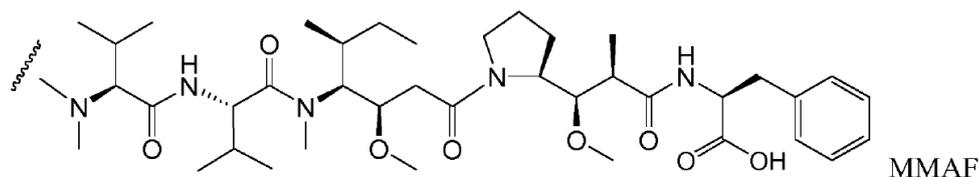
15 En algunas realizaciones, el CAF comprende un anticuerpo de la invención conjugado con dolastatinas o análogos peptídicos de dolostatinas y derivados, las auristatinas (patente de EE.UU. Nos. 5.635.483; 5.780.588). Se ha demostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents y Chemother. 45 (12): 3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (Patente de Estados Unidos N° 5.663.149) y antifúngica (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). El resto del fármaco dolastatina o auristatina se puede unir al anticuerpo a través del extremo N (amino) o el extremo C (carboxilo) del resto del fármaco peptídico (documento WO 02/088172).

Ejemplos de realizaciones de auristatina incluyen las fracciones de fármaco de monometilauristatina unidas al extremo N DE y DF, descritas en "Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research", Volumen 45, Resumen Número 623, presentado el 28 de marzo de 2004 y descrito en Estados Unidos Publicación de Patente No. 2005/0238649, cuya descripción se incorpora expresamente por referencia en su totalidad.

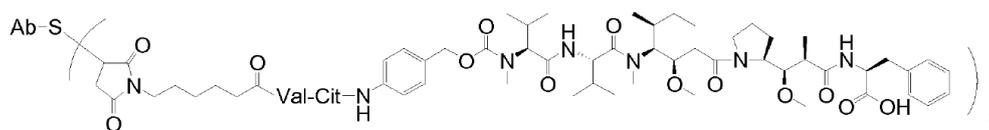
25 Una realización de auristatina ejemplar es MMAE (en la que la línea ondulada indica la unión covalente a un enlazador (L) de un conjugado de fármaco y anticuerpo).



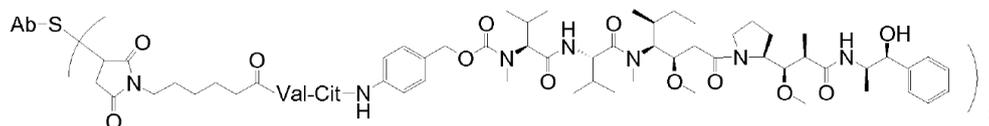
Otra realización ejemplar de auristatina es MMAF, en donde la línea ondulada indica la unión covalente a un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo y fármaco (documento US 2005/0238649):



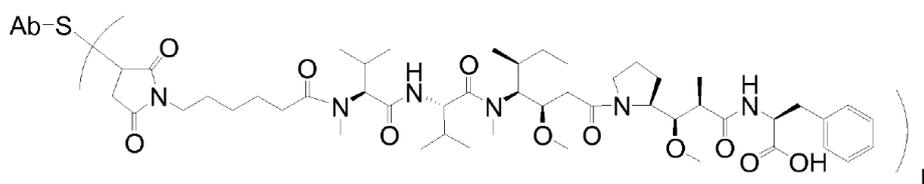
30 Las realizaciones ejemplares adicionales que comprenden MMAE o MMAF y diversos componentes enlazadores (descritos adicionalmente en este documento) tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (en donde Ab significa anticuerpo, S es un azufre del anticuerpo, y p es de 1 a aproximadamente 8):



Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAF

Típicamente, las fracciones de fármaco basadas en péptidos se pueden preparar formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, páginas 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los restos de fármaco auristatina/dolastatina se pueden preparar de acuerdo con los métodos de: la patente de EE.UU. No. 5.635.483; Pat. de EE.UU. No. 5.780.588; Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13: 243 - 277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719 - 725; Pettit et al. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5: 859-863; y Doronina (2003) Nat Biotechnol 21 (7): 778-784.

10 III (C). Caliqueamicina

En otras realizaciones, el CAF comprende un anticuerpo de la invención conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos caliqueamicina es capaz de producir roturas de ADN de doble cadena a concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, ver la patente de EE.UU. Nos. 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman et al. al., Cancer Research 53: 3336 - 3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58: 2925 - 2928 (1998) y las patentes de EE. UU. antes mencionadas para American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral que el anticuerpo puede conjugarse es QFA que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen sitios de acción intracelulares y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos aumenta en gran medida sus efectos citotóxicos.

III (D). Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozoicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrito en la patente de EE.UU. Nos. 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (Patente de Estados Unidos N° 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen cadena diftérica A, fragmentos activos no enlazantes de toxina diftérica, cadena exotoxina A (de Pseudomonas aeruginosa), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas Aleurites fordii, proteínas diantinas, proteínas Phytolaca americana (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de saponaria officinalis, gelonina, mitogenina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente invención además contempla un CAF formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa, DNasa).

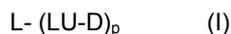
Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Una variedad de isótopos radiactivos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios gammagráficos, por ejemplo, $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , o un marcador de espín para la resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como resonancia magnética (IRM), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los radiomarcadores u otras se pueden incorporar en el conjugado de formas conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Se pueden unir marcadores como $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} a través de un residuo de cisteína en el péptido. El itrio-90 se puede unir a través de un residuo de lisina. El método IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun 80: 49-57 se puede usar para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

IV.) Compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco que se unen a 191P4D12

La presente invención proporciona, entre otros, compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco para la administración dirigida de fármacos. Los inventores han descubierto que los compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco tienen una potente actividad citotóxica y/o citostática contra las células que expresan 191P4D12. Los compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco comprenden una unidad de anticuerpo unida covalentemente a al menos una unidad de fármaco. Las unidades farmacéuticas se pueden unir covalentemente directamente o a través de una unidad enlazante (LU).

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



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; donde:

L es la unidad de anticuerpo, por ejemplo, MAb 191P4D12 de la presente invención, y

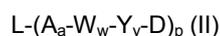
(LU-D) es un resto de una unidad enlazante-unidad de fármaco, en donde:

LU- es una unidad enlazante, 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.

En algunas realizaciones, p varía 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 ó 6. En algunas realizaciones, p es 2 ó 4.

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



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

L es la unidad de anticuerpo, por ejemplo, MAb 191P4D12; y

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

-A- es una unidad ensanchadora,

a es 0 ó 1,

cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido,

w es un número entero que va desde 0 a 12,

-Y- es una unidad espaciadora autoinmolable,

y es 0, 1 ó 2;

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

p es un número entero de 1 a 20.

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

Para las composiciones que comprenden una pluralidad de anticuerpos, la carga farmacéutica está representada por p, el número promedio de moléculas de fármaco por anticuerpo. La carga farmacéutica puede variar de 1 a 20 medicamentos (D) por anticuerpo. El número promedio de fármacos por anticuerpo en la preparación de reacciones de conjugación se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectroscopia de masas, ensayo ELISA y HPLC. La distribución cuantitativa de conjugados de anticuerpo y fármaco en términos de p también puede determinarse. En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de conjugados de anticuerpo-fármaco homogéneos donde p es un cierto valor de conjugados de anticuerpo-fármaco con otras cargas farmacéuticas se puede lograr por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis. En realizaciones ejemplares, p es de 2 a 8.

La generación de compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica. Brevemente, los compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco comprenden MAb de 191P4D12 como la unidad de anticuerpo, un fármaco y, opcionalmente, un enlazante que se une al fármaco y al agente de unión. En una realización preferida, el anticuerpo es MAb 191P4D12 que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo designado como Ha22-2(2,4)6.1 descrito anteriormente. En una realización más preferida, el anticuerpo es 191P4D12 MAb que comprende la cadena pesada y ligera de un anticuerpo designado Ha22-2(2,4)6.1 descrito anteriormente. Están disponibles varias reacciones diferentes para la unión covalente de fármacos y/o enlazantes a agentes de unión. Esto se logra a menudo por la reacción de los residuos de aminoácidos del agente de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que incluye los grupos amina de lisina, los grupos ácidos carboxílicos libres de ácido glutámico y aspártico, los grupos sulfhidrilo de cisteína y los diversos restos de los aminoácidos aromáticos. Uno de los métodos no específicos más comúnmente utilizados de unión covalente es la reacción de carbodiimida para unir un grupo carboxi (o amino) de un compuesto a grupos amino (o carboxi) del anticuerpo. Adicionalmente, se han usado agentes bifuncionales tales como dialdehídos o imidoésteres para unir el grupo amino de un compuesto a grupos amino de una molécula de anticuerpo. También está disponible para la unión de fármacos a agentes de unión la reacción de base de Schiff. Este método implica la oxidación con peryodato de un fármaco que contiene grupos glicol o hidroxilo, formando así un aldehído que luego reacciona con el agente de unión. La unión se produce mediante la formación de una base de Schiff con grupos amino del agente de unión. Los isotiocianatos también se pueden usar como agentes de acoplamiento para unir covalentemente fármacos a agentes aglutinantes. Los expertos en la técnica conocen otras técnicas y están dentro del alcance de la presente invención.

En ciertas realizaciones, un intermedio, que es el precursor del enlazante, se hace reaccionar con el fármaco en condiciones apropiadas. En ciertas realizaciones, se usan grupos reactivos en el fármaco y/o el intermedio. El producto de la reacción entre el fármaco y el intermedio, o el fármaco derivatizado, se hace reaccionar subsiguientemente con el MAb 191P4D12 en condiciones apropiadas.

Cada una de las unidades particulares de los compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco se describe con más detalle en el presente documento. La síntesis y estructura de las unidades de enlazante ejemplares, unidades del ensanchador, unidades de aminoácidos, unidad espaciadora autoinmolable y unidades farmacéuticas también se describen en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nos. 2003-0083263, 2005-0238649 y 2005-0009751.

V.) Unidades enlazantes

Típicamente, los compuestos conjugados de anticuerpo-fármaco comprenden una unidad enlazante entre la unidad farmacéutica y la unidad de anticuerpo. En algunas realizaciones, el enlazante es escindible en condiciones intracelulares, de modo que la escisión del enlazante libera la unidad farmacéutica del anticuerpo en el entorno intracelular. En otras realizaciones más, la unidad enlazante no es escindible y el fármaco se libera, por ejemplo, por degradación del anticuerpo.

En algunas realizaciones, el enlazante es escindible por un agente de escisión que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveolea). El enlazante puede ser, por ejemplo, un enlazante peptídico que se escinde mediante una peptidasa o enzima de proteasa intracelular, que incluye, pero sin limitación, una proteasa lisosómica o endosómica. En algunas realizaciones, el enlazante de peptídico tiene al menos dos aminoácidos de longitud o al menos tres aminoácidos de longitud. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todas las cuales se sabe que hidrolizan derivados de fármacos dipeptídicos dando como resultado 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 enlazantes de peptídico que son escindibles por las enzimas que están presentes en las células que expresan 191P4D12. Por ejemplo, se puede usar un enlazante de peptídico escindible por la proteasa dependiente de tiol catepsina B, que está altamente

expresada en tejido canceroso (p. ej., Un enlazante Phe-Leu o Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 9)). Se describen otros ejemplos de dichos enlazantes, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 6.214.345, incorporada en este documento como referencia en su totalidad y para todos los propósitos. En una realización específica, el enlazante peptídico escindible por una proteasa intracelular es un enlazante Val-Cit o un enlazante Phe-Lys (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.214.345, que describe la síntesis de doxorubicina con el enlazante Val-Cit). Una ventaja del uso de la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente típicamente se atenúa cuando se conjuga y las estabildades en suero de los conjugados son típicamente altas.

En otras realizaciones, el enlazante escindible es sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH. Típicamente, el enlazante sensible al pH es hidrolizable en condiciones ácidas. Por ejemplo, se puede usar un enlazante lábil en ácido que sea hidrolizable en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetal, cetol o similares). (Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 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). Tales enlazantes son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tales como los que se encuentran en la sangre, pero son inestables por debajo de pH 5,5 ó 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En ciertas realizaciones, el enlazante hidrolizable es un enlazante 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 Estados Unidos N° 5.622.929).

En otras realizaciones más, el enlazante es escindible en condiciones reductoras (por ejemplo, un enlazante disulfuro). En la técnica se conocen diversos enlaces disulfuro, que incluyen, por ejemplo, aquellos que se pueden formar usando 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-piridil-ditio)tolueno), SPDB y SMPT. (Véase, por ejemplo, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., en Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Ver también la patente de los EE.UU. No. 4.880.935).

En aún otras realizaciones específicas, el enlazante es un enlazante de malonato (Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15: 1387 - 93), un enlazante de maleimidobenziloilo (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 más, la unidad enlazante no es escindible y el fármaco se libera por la degradación del anticuerpo. (Véase la Publicación de Estados Unidos N° 2005/0238649).

Típicamente, el enlazante no es sustancialmente sensible al entorno extracelular. Como se usa en este documento, "no es sustancialmente sensible al entorno extracelular", en el contexto de un enlazante, significa que no más de aproximadamente 20%, típicamente no más de aproximadamente 15%, más típicamente no más de aproximadamente 10%, y aún más típicamente no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 3%, o no más de aproximadamente 1% de los enlazantes, en una muestra de compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco, se escinden cuando el compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco se presenta en un entorno extracelular (por ejemplo, en plasma). Que un enlazante no es sustancialmente sensible al entorno extracelular se puede determinar, por ejemplo, incubando con plasma el compuesto conjugado anticuerpo-fármaco durante un período de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16 ó 24 horas) y luego cuantificando la cantidad de fármaco libre presente en el plasma.

En otras realizaciones no mutuamente excluyentes, el enlazante promueve la internalización celular. En ciertas realizaciones, el enlazante promueve la internalización celular cuando se conjuga con el agente terapéutico (es decir, en el medio del resto enlazante-agente terapéutico del compuesto conjugado anticuerpo-fármaco como se describe en este documento). En otras realizaciones más, el enlazante promueve la internalización celular cuando se conjuga tanto con el compuesto de auristatina como con el MAb 191P4D12.

Se describen diversos enlazantes ejemplares que se pueden usar con las presentes composiciones y métodos en los documentos WO 2004-010957, publicación estadounidense n.º 2006/0074008, publicación estadounidense n.º 20050238649 y publicación estadounidense n.º 2006/0024317.

Una "unidad de enlazante" (LU) es un compuesto bifuncional que se puede usar para unir una unidad farmacéutica y una unidad de anticuerpo para formar un compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco. En algunas realizaciones, la unidad de enlazante tiene la fórmula:



en donde: -A- es una unidad ensanchadora,

a es 0 ó 1,

cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido,

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

-Y- es una unidad espaciadora auto-inmoladora, e

y es 0, 1 ó 2.

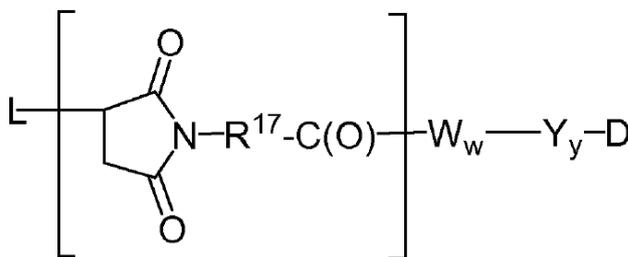
En algunas realizaciones, a es 0 ó 1, w es 0 ó 1, e y es 0, 1 ó 2. En algunas realizaciones, a es 0 ó 1, w es 0 ó 1, e y es 0 ó 1. En algunas realizaciones, cuando w es de 1 a 12, y es 1 ó 2. En algunas realizaciones, w es de 2 a 12 e y es 1 ó 2. En algunas realizaciones, a es 1 y w e y son 0.

VI.) La unidad ensanchadora

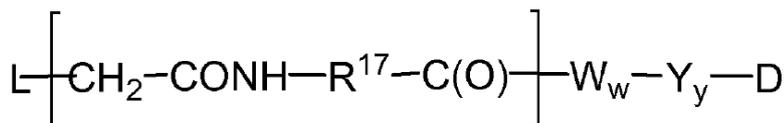
La unidad ensanchadora (A), cuando está presente, es capaz de unir una unidad de anticuerpo a una unidad de aminoácido (-W-), si está presente, a una unidad espaciadora (-Y-), si está presente; o a una unidad de fármaco (-D). Grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un MAb 191P4D12 (p. ej. Ha22-2(2,4)6.1), ya sea de forma natural o mediante manipulación química, incluyen, pero sin limitación, sulfhidrido, amino, hidroxilo, el grupo hidroxilo anomérico de un hidrato de carbono y carboxilo. Los grupos funcionales adecuados son sulfhidrido y amino. En un ejemplo, los grupos sulfhidrido pueden generarse por reducción de los enlaces disulfuro intramoleculares de un MAb 191P4D12. En otra realización, los grupos sulfhidrido pueden generarse por la reacción de un grupo amino de un resto de lisina de un MAb 191P4D12 con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otros reactivos que generan sulfhidrido. En ciertas realizaciones, el MAb 191P4D12 es un anticuerpo recombinante y está diseñado para transportar una o más lisinas. En ciertas otras realizaciones, el MAb 191P4D12 recombinante se modifica por ingeniería genética para transportar grupos sulfhidrido adicionales, por ejemplo, cisteínas adicionales.

En una realización, la unidad ensanchadora forma un enlace con un átomo de azufre de la unidad de anticuerpo. El átomo de azufre se puede derivar de un grupo sulfhidrido de un anticuerpo. Las unidades representativas de ensanchador de esta realización se representan dentro de los corchetes de las fórmulas IIIa y IIIb, en donde L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se definieron anteriormente, y R¹⁷ se selecciona de -alquileo C₁-C₁₀-, -alquenileno C₁-C₁₀-, -alquinileno C₁-C₁₀-, carbociclo-, -O-(alquileo C₁-C₈)-, O-(alquenileno C₁-C₈)-, -O-(alquinileno C₁-C₈)-, arileno, alquileo C₁-C₁₀-arileno-, alquenileno C₂-C₁₀-arileno, alquinileno C₂-C₁₀-arileno, -arileno-alquileo C₁-C₁₀-, -arileno-alquenileno C₂-C₁₀-, -arileno-alquinileno C₂-C₁₀-, -alquileo C₁-C₁₀-(carbociclo)-, -alquenileno C₂-C₁₀-(carbociclo)-, -alquinileno C₂-C₁₀-(carbociclo)-, -(carbociclo)-alquileo C₁-C₁₀-, -(carbociclo)-alquenileno C₂-C₁₀-, -(carbociclo)-alquinileno C₂-C₁₀-, -heterociclo-, alquilen C₁-C₁₀-(heterociclo)-, alquenileno C₂-C₁₀-(heterociclo)-, alquinileno C₂-C₁₀-(heterociclo)-, -(heterociclo)-alquileo 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, donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileo, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo, carbociclo, heterociclo y arileno, ya sean solos o como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos. En algunas realizaciones, dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileo, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo, carbociclo, heterociclo y arileno, ya sean solos o como parte de otro grupo, no están sustituidos. En algunas realizaciones, R¹⁷ se selecciona de alquileo C₁-C₁₀-, -carbociclo-, -O-(alquileo C₁-C₈)-, -arileno-, alquileo C₁-C₁₀-arileno-, -arileno-alquileo C₁-C₁₀-, alquilen C₁-C₁₀ (carbociclo)-, -(carbociclo)-alquileo C₁-C₁₀-, heterociclo- C₃-C₈, alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo)-, -(heterociclo)-alquileo C₁-C₁₀-, -(CH₂CH₂O)_r y -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; y r es un número entero que varía de 1-10, en el que dichos grupos alquileo no están sustituidos y el resto de los grupos está opcionalmente sustituido.

Debe entenderse a partir de todas las realizaciones ejemplares que incluso cuando no se indique expresamente, se pueden unir 1 a 20 restos de fármaco a un anticuerpo (p = 1-20).

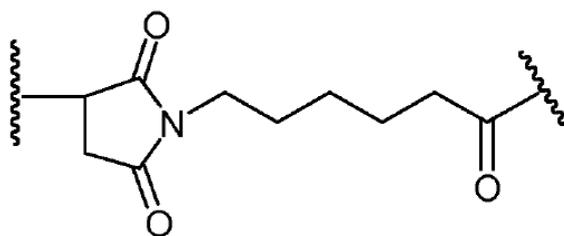


IIIa

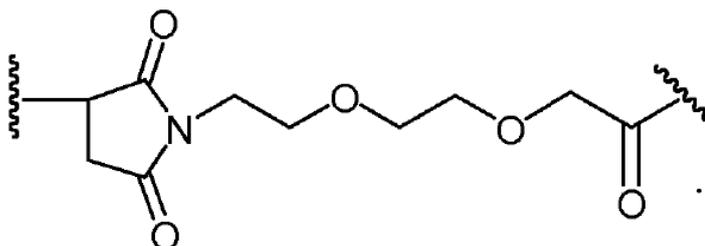


IIIb

40 Una unidad de ensanchamiento ilustrativa es la de la Fórmula IIIa en la que R¹⁷ es -(CH₂)₅:

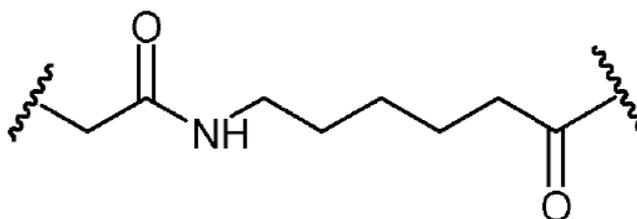


Otra unidad de Ensanchamiento ilustrativa es la de la Fórmula IIIa en la que R¹⁷ es -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; y r es 2:

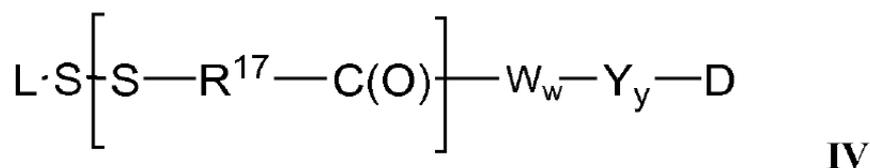


5 Una unidad de ensanchamiento ilustrativa es la de la Fórmula IIIa en donde R¹⁷ es arileno o arileno-alkileno C₁-C₁₀-. En algunas realizaciones, el grupo arilo es un grupo fenilo no sustituido.

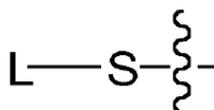
Todavía otra unidad de ensanchamiento ilustrativa es la de la Fórmula IIIb en la que R¹⁷ es -(CH₂)₅-:



10 En ciertas realizaciones, la unidad ensanchadora 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 ensanchadora. Una unidad ensanchadora representativa de esta realización se representa dentro de los corchetes de Fórmula IV, en donde R¹⁷, L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se han definido anteriormente.

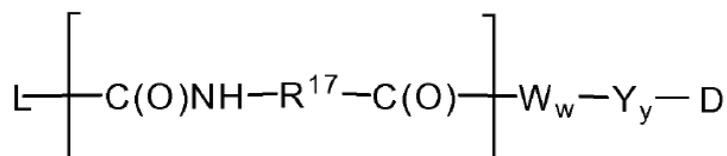


Debe observarse que, a lo largo de esta solicitud, el resto S en la fórmula siguiente se refiere a un átomo de azufre de la unidad de anticuerpo, a menos que se indique lo contrario por el contexto.

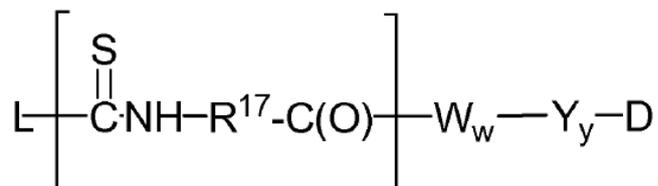


15 En otras realizaciones más, el ensanchador contiene un sitio reactivo que puede formar un enlace con un grupo amino primario o secundario de un anticuerpo. Los ejemplos de estos sitios reactivos incluyen, pero sin limitación, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Las unidades ensanchadoras representativas de esta realización se representan dentro de los corchetes de las fórmulas Va y Vb, en las que -R¹⁷-, L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se definieron anteriormente;

20

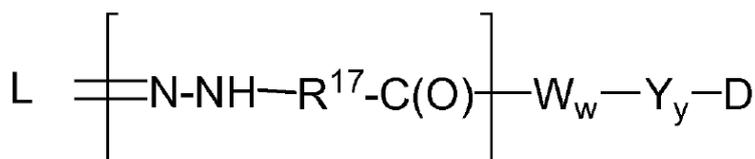


Va

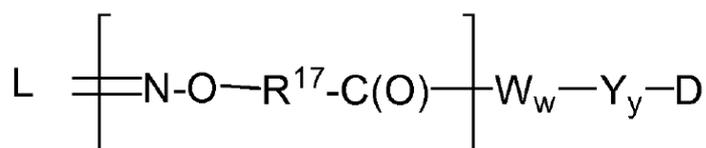


Vb

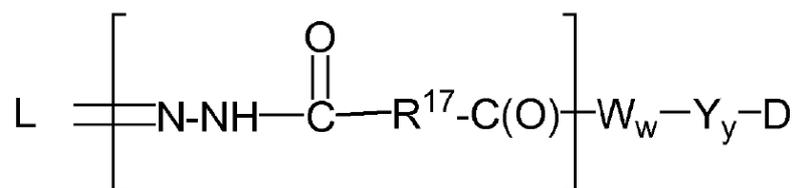
- 5 En algunas realizaciones, el ensanchador contiene un sitio reactivo que es reactivo con un grupo de carbohidratos modificados (-CHO) que puede estar presente en un anticuerpo. Por ejemplo, un carbohidrato se puede oxidar levemente usando un reactivo como el peryodato de sodio y la unidad resultante (-CHO) del carbohidrato oxidado se puede condensar con un ensanchador que contiene una funcionalidad como hidrazida, una oxima, una amina primaria o secundaria, una hidrazina, una tiosemicarbazona, un hidrazina carboxilato y una arilhidrazida tales como las descritas por Kaneko et al., 1991, Bioconjugate Chem. 2:133-41. Las unidades ensanchadoras representativas de esta realización se representan dentro de los corchetes de las Fórmulas VIa, VIb y VIc, en las que -R¹⁷-, L-, -W-, -Y-, -D, w e y se definen como encima.



VIa



VIb



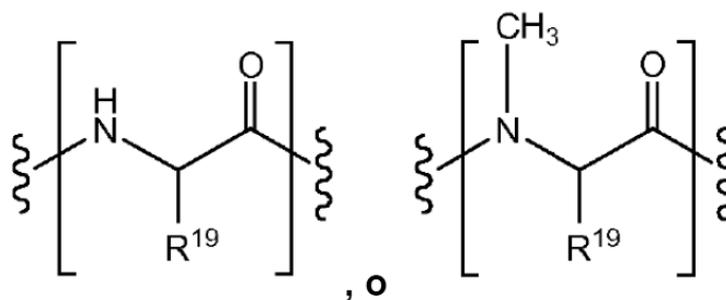
VIc

10

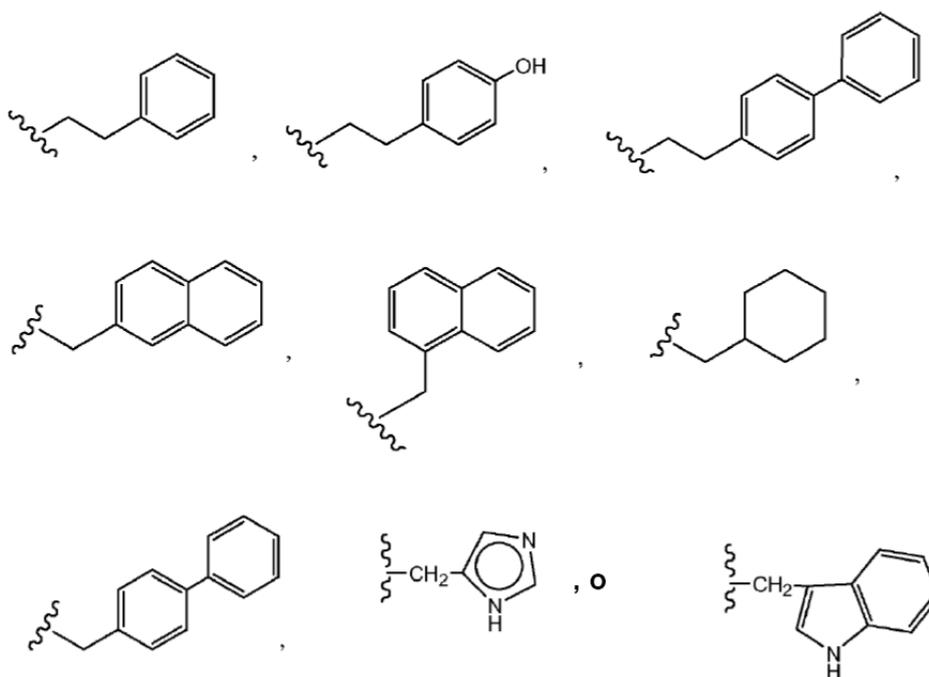
VII.) La unidad de aminoácidos

- 15 La unidad de aminoácidos (-W-), cuando está presente, vincula la unidad ensanchadora con la unidad espaciadora si la unidad espaciadora está presente, vincula la unidad ensanchadora al resto farmacéutico si la unidad espaciadora está ausente, y vincula la unidad de anticuerpo a la unidad farmacéutica si la unidad ensanchadora y la unidad espaciadora están ausentes.

W_w- puede ser, por ejemplo, una unidad de mon péptido, 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 va de 0 a 12:

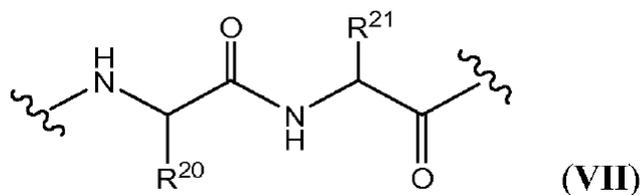


5 donde R¹⁹ es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, (CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂,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



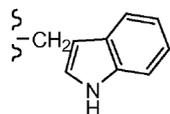
10 En algunas realizaciones, la unidad de aminoácido puede escindirse enzimáticamente por una o más enzimas, que incluyen una proteasa asociada a un cáncer o a un tumor, para liberar la unidad farmacéutica (-D), que en una realización se protona in vivo después de la liberación para proporcionar un fármaco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

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):



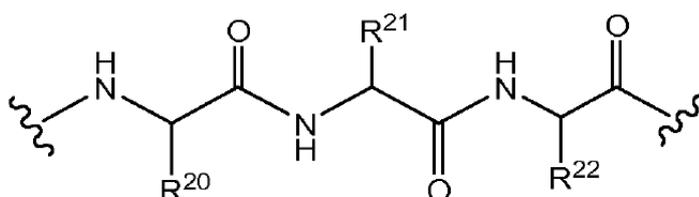
15 en donde R²⁰ y R²¹ son los siguientes:

| | | |
|---|-----------------|---|
| | R ²⁰ | R ²¹ |
| | Bencilo | (CH ₂) ₄ NH ₂ ; |
| | Metilo | (CH ₂) ₄ NH ₂ ; |
| | Isopropilo | (CH ₂) ₄ NH ₂ ; |
| 5 | 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 ; |



(CH₂)₃NHCONH₂

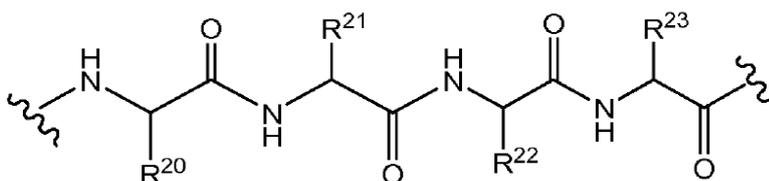
| | | |
|----|---------|---|
| 10 | Bencilo | Metilo; |
| | Bencilo | (CH ₂) ₃ NHC(=NH)NH ₂ ; |



(VIII)

en donde R²⁰, R²¹ y R²² son los siguientes:

| | | | |
|----|-----------------|-----------------|---|
| | R ²⁰ | R ²¹ | R ²² |
| 15 | Bencilo | Bencilo | (CH ₂) ₄ NH ₂ ; |
| | Isopropilo | Bencilo | (CH ₂) ₄ NH ₂ ; y |
| | H | Bencilo | (CH ₂) ₄ NH ₂ ; |



(IX)

en donde R²⁰, R²¹, R²² y R²³ son los siguientes:

| | | | | |
|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 20 | R ²⁰ | R ²¹ | R ²² | R ²³ |
| | H | Bencilo | Isobutilo | H; y |
| | Metilo | Isobutilo | Metilo | Isobutilo |

Las unidades ejemplares de aminoácidos incluyen, pero sin limitación, 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.
 25 Otra unidad ejemplar de aminoácidos es una unidad de fórmula VIII en la que R²⁰ es bencilo, R²¹ es bencilo, y R²² es -(CH₂)₄NH₂.

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

En una realización, $-W_w-$ es un dipéptido, tripéptido, tetrapéptido o pentapéptido. Cuando R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} o R^{23} son distintos de hidrógeno, el átomo de carbono al que R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} o R^{23} está unido es quiral.

Cada átomo de carbono al que están unidos R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} o R^{23} está independientemente en la configuración (S) o (R).

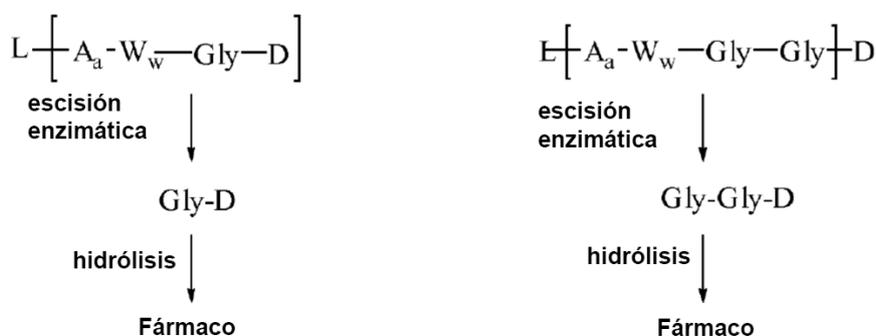
5 En un aspecto de la unidad de aminoácidos, la unidad de aminoácidos es valina-citrulina (vc o Val-Cit). En otro aspecto, la unidad de aminoácido es fenilalanina-lisina (es decir, fk). En otro aspecto más de la unidad de aminoácidos, la unidad de aminoácidos es N-metilvalina-citrulina. En otro aspecto más, la unidad de aminoácidos es ácido 5-aminovalérico, homo fenilalanina lisina, tetraisoquinolincarboxilato lisina, ciclohexilalanina lisina, ácido isonipecóico lisina, beta-alanina lisina, glicina serina valina glutamina y ácido isonipecóico.

10 VIII.) La unidad espaciadora

La unidad espaciadora (-Y-), cuando está presente, vincula una unidad de aminoácidos con la unidad farmacéutica cuando está presente una unidad de aminoácidos. Alternativamente, la unidad espaciadora vincula la unidad ensanchadora con la unidad farmacéutica cuando la unidad de aminoácidos está ausente. La unidad espaciadora también vincula la unidad farmacéutica a la unidad de anticuerpo cuando están ausentes la unidad de aminoácidos y la unidad ensanchadora.

15 Las unidades espaciales son de dos tipos generales: no autoinmolable o autoinmolable. Una unidad espaciadora no autoinmolable es una en la que una parte o la totalidad de la unidad espaciadora permanece unida al resto del fármaco después de la escisión, particularmente enzimática, de una unidad de aminoácido del conjugado anticuerpo-fármaco. Los ejemplos de una unidad espaciadora no autoinmolable incluyen, pero sin limitación, una
 20 unidad espaciadora (glicina-glicina) y una unidad espaciadora de glicina (ambas representadas en el Esquema 1) (infra). Cuando un conjugado que contiene una unidad espaciadora de glicina-glicina o una unidad espaciadora de glicina se somete a una escisión enzimática a través de una enzima (por ejemplo, una proteasa asociada a células tumorales, una proteasa asociada a células cancerígenas o una proteasa asociada a linfocitos), un resto glicina-glicina-fármaco o un resto glicina-fármaco se escinde de L-Aa-Ww-. En una realización, tiene lugar una reacción de
 25 hidrólisis independiente dentro de la célula diana, escindiendo el enlace del resto glicina-fármaco y liberando el fármaco.

Esquema 1



30 En algunas realizaciones, una unidad espaciadora no autoinmolable (-Y-) es -Gly-. En algunas realizaciones, una unidad espaciadora no autoinmolable (-Y-) es -Gly-Gly-.

En una realización, se proporciona un conjugado de fármaco-enlazante en el que la unidad espaciadora está ausente (-Y- cuando $y = 0$), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

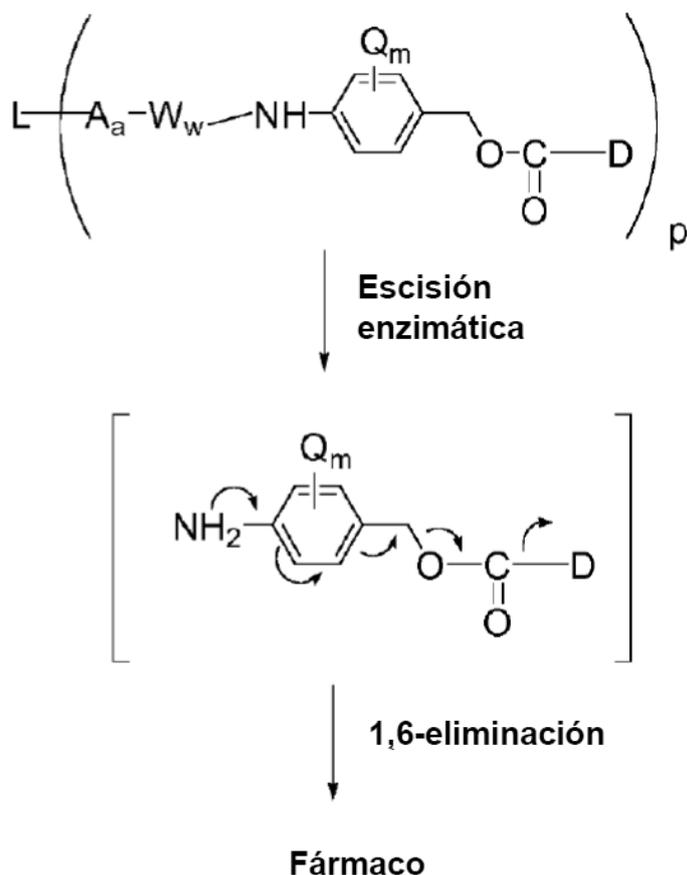
35 Alternativamente, un conjugado que contiene una unidad espaciadora autoinmolable puede liberar -D. Como se usa en el presente documento, la expresión "espaciador autoinmolable" se refiere a un resto químico bifuncional que es capaz de unir de manera covalente dos restos químicos espaciados en una molécula tripartita estable. Se separará espontáneamente del segundo resto químico si se escinde su enlace al primer resto.

40 En algunas realizaciones, $-Y_y-$ es una unidad de alcohol p-aminobencílico (PAB) (véanse los Esquemas 2 y 3) cuya porción de fenileno está sustituida con Q_m , en donde 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 va de 0 a 4. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.

En algunas realizaciones, -Y- es un grupo PAB que está unido a $-W_w-$ a través del átomo de nitrógeno del amino del grupo PAB, y conectado directamente a -D a través de un grupo carbonato, carbamato o éter. Sin estar ligado a ninguna teoría o mecanismo particular, el esquema 2 representa un posible mecanismo de liberación de fármaco de

un grupo PAB que está unido directamente a -D a través de un grupo carbamato o carbonato como se describe por Toki et al., 2002, J. Org. Chem. 67:1866-1872.

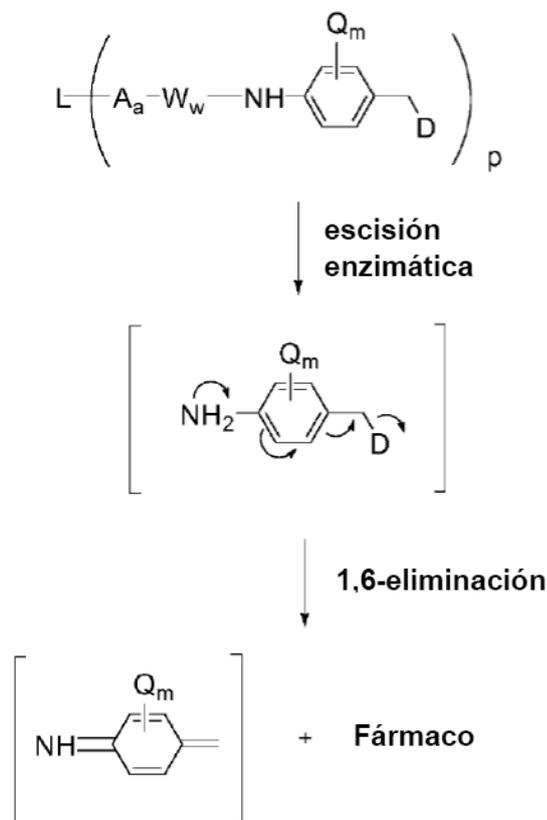
Esquema 2



- 5 En el Esquema 2, 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 oscila entre 0-4; y p varía de 1 a aproximadamente 20. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.

- 10 Sin estar sujeto a ninguna teoría o mecanismo particular, el Esquema 3 describe un posible mecanismo de liberación de fármaco de un grupo PAB que está unido directamente a -D a través de un enlace éter o amina, en donde D incluye el grupo de oxígeno o nitrógeno que es parte de la unidad farmacéutica.

Esquema 3

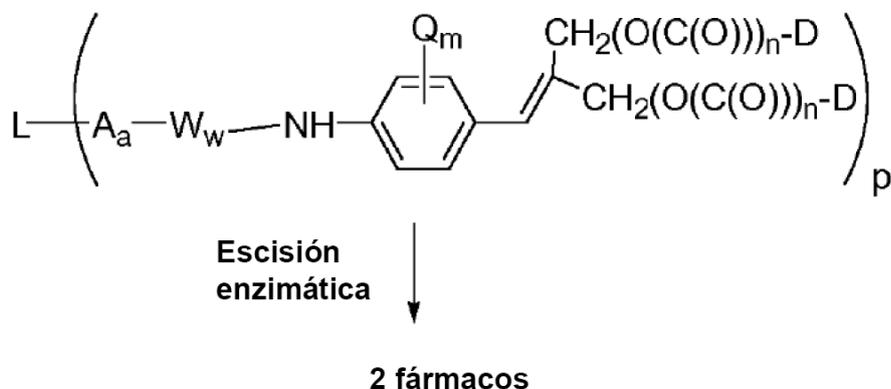


En el Esquema 3, Q es -alquilo C₁-C₈, alquenoilo C₁-C₈, alquinilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenoilo C₁-C₈), -O-(alquinilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que oscila entre 0-4; y p varía de 1 a aproximadamente 20. Los grupos alquilo, alquenoilo y alquinilo, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.

Otros ejemplos de espaciadores autoinmolables incluyen, pero sin limitación, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay et al., 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9: 2237) y orto o para-aminobencilacetales. Se pueden usar espaciadores que experimenten ciclación tras hidrólisis del enlace amida, tales como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues et al., 1995, Chemistry Biology 2: 223), sistemas de anillo biciclo [2.2.1] y biciclo [2.2.2] apropiadamente sustituidos (Storm et al., 1972, J. Amer. Chem. Soc. 94: 5815) y amidas del ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry et al., 1990, J. Org. Chem. 55:5867). La eliminación de fármacos que contienen aminas que están sustituidas en la posición α de glicina (Kingsbury et al., 1984, J. Med. Chem. 27: 1447) es también un ejemplo de espaciadores autoinmolables.

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

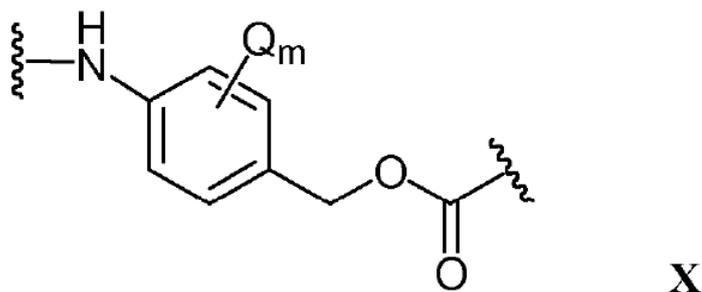
Esquema 4



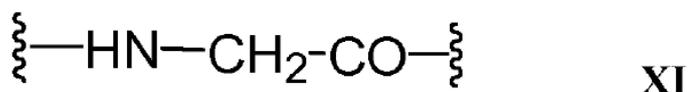
5 En el Esquema 4, Q es -alquilo C₁-C₈, alquenoilo C₁-C₈, alquinilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenoilo C₁-C₈), -O-(alquinilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que oscila entre 0-4; n es 0 ó 1; y p varía de 1 a aproximadamente 20. Los grupos alquilo, alquenoilo y alquinilo, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.

En algunas realizaciones, las fracciones -D son las mismas. En otra realización más, los restos -D son diferentes.

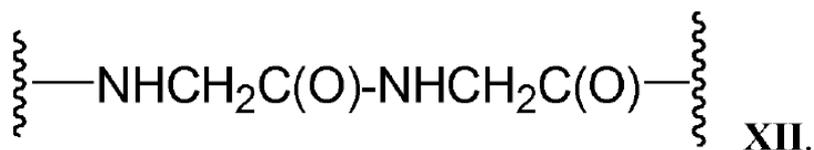
En un aspecto, las unidades espaciadoras (-Y-) están representadas por las fórmulas (X) - (XII):



10 donde Q es -alquilo C₁-C₈, alquenoilo C₁-C₈, alquinilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenoilo C₁-C₈), -O-(alquinilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que va de 0 a 4. Los grupos alquilo, alquenoilo y alquinilo, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.



y



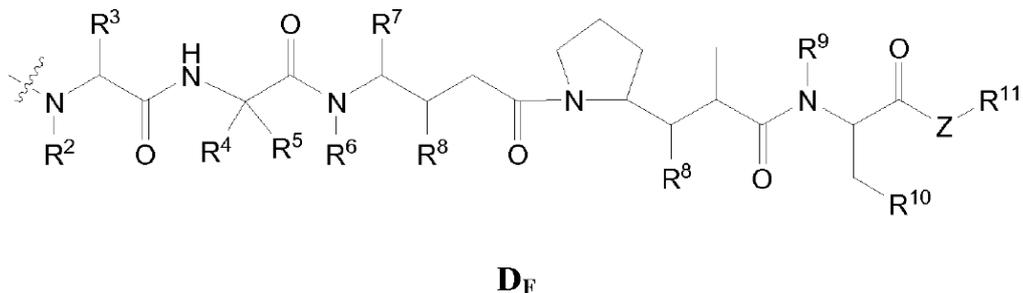
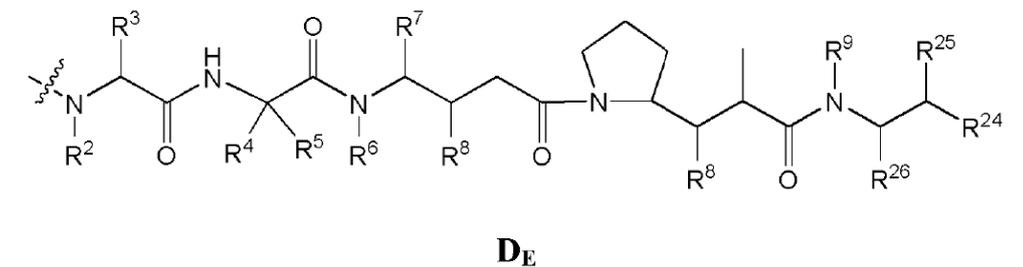
15 Las realizaciones de la Fórmula I y II, que comprenden compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco, pueden incluir:

unidad espaciadora. Como se usa en este documento, las expresiones "unidad farmacéutica" y "resto farmacéutico" son sinónimos y se usan de forma intercambiable.

Las clases útiles de agentes citotóxicos, citostáticos o inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, aglutinantes de surco minoritario de ADN, inhibidores de replicación de ADN y agentes alquilantes.

- 5 En algunas realizaciones, el fármaco es una auristatina, tal como auristatina E (también conocida en la técnica como un derivado de dolastatina-10) o un derivado de la misma. La auristatina puede ser, por ejemplo, un éster formado entre la auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, la auristatina E se puede hacer reaccionar con el ácido paraacetilbenzoico o el ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otras auristatinas típicas incluyen AFP, MMAF y MMAE. La síntesis y la estructura de auristatinas ejemplares se describen en la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003-0083263; la Publicación de Patente Internacional No. WO 04/010957, la Publicación de Patente Internacional No. WO 02/088172, y las Pat. U.S. Nos. 7.498.298, 6.884.869, 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, cada una de las cuales se incorpora por referencia en este documento en su totalidad y para todos los fines.
- 10
- 15 Se ha demostrado que las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos y la división nuclear y celular y tienen actividad anticancerígena. Las auristatinas se unen a la tubulina y pueden ejercer un efecto citotóxico o citostático sobre una célula que expresa 191P4D12. Hay varios ensayos diferentes, conocidos en la técnica, que se pueden usar para determinar si una auristatina o el conjugado de anticuerpo-fármaco resultante ejercen un efecto citostático o citotóxico sobre una línea celular deseada.
- 20 Los métodos para determinar si un compuesto se une a tubulina son conocidos en la técnica. Ver, 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 tubulina. Algunas auristatinas preferidas de la presente invención se unen a tubulina con una afinidad que varía desde 10 veces menor (afinidad más débil) que la afinidad de unión de MMAE a tubulina a 10 veces, 20 veces o incluso 100 veces mayor (mayor afinidad) que la afinidad de unión de MMAE a tubulina.
- 25

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



- 30 o una forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde, independientemente en cada ubicación:

la línea ondulada indica un enlace;

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

- 35 R³ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, -carbociclo, -alquileno C₁-C₂₀ (carbociclo), -alquenileno C₂-C₂₀(carbociclo), -alquinileno C₂-C₂₀(carbociclo), -arilo, -alquileno C₁-C₂₀(arilo), -alquenileno C₂-C₂₀(arilo), -alquinileno C₂-C₂₀(arilo), heterociclo, -alquileno C₁-C₂₀(heterociclo), -alquenileno C₂-C₂₀(heterociclo) o alquinileno C₂-C₂₀(heterociclo);

R⁴ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, carbociclo, alquileo C₁-C₂₀(carbociclo), -alquenileno C₂-C₂₀(carbociclo), -alquinileno C₂-C₂₀(carbociclo), arilo, alquileo C₁-C₂₀(arilo), -alquenileno C₂-C₂₀ (arilo), -alquinileno C₂-C₂₀(arilo), -heterociclo, alquileo C₁-C₂₀(heterociclo), -alquenileno C₂-C₂₀(heterociclo) o alquinileno C₂-C₂₀ (heterociclo);

5 R⁵ es -H o -alquilo C₁-C₈; o

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

R⁶ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, o alquinilo C₂-C₂₀;

10 R⁷ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, carbociclo, -alquileo C₁-C₂₀ (carbociclo), -alquenileno C₂-C₂₀ (carbociclo), -alquinileno C₂-C₂₀ (carbociclo), -arilo, alquileo C₁-C₂₀ (arilo), -alquenileno C₂-C₂₀ (arilo), -alquinileno C₂-C₂₀ (arilo), heterociclo, alquileo C₁-C₂₀ (heterociclo), -alquenileno C₂-C₂₀ (heterociclo) o alquinileno C₂-C₂₀ (heterociclo);

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

15 R⁹ es -H -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, o alquinilo C₂-C₂₀;

R²⁴ es -arilo, -heterociclo o -carbociclo;

R²⁵ es -H, alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, -carbociclo, -O-(alquilo C₁-C₂₀), -O-(alquenilo C₂-C₂₀), -O-(alquinilo C₂-C₂₀), u OR¹⁸, en donde R¹⁸ es -H, un grupo protector de hidroxilo, o un enlace directo donde OR¹⁸ representa =O;

20 R²⁶ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀ o -alquinilo C₂-C₂₀, -arilo, -heterociclo o -carbociclo;

R¹⁰ es -arilo o -heterociclo;

Z es -O, -S, -NH o -NR¹², en donde R¹² es alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀ o -alquinilo C₂-C₂₀;

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

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

25 R¹³ es -alquileo C₂-C₂₀, -alquenileno C₂-C₂₀ o -alquinileno C₂-C₂₀;

R¹⁴ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀ o -alquinilo C₂-C₂₀;

cada aparición de R¹⁵ es independientemente -H, -COOH, -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, -(CH₂)_n-SO₃H, -(CH₂)_n-SO₃-alquilo C₁-C₂₀, -(CH₂)_n-SO₃-alquenilo C₂-C₂₀, o -(CH₂)_n-SO₃-alquinilo C₂-C₂₀;

30 cada aparición de R¹⁶ es independientemente -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀ o -(CH₂)_n-COOH; y

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

donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileo, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo y heterociclo, ya sean solos o como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos.

35 Las auristatinas de la fórmula D_E incluyen aquellas en las que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileo, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo y heterociclo no están sustituidos.

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

Las auristatinas de la fórmula D_E incluyen aquellas en las que

R² es alquilo C₁-C₈;

40 R³, R⁴ y R⁷ se seleccionan independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, carbociclo C₃-C₆ monocíclico, alquileo C₁-C₂₀ (carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -alquenileno C₂-C₂₀ (carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -alquinileno C₂-C₂₀ (carbociclo C₃-C₆ monocíclico), arilo C₆-C₁₀, alquileo C₁-C₂₀ (arilo C₆-C₁₀), -alquenileno C₂-C₂₀ (arilo C₆-C₁₀), -alquinileno C₂-C₂₀ (arilo C₆-C₁₀), heterociclo, alquileo C₁-C₂₀ (heterociclo), -alquenileno C₂-C₂₀ (heterociclo) o -alquinileno C₂-C₂₀ (heterociclo); en donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileo, alquenileno, alquinileno, 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 el 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 donde R¹⁸ es H, un grupo protector de hidroxilo, o un enlace directo donde OR¹⁸ representa =O;

10 R²⁶ se selecciona de -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀ o -carbociclo; en donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo y carbociclo están opcionalmente sustituidos; o una forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las auristatinas de la fórmula D_E incluyen aquellas en las que

R² es metilo;

R³ es -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈ o -alquinilo C₂-C₈, donde dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;

15 R⁴ es -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, carbociclo C₃-C₆ monocíclico, -arilo C₆-C₁₀, alquileo C₁-C₈ (arilo C₆-C₁₀), -alquilenilo C₂-C₈ (arilo C₆-C₁₀), alquinileno C₂-C₈ (arilo C₆-C₁₀), alquileo C₁-C₈ (carbociclo C₃-C₆ monocíclico), alquilenilo C₂-C₈ (carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -alquinileno C₂-C₈ (carbociclo C₃-C₆ monocíclico); donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileo, alquilenilo, alquinileno, arilo y carbociclo, ya sean solos o como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos;

20 R⁵ es -H;

R⁶ es metilo;

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

cada R⁸ es metoxi;

R⁹ es -H o -alquilo C₁-C₈;

25 R²⁴ es -fenilo;

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

R²⁶ es metilo;

o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las auristatinas de la fórmula D_E incluyen aquellas en donde:

30 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 donde R¹⁸ es -H, un grupo protector de hidroxilo, o un enlace directo donde OR¹⁸ representa =O; y R²⁶ es metilo; o una forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las auristatinas de la fórmula D_E incluyen aquellas en las que:

35 R² es metilo o alquilo C₁-C₃,

R³ es -H o -alquilo C₁-C₃;

R⁴ es alquilo C₁-C₅;

R⁵ es H;

R⁶ es alquilo C₁-C₃;

40 R⁷ es alquilo C₁-C₅;

R⁸ es -alcoxi C₁-C₃;

R⁹ es -H o -alquilo C₁-C₈;

R²⁴ es fenilo;

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

R²⁶ es alquilo C₁-C₃;

5 o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las auristatinas de la fórmula D_F incluyen aquellas en las que

R² es metilo;

10 R³, R⁴ y R⁷ se seleccionan independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, carbociclo C₃-C₆ monocíclico, -alquileno C₁-C₂₀ (carbociclo C₃-C₆ monocíclico), alquenileno C₂-C₂₀ (carbociclo C₃-C₆ monocíclico), alquinileno C₂-C₂₀ (carbociclo C₃-C₆ monocíclico), arilo C₆-C₁₀, alquileno C₁-C₂₀ (arilo C₆-C₁₀), alquenileno C₂-C₂₀ (arilo C₆-C₁₀), alquinileno C₂-C₂₀ (arilo C₆-C₁₀), heterociclo, alquileno C₁-C₂₀ (heterociclo), alquenileno C₂-C₂₀ (heterociclo) o -alquinileno C₂-C₂₀ (heterociclo); donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno, alquinileno, carbociclo, arilo y heterociclo, ya sean solos o como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos;

15 R⁵ es -H;

R⁶ es metilo;

cada R⁸ es metoxi;

R⁹ es -H -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, o -alquinilo C₂-C₂₀; en el que dicho radical alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;

20 R¹⁰ es arilo opcionalmente sustituido o heterociclo opcionalmente sustituido;

Z es -O-, -S-, -NH- o -NR¹², en donde R¹² es alquilo C₁-C₂₀, alquenilo C₂-C₂₀ o alquinilo C₂-C₂₀, cada uno de los cuales es opcionalmente sustituido;

R¹¹ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, -arilo, -heterociclo, -(R¹³O)_m-R¹⁴, o -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂, en donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y heterociclo están opcionalmente sustituidos;

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

R¹³ es alquileno C₂-C₂₀, alquenileno C₂-C₂₀ o alquinileno C₂-C₂₀, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

R¹⁴ es -H -alquilo C₁-C₂₀, alquenilo C₂-C₂₀, o alquinilo C₂-C₂₀, en el que dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;

30 cada aparición de R¹⁵ es independientemente -H, -COOH, -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, -(CH₂)_n-SO₃H, -(CH₂)_n-SO₃-alquilo C₁-C₂₀, -(CH₂)_n-SO₃-alquenilo C₂-C₂₀, o -(CH₂)_n-SO₃-alquinilo C₂-C₂₀ en el que dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;

cada aparición de R¹⁶ es independientemente -H, -alquilo C₁-C₂₀, alquenilo C₂-C₂₀, alquinilo C₂-C₂₀ o -(CH₂)_n-COOH en donde dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;

35 n es un número entero que varía entre 0 y 6;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En algunas de estas realizaciones, R¹⁰ es fenilo opcionalmente sustituido.

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

40 Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en las que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo y heterociclo no están sustituidos.

Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en las que

45 R² es alquilo C₁-C₃; R³ es -H o alquilo C₁-C₃; 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; R¹⁰ es fenilo opcionalmente sustituido; Z es -O-, -S- o -NH-; R¹¹ es como se define en este documento; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

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 este documento; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

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; y Z es -O- o -NH- y R^{11} son como se define en la presente memoria, preferiblemente hidrógeno; o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en las que

10 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 memoria, preferiblemente hidrógeno; o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 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 una realización ejemplar, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^5 es H y R^7 es sec-butilo. El resto de los sustituyentes es como se define en este documento.

Las Auristatinas de la 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 es como se define en este documento.

Las auristatinas de fórmula D_E o D_F incluyen aquellas en las que cada aparición de R^8 es -OCH₃. El resto de los sustituyentes es como se define en este documento.

20 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 aparición de R^8 es -OCH₃, y R^9 es H. El resto de los sustituyentes son como se define en este documento.

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

25 Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en las que R^{10} es arilo. El resto de los sustituyentes son como se define en este documento.

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

30 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 define en este documento.

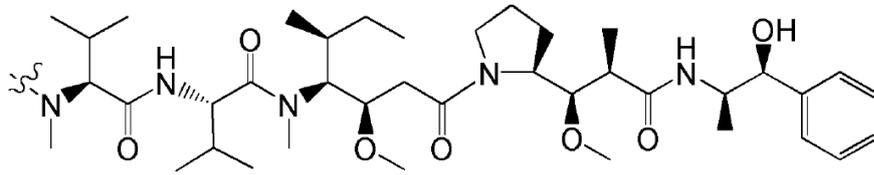
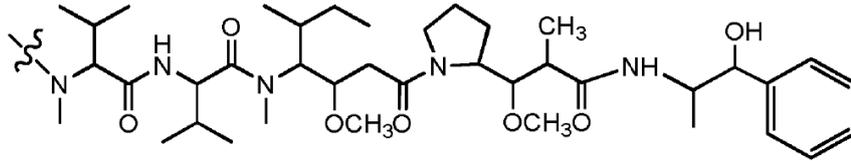
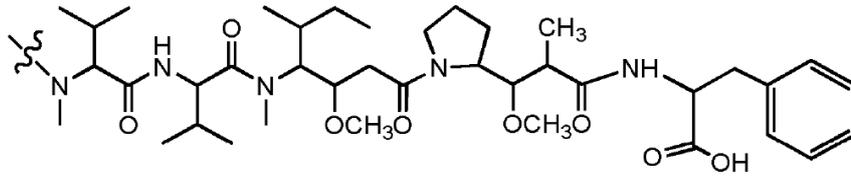
Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en las que, cuando Z es -NH-, R^{11} es $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$, en donde R^{15} es $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, y R^{16} es alquilo C_1-C_8 o $-(CH_2)_n-COOH$. El resto de los sustituyentes son como se define en este documento.

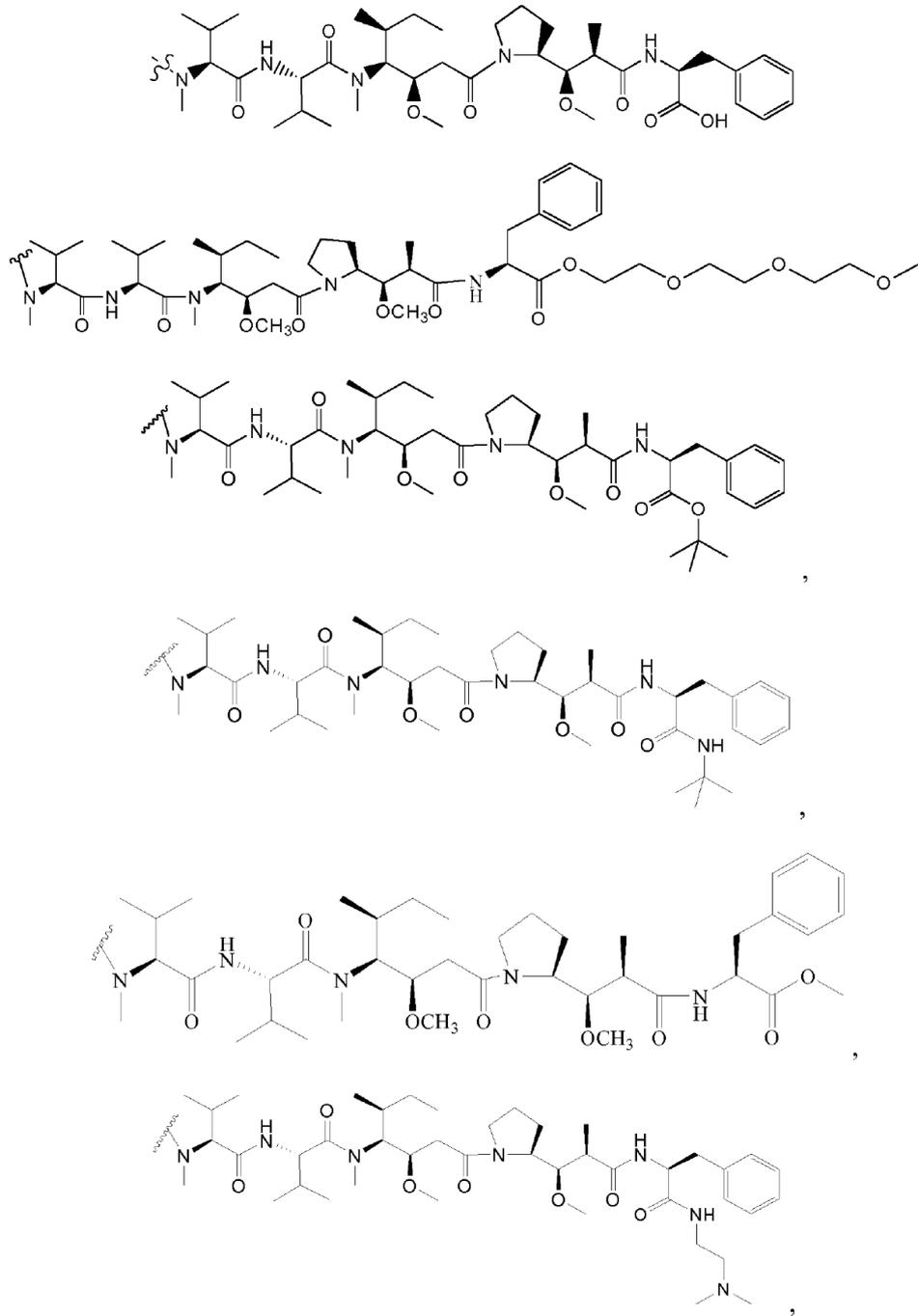
35 Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en las que cuando Z es -NH-, R^{11} es $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$, en donde R^{15} es $-(CH_2)_n-SO_3H$. El resto de los sustituyentes son como se define en este documento.

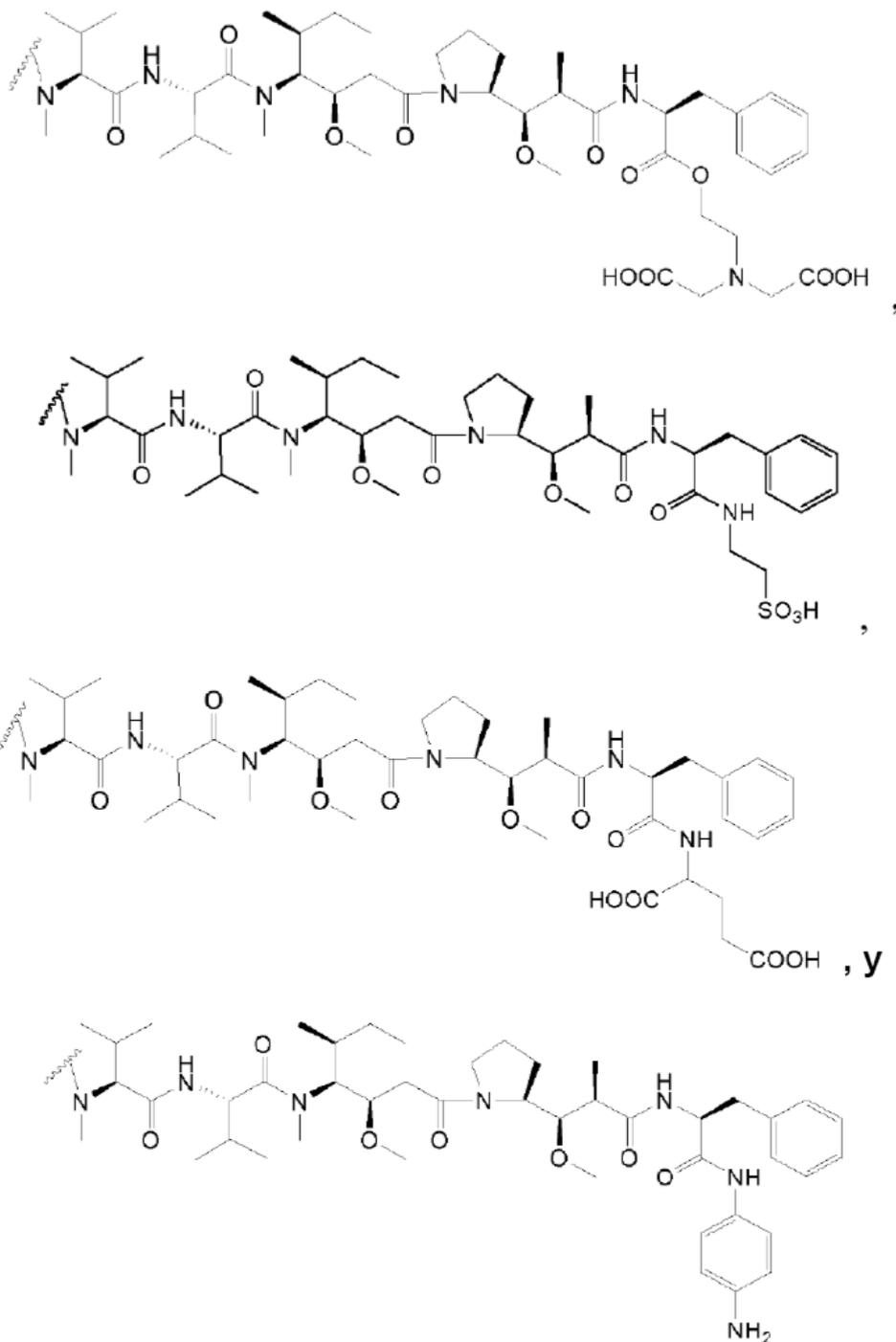
En realizaciones preferidas, cuando D es una auristatina de fórmula D_E , w es un número entero que varía de 1 a 12, preferiblemente de 2 a 12, y es 1 ó 2, y a es preferiblemente 1.

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

40 Las unidades farmacéuticas ilustrativas (-D) incluyen las unidades farmacéuticas que tienen las siguientes estructuras:





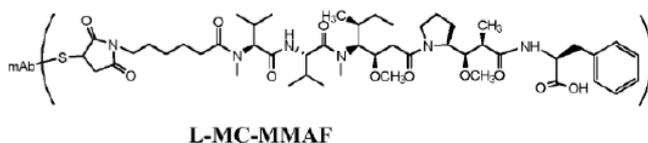
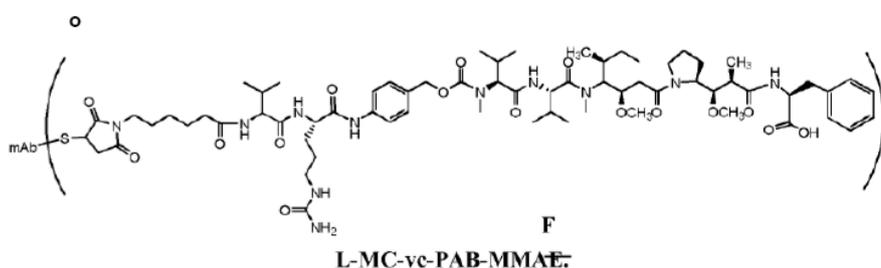
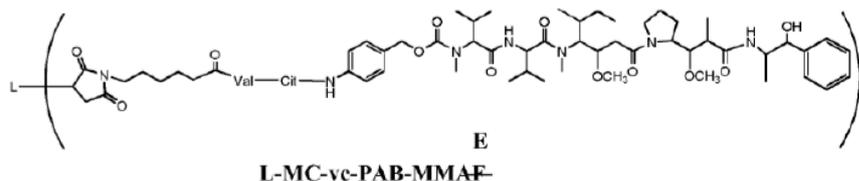
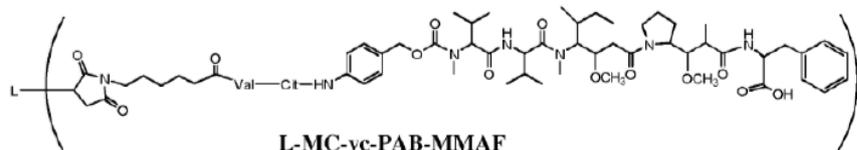


o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En un aspecto, se pueden unir grupos hidrófilos, tales como, pero sin limitación, ésteres de trietilenglicol (TEG) a la unidad farmacéutica a R¹¹. Sin estar sujetos a la teoría, los grupos hidrófilos ayudan a la internalización y a la no aglomeración de la unidad farmacéutica.

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

Los ejemplos de compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco tienen las siguientes estructuras en las que "L" o "mAb-s-" representa un MAb 191P4D12 designado Ha22-2(2,4)6.1 expuesto en este documento:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

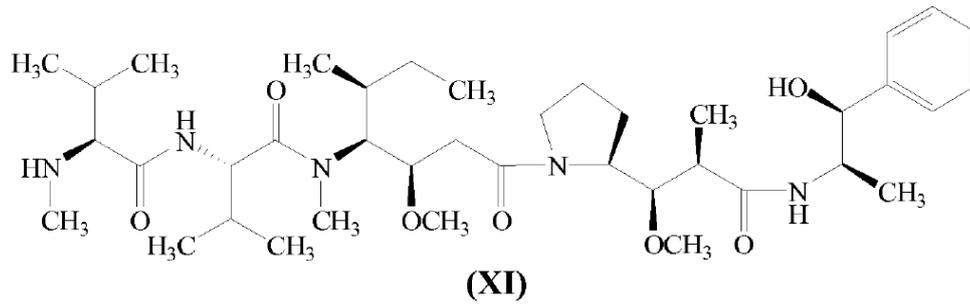
5 En algunas realizaciones, la unidad farmacéutica es una caliqueamicina, camptotecina, un maitansinoide o una antraciclina. En algunas realizaciones, el fármaco es un taxano, un inhibidor de topoisomerasa, un alcaloide de vinca o similar.

10 En algunas realizaciones típicas, los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, aglutinantes de surcos minoritarios de ADN (por ejemplo, enediinas y lexitropsinas, un compuesto de CBI, véase también la Patente de Estados Unidos N° 6.130.237), duocarmicinas, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), puromicinas y alcaloides de la vinca. Otros agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, CC-1065, SN-38, topotecan, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, equinomocina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptofisina, cemadotina, maitansinoides, discodermolida, eleuterobina y mitoxantrona.

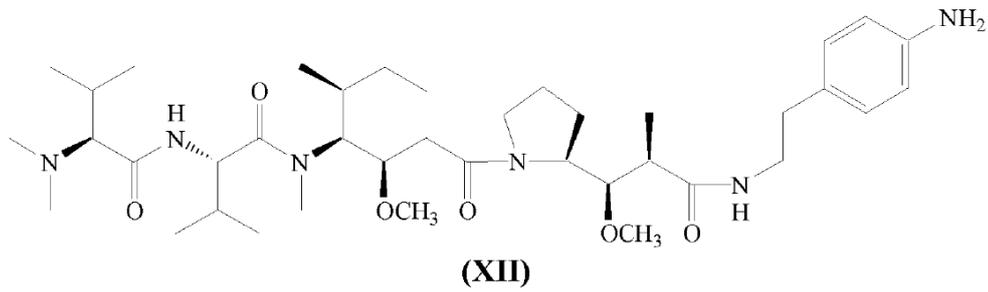
15 En algunas realizaciones, el fármaco es un agente anti-tubulina. Los ejemplos de agentes anti-tubulina incluyen, auristatinas, taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik) y alquiloideos de vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina). Otros agentes antitubulínicos incluyen, por ejemplo, derivados de bacatina, análogos de taxanos (por ejemplo, epotilona A y B), nocodazol, colquicina y colcímido, estramustina, criptoficinas, cemadotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermolida y eleuterobina.

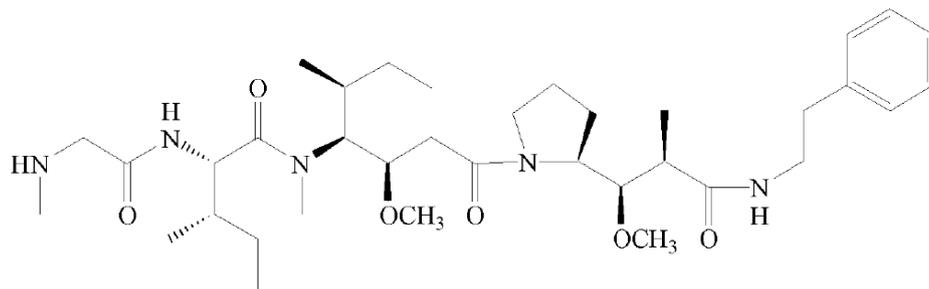
En ciertas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes anti-tubulina. Por ejemplo, en realizaciones específicas, el maitansinoide es maitansina o DM-1 (ImmunoGen, Inc., ver también Chari et al., 1992, Cancer Res. 52:127-131).

20 En ciertas realizaciones, el agente citotóxico o citostático es una dolastatina. En ciertas realizaciones, el agente citotóxico o citostático es de la clase auristatina. Por lo tanto, 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).

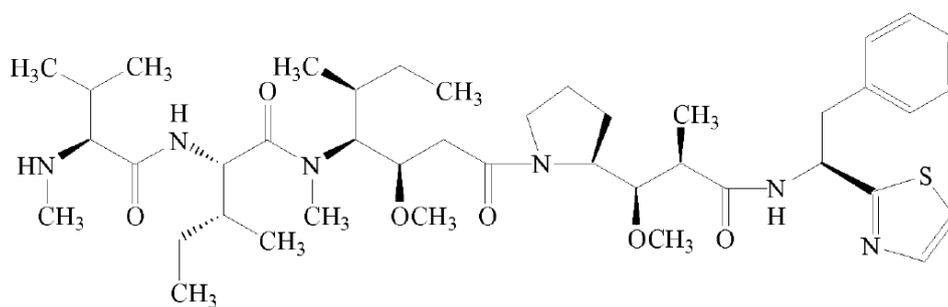


En ciertas realizaciones, el agente citotóxico o citostático es un compuesto de fórmulas XII-XXI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

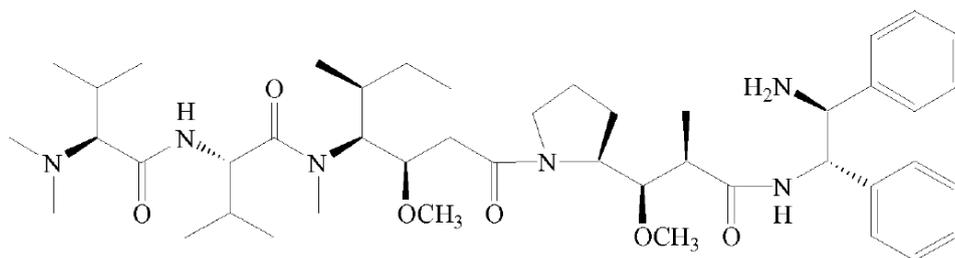




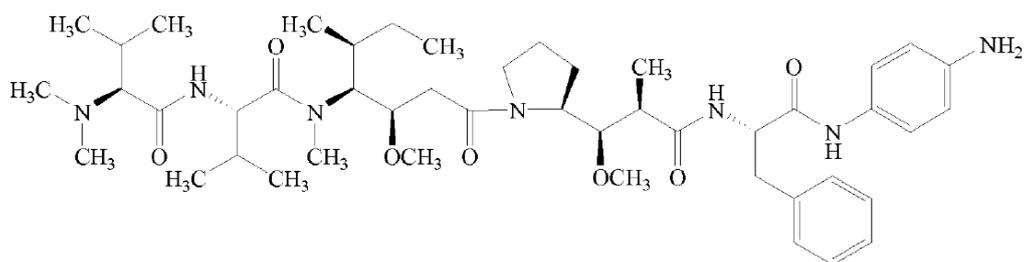
(XIII)



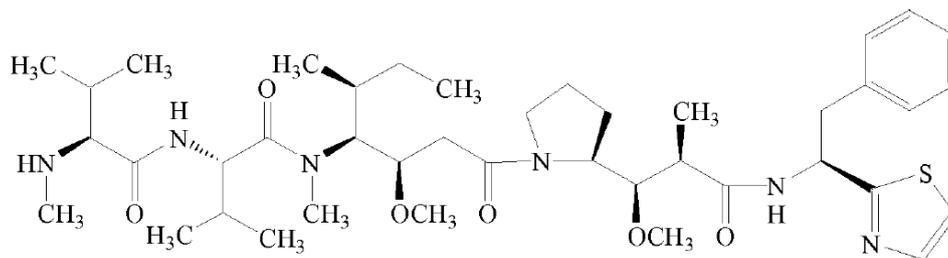
(XIV)



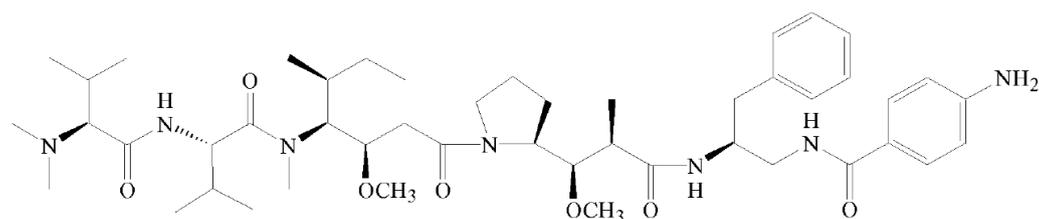
(XV)



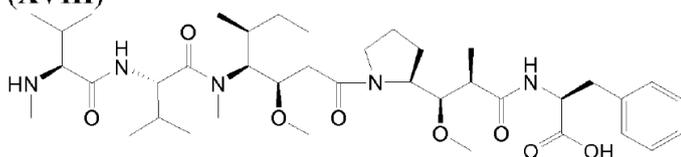
(XVI)



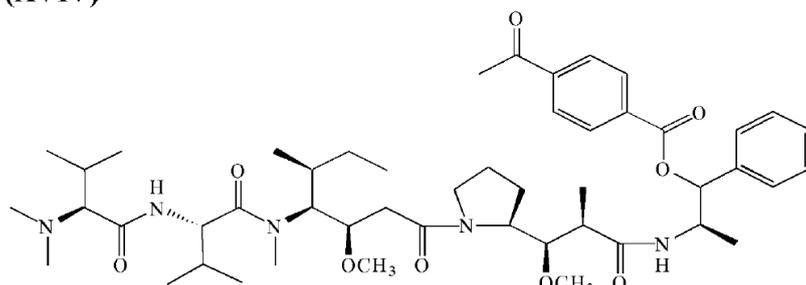
(XVII)



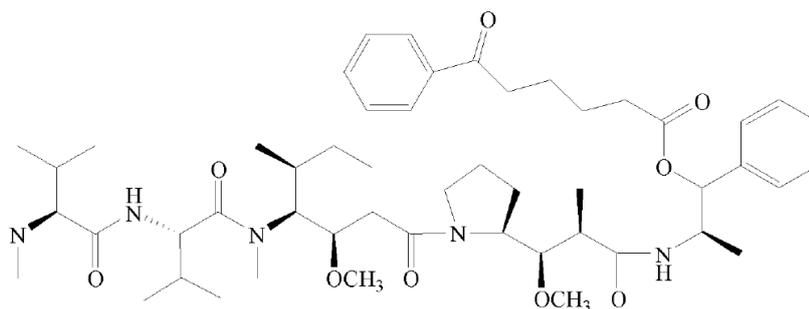
(XVIII)



(XVIIII)



(XX)



(XXI)

X.) Carga farmacéutica

La carga farmacéutica está representada por p y es el número promedio de fracciones de fármaco por anticuerpo en una molécula. La carga farmacéutica puede variar de 1 a 20 restos de fármaco (D) por anticuerpo. Los CAF de la invención incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con un intervalo de restos de fármaco de 1 a 20. El número medio de fracciones de fármaco por anticuerpo en las preparaciones de CAF a partir de reacciones de conjugación se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectroscopia de masas y ensayo ELISA. La distribución cuantitativa de CAF en términos de p también puede determinarse. En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de CAF homogéneo donde p es un cierto valor de CAF con otras cargas farmacéuticas se puede lograr por medios tales como electroforesis.

Para algunos conjugados anticuerpo-fármaco, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión es una cisteína tiol, como en las realizaciones ejemplares anteriores, 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 se puede unir un enlazante. En ciertas realizaciones, una mayor carga farmacéutica, p. ej. $p > 5$, puede causar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de la permeabilidad celular de ciertos conjugados anticuerpo-fármaco. En ciertas realizaciones, la carga farmacéutica para un CAF de la invención varía 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. De hecho, se ha demostrado que para ciertos CAFs, la relación óptima de restos de fármaco por anticuerpo puede ser menor que 8, y puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 5. Ver la patente de los EE. UU. No. 7.498.298 (incorporada en este documento como referencia en su totalidad).

En ciertas realizaciones, menos del máximo teórico de fracciones de fármaco se conjugan con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, residuos de lisina que no reaccionan con el intermedio de fármaco-enlazante o reactivo de enlazante, como se analiza a continuación. En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de cisteína libres y reactivos que pueden estar unidos a un resto de fármaco; de hecho, la mayoría de los residuos tiol de cisteína en anticuerpos existen como puentes disulfuro. En ciertas realizaciones, se puede reducir un anticuerpo con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o tricarbonyltilfosfina (TCEP), en condiciones de reducción parcial o total, para generar grupos tiol de cisteína reactivos. En ciertas realizaciones, se somete un anticuerpo a condiciones de desnaturalización para revelar grupos nucleofílicos reactivos tales como lisina o cisteína.

La carga (relación fármaco/anticuerpo) de un CAF puede controlarse de diferentes maneras, por ejemplo, mediante: (i) la limitación del exceso molar de fármaco-enlazante intermedio o reactivo enlazante en relación con el anticuerpo, (ii) la limitación del tiempo de reacción de conjugación o temperatura, (iii) condiciones reductoras parciales o limitantes para la modificación del tiol de cisteína, (iv) el diseño mediante técnicas recombinantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de modo que el número y la posición de residuos de cisteína se modifique para controlar el número y/o la posición de uniones de enlazante-fármaco (tales como tioMab o tioFab preparado como se describe en el presente documento y en el documento WO2006/034488 (incorporado en este documento como referencia en su totalidad)).

Debe entenderse que cuando más de un grupo nucleófilo reacciona con un intermedio de fármaco-enlazante o reactivo de enlazante seguido del reactivo del resto de fármaco, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos de CAF 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 doble de anticuerpos ELISA, que es específico para anticuerpos y específico para el fármaco. Las moléculas de CAF individuales pueden identificarse en la mezcla por espectroscopía de masas y separarse por HPLC, p. ej. 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 No. 624, Asociación Estadounidense para la Investigación del Cáncer, Reunión Anual 2004, Mar. 27-31, 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 No. 627, Asociación Estadounidense para la Investigación del Cáncer, Reunión Anual 2004, Mar. 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, marzo de 2004). En ciertas realizaciones, un CAF homogéneo con un único valor de carga se puede aislar de la mezcla de conjugación por electroforesis o cromatografía.

XI.) Métodos para determinar el efecto citotóxico de los CAFs

Se conocen métodos para determinar si un conjugado de fármaco o anticuerpo-fármaco ejerce un efecto citostático y/o citotóxico sobre una célula. En general, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado de anticuerpo y fármaco puede medirse por: la exposición de células de mamífero que expresan una proteína diana del conjugado de anticuerpo y fármaco en un medio de cultivo celular; el cultivo de las células durante un período de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 5 días; y la medición de la viabilidad celular. Los ensayos *in vitro* basados en células pueden usarse para medir la viabilidad (proliferación), la citotoxicidad y la inducción de la apoptosis (activación de caspasas) del conjugado anticuerpo-fármaco.

Para determinar si un conjugado de anticuerpo y fármaco ejerce un efecto citostático, se puede usar un ensayo de incorporación de timidina. Por ejemplo, las células cancerosas que expresan un antígeno diana a una densidad de 5.000 células/pocillo de un plaqueado de 96 pocillos pueden cultivarse durante un período de 72 horas y exponerse a 0,5 μ Ci de 3 H-timidina durante las últimas 8 horas del período de 72 horas. La incorporación de 3 H-timidina en las células del cultivo se mide en presencia y en ausencia del conjugado anticuerpo-fármaco.

Para determinar la citotoxicidad, puede medirse la necrosis o la apoptosis (muerte celular programada). La necrosis suele ir acompañada de una mayor permeabilidad de la membrana plasmática; hinchazón de la célula y ruptura de la membrana plasmática. La apoptosis se caracteriza típicamente por la formación de vesículas en la membrana, la condensación del citoplasma y la activación de endonucleasas endógenas. La determinación de cualquiera de estos efectos sobre las células cancerosas indica que un conjugado de anticuerpo y fármaco es útil en el tratamiento de cánceres.

La viabilidad celular puede medirse determinando en una célula la absorción de un colorante tal como rojo neutro, azul tripano o azul ALAMAR™ (véase, por ejemplo, Page et al., 1993, Intl. J. Oncology 3: 473-476). En tal ensayo, las células se incuban en medios que contienen el colorante, las células se lavan, y el colorante restante, que refleja la captación celular del colorante, se mide espectrofotométricamente. El colorante de unión a la proteína sulforrodamina B (SRB) también se puede usar para medir la citotoxicidad (Skehan et al., 1990, J. Natl. Inst. Cancer 82:1107-12).

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

La apoptosis se puede cuantificar midiendo, por ejemplo, la fragmentación del ADN. Se encuentran disponibles métodos fotométricos comerciales para la determinación cuantitativa in vitro de la fragmentación del ADN. Ejemplos de tales ensayos, que incluyen TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados en ADN fragmentado) y ensayos basados en ELISA, se describen en Biochemica, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

5 La apoptosis también se puede determinar midiendo los cambios morfológicos en una célula. Por ejemplo, como con la necrosis, la pérdida de la integridad de la membrana plasmática puede determinarse midiendo la absorción de ciertos colorantes (por ejemplo, un colorante fluorescente tal como, por ejemplo, naranja de acridina o bromuro de etidio). Un método para medir el número de células apoptóticas ha sido descrito por Duke y Cohen, Current Protocols in Immunology (Coligan et al., Eds., 1992, págs. 3.17.1-3.17.16). Las células también se pueden marcar con un colorante de ADN (por ejemplo, naranja de acridina, bromuro de etidio o yoduro de propidio) y las células observadas para la condensación de la cromatina y la marginación a lo largo de la membrana nuclear interna. Otros cambios morfológicos que se pueden medir para determinar la apoptosis incluyen, por ejemplo, condensación citoplásmica, aumento de la formación de vesículas en la membrana y contracción celular.

15 La presencia de células apoptóticas se puede medir tanto en los compartimientos adjuntos como "flotantes" de los cultivos. Por ejemplo, ambos compartimientos se pueden recoger eliminando el sobrenadante, tripsinizando las células unidas, combinando las preparaciones después de una etapa de lavado por centrifugación (por ejemplo, 10 minutos a 2000 rpm) y detectando la apoptosis (por ejemplo, midiendo la fragmentación de ADN). (Véase, por ejemplo, Piazza et al., 1995, Cancer Research 55: 3110 - 16).

20 In vivo, el efecto de una composición terapéutica de 191P4D12 se puede evaluar en un modelo animal adecuado. Por ejemplo, pueden usarse modelos de cáncer xenogénico, en los que explantes de cáncer o tejidos de xenoinjerto pasados se introducen en animales inmunodeprimidos, tales como ratones desnudos o SCID (Klein et al., 1997, Nature Medicine 3: 402-408). Por ejemplo, la Solicitud de Patente PCT WO98/16628 y la Pat. U.S. N° 6.107.540 describen diversos modelos de xenoinjertos 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 estadio tardío. La eficacia puede predecirse usando ensayos que miden la inhibición de la formación de tumores, la regresión del tumor o la metástasis, y similares.

25 Los ensayos in vivo que evalúan la promoción de la apoptosis son útiles para evaluar composiciones terapéuticas. En una realización, los xenoinjertos de ratones portadores de tumores tratados con la composición terapéutica pueden examinarse para determinar la presencia de focos apoptóticos y comparar con ratones portadores de xenoinjertos de 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.

30 Las composiciones terapéuticas usadas en la práctica de los métodos anteriores se pueden formular 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, retiene la función antitumoral de la composición terapéutica y generalmente no es reactivo con el sistema inmune del paciente. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, cualquiera de varios portadores farmacéuticos estándar tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato estériles, agua bacteriostática y similares (véase, en general, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición, A. Osal., Ed., 1980).

35 Las formulaciones terapéuticas se pueden solubilizar y administrar a través de cualquier ruta capaz de administrar la composición terapéutica al sitio del tumor. Las vías de administración potencialmente efectivas incluyen, pero sin limitación, intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intraorgánica, ortotópica y similares. Una formulación preferida para la inyección intravenosa comprende la composición terapéutica en una solución de agua bacteriostática conservada, agua no conservada estéril, y/o diluida en bolsas de polivinilcloruro o polietileno que contienen 0,9% de cloruro sódico estéril para inyección, USP. Las preparaciones de proteínas terapéuticas pueden liofilizarse y almacenarse como polvos estériles, preferiblemente al vacío, y luego reconstituirse en agua bacteriostática (que contiene, por ejemplo, conservante de alcohol bencílico) o en agua estéril antes de la inyección.

40 Las dosis y los protocolos de administración para el tratamiento de cánceres usando los métodos anteriores variarán con el método y el cáncer diana, y generalmente dependerán de una serie de otros factores apreciados en la técnica.

XII.) Tratamiento del cáncer o de los cánceres que expresan 191P4D12

La identificación de 191P4D12 como una proteína que normalmente se expresa en un conjunto restringido de tejidos, pero que también se expresa en cánceres tales como los enumerados en la Tabla I, abre una serie de enfoques terapéuticos para el tratamiento de tales cánceres.

55 Es de destacar que las terapias antitumorales dirigidas han sido útiles incluso cuando la proteína diana se expresa en tejidos normales, incluso en tejidos vitales de órganos normales. Un órgano vital es aquel que es necesario para mantener la vida, como el corazón o el colon. Un órgano no vital es aquel que puede eliminarse, con lo cual el individuo aún puede sobrevivir. Ejemplos de órganos no vitales son el ovario, el seno y la próstata.

La expresión de una proteína diana en tejido normal, incluso tejido normal vital, no elimina la utilidad de un agente diana para la proteína como 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 que se consideran prescindibles, como la próstata y el ovario, se pueden extirpar sin afectar la mortalidad. Finalmente, algunos órganos vitales no se ven afectados por la expresión normal del órgano debido a una inmunodepresión. Los órganos inmunodeprimidos son órganos que están protegidos de la sangre por una barrera órgano sanguínea y, por lo tanto, no son accesibles a la inmunoterapia. Ejemplos de órganos inmunodeprimidos son el cerebro y los testículos.

Por consiguiente, los enfoques terapéuticos que inhiben la actividad de una proteína 191P4D12 son útiles para pacientes que padecen un cáncer que expresa 191P4D12. Estos enfoques terapéuticos generalmente se dividen en tres clases. La primera clase modula la función de 191P4D12 ya que se relaciona con el crecimiento de células tumorales que conduce a la inhibición o el retraso del crecimiento de células tumorales o la inducción de su muerte. La segunda clase comprende diversos métodos para inhibir la unión o asociación de una proteína 191P4D12 con su pareja de unión o con otras proteínas. La tercera clase comprende una variedad de métodos para inhibir la transcripción de un gen 191P4D12 o la traducción de ARNm de 191P4D12.

Por consiguiente, los pacientes con cáncer pueden evaluarse para determinar la presencia y el nivel de expresión de 191P4D12, preferiblemente usando evaluaciones inmunohistoquímicas de tejido tumoral, imágenes cuantitativas de 191P4D12 u otras técnicas que indiquen de manera confiable la presencia y grado de expresión de 191P4D12. Se prefiere el análisis inmunohistoquímico de biopsias tumorales o muestras quirúrgicas para este propósito. Los métodos para el análisis inmunohistoquímico de los tejidos tumorales son bien conocidos en la técnica.

XIII.) 191P4D12 como un objetivo para la terapia basada en anticuerpos

191P4D12 es un objetivo atractivo para estrategias terapéuticas basadas en anticuerpos. Se conocen en la técnica varias estrategias de anticuerpos para dirigir moléculas tanto extracelulares como intracelulares (véase, por ejemplo, el complemento y la muerte mediada por ADCC, así como el uso de intracuerpos). Debido a que 191P4D12 se expresa mediante células cancerosas de diversos linajes en relación con las células normales correspondientes, se prepara la administración sistémica de composiciones inmunorreactivas de 191P4D12 que exhiben una sensibilidad excelente sin efectos tóxicos, no específicos y/o no diana causados por la unión de la composición inmunorreactiva a órganos y tejidos no diana. Los anticuerpos específicamente reactivos con dominios de 191P4D12 son útiles para tratar cánceres que expresan 191P4D12 sistémicamente, preferiblemente como conjugados de anticuerpo y fármaco (es decir, CAFs) donde el conjugado está con una toxina o agente terapéutico.

Los expertos en la técnica entienden que los anticuerpos pueden usarse para dirigirse específicamente y unirse a moléculas inmunogénicas tales como una región inmunogénica de una secuencia de 191P4D12 mostrada en la FIG. 1. Además, los expertos en la materia entienden que es rutinario conjugar anticuerpos con agentes citotóxicos (véase, por ejemplo, Slevers et al. Blood 93:11 3678-3684 (Jun. 1, 1999)). Cuando los agentes citotóxicos y/o terapéuticos se administran directamente a las células, como por medio de su conjugación con anticuerpos específicos para una molécula expresada por esa célula (p. ej. 191P4D12), el agente citotóxico ejercerá su efecto biológico conocido (es decir, la citotoxicidad) sobre esas células.

En la técnica se conocen una amplia variedad de composiciones y métodos para usar conjugados de anticuerpo y agente citotóxico para matar células. En el contexto de los cánceres, los métodos típicos implican administrar a un mamífero que tiene un tumor una cantidad biológicamente eficaz de un conjugado que comprende un agente citotóxico y/o terapéutico seleccionado unido a un agente diana (por ejemplo, un MAb 191P4D12, preferiblemente Ha22-2(2,4)6.1) que se une a un antígeno (p. ej. 191P4D12) expresado, accesible para unirse o localizarse en las superficies de las células. Una realización típica es un método para administrar un agente citotóxico y/o terapéutico a una célula que expresa 191P4D12, que comprende conjugar el agente citotóxico con un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un epítipo de 191P4D12 y exponer la célula al conjugado de anticuerpo y fármaco (CAF). Otra realización ilustrativa es un método para tratar a un individuo sospechoso de padecer cáncer metastásico, 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 con cáncer que usa anticuerpos 191P4D12 puede realizarse de acuerdo con diversos enfoques que se han empleado con éxito en el tratamiento de otros tipos de cáncer, que incluyen, pero sin limitación, 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). Algunos enfoques terapéuticos implican la conjugación de anticuerpos desnudos a una toxina o radioisótopo, como la conjugación de ⁹¹Y o ¹³¹I con anticuerpos anti-CD20 (p. ej., Zevalin™, IDEC Pharmaceuticals Corp. o Bexxar™ Coulter Pharmaceuticals) respectivamente, mientras que otros implican la coadministración de anticuerpos y otros agentes terapéuticos, tales como Herceptin™ (MAb de trastuzú) con paclitaxel (Genentech, Inc.). En una

realización preferida, los anticuerpos se conjugarán con un agente citotóxico, supra, preferiblemente un derivado de aurastatina designado MMAE (Seattle Genetics, Inc).

Aunque la terapia con anticuerpos 191P4D12 es útil para todas las etapas del cáncer, la terapia con anticuerpos puede ser particularmente apropiada en cánceres avanzados o metastásicos. El tratamiento con la terapia de anticuerpos de la invención está indicado para pacientes que han recibido una o más rondas de quimioterapia. Alternativamente, la terapia de anticuerpos de la invención se combina con un régimen quimioterapéutico o de radiación para pacientes que no han recibido tratamiento quimioterapéutico. Además, la terapia con anticuerpos puede permitir el uso de dosis reducidas de quimioterapia concomitante, particularmente para pacientes que no toleran muy bien la toxicidad del agente quimioterapéutico. Fan et al. (Cancer Res. 53:4637-4642, 1993), Prewett et al. (International J. of Onco. 9: 217 - 224, 1996), y Hancock et al. (Cancer Res. 51: 4575 - 4580, 1991) describen el uso de diversos anticuerpos junto con agentes quimioterapéuticos.

Los anticuerpos monoclonales 191P4D12 que tratan los cánceres expuestos en la Tabla I incluyen aquellos que inician una potente respuesta inmune contra el tumor o aquellos que son directamente citotóxicos. A este respecto, los anticuerpos monoclonales 191P4D12 (MAbs) pueden provocar lisis celular tumoral por mecanismos de citotoxicidad celular mediados por el complemento o dependientes de anticuerpos (ADCC), que requieren una porción Fc intacta de la molécula de inmunoglobulina para la interacción con sitios del receptor Fc de la célula efectora en las proteínas del complemento. Además, los MAb de 191P4D12 que ejercen un efecto biológico directo sobre el crecimiento tumoral son útiles para tratar cánceres que expresan 191P4D12. Los mecanismos por los cuales actúan directamente los MAbs citotóxicos incluyen: inhibición del crecimiento celular, modulación de la diferenciación celular, modulación de los perfiles del factor de angiogénesis tumoral e inducción de la apoptosis. El(los) mecanismo(s) por el(los) cual(es) un MAb de 191P4D12 particular ejerce un efecto antitumoral se evalúa usando cualquier cantidad de ensayos in vitro que evalúan la muerte celular tal como ADCC, lisis celular mediada por complemento, etc., como se conoce generalmente en la técnica.

Por consiguiente, los anticuerpos monoclonales preferidos usados en los métodos terapéuticos de acuerdo con la invención son aquellos que son completamente humanos y que se unen específicamente al antígeno 191P4D12 objetivo con alta afinidad.

XIV.) Cócteles CAF 191P4D12

Los conjugados de anticuerpo y fármaco y la composición farmacéutica de la invención para usar en los métodos terapéuticos contemplan la administración de CAF de 191P4D12 individuales, así como combinaciones o cócteles de diferentes MAbs (es decir, MAbs de 191P4D12 o Mabs que se unen a otra proteína). Dichos cócteles de MAb pueden tener ciertas ventajas en la medida en que contienen MAb que se dirigen a diferentes epítomos, explotan diferentes mecanismos efectores o combinan MAbs directamente citotóxicos con MAb que dependen de la funcionalidad del efector inmune. Dichos MAbs en combinación pueden exhibir efectos terapéuticos sinérgicos. Además, los MAb de 191P4D12 pueden administrarse de forma concomitante con otras modalidades terapéuticas, que incluyen, pero sin limitación, diversos agentes quimioterapéuticos y biológicos, bloqueadores de andrógenos, moduladores inmunes (por ejemplo, IL-2, GM-CSF), cirugía o radiación. En una realización preferida, los MAb de 191P4D12 se administran en forma conjugada.

Las formulaciones de CAF 191P4D12 se administran a través de cualquier ruta capaz de administrar los anticuerpos a una célula tumoral. Las rutas de administración incluyen, pero sin limitación, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica y similares. El tratamiento generalmente implica la administración repetida de la preparación de CAF 191P4D12, a través de una vía de administración aceptable, como la inyección intravenosa (IV), típicamente en una dosis dentro del intervalo, que incluye, pero sin limitación, 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 ó 25 mg/kg de peso corporal. En general, las dosis en el intervalo de 10-1000 mg MAb por semana son efectivas y bien toleradas.

En base a la experiencia clínica con Herceptin® (Trastuzumab) en el tratamiento del cáncer de mama metastásico, una dosis inicial de carga de aproximadamente 4 mg/kg de peso corporal del paciente IV, seguida de dosis semanales de aproximadamente 2 mg/kg IV de la preparación de MAb representa un régimen de dosificación aceptable. Preferiblemente, la dosis de carga inicial se administra como una infusión de 90 minutos o más. La dosis de mantenimiento periódico se administra como una infusión de 30 minutos o más, siempre que la dosis inicial haya sido bien tolerada. Como apreciarán los expertos en la técnica, diversos factores pueden influir en el régimen de dosis ideal en un caso particular. Dichos factores incluyen, por ejemplo, la afinidad de unión y la semivida de los MAb utilizados, el grado de expresión de 191P4D12 en el paciente, la cantidad de antígeno 191P4D12 vertido circulante, el nivel de concentración de anticuerpo en estado estacionario deseado, la frecuencia de tratamiento y la influencia de agentes quimioterapéuticos u otros agentes usados en combinación con el método de tratamiento de la invención, así como el estado de salud del paciente en particular.

Opcionalmente, los pacientes deben evaluarse para detectar los niveles de 191P4D12 en una muestra dada (por ejemplo, los niveles de antígeno 191P4D12 circulante y/o células que expresan 191P4D12) para ayudar en la determinación del régimen de dosificación más eficaz, etc. Dichas evaluaciones también se usan con propósitos de monitoreo durante la terapia y son útiles para medir el éxito terapéutico en combinación con la evaluación de otros

parámetros (por ejemplo, citología de orina y/o niveles de ImmunoCyt en terapia del cáncer de vejiga, o por analogía, niveles séricos de PSA en la terapia del cáncer de próstata).

5 Un objeto de la presente invención es proporcionar CAF 191P4D12, que inhiben o retardan el crecimiento de células tumorales que expresan 191P4D12. Un objeto adicional de esta invención es proporcionar métodos para inhibir la angiogénesis y otras funciones biológicas y reducir de ese modo el crecimiento tumoral en mamíferos, preferiblemente humanos, usando tales CAF 191P4D12 y, en particular, usando tales CAF 191P4D12 combinados con otros fármacos o tratamientos inmunológicamente activos.

XV.) Terapia de combinación

10 En una realización, existe sinergia cuando los tumores, que incluyen tumores humanos, se tratan con CAF 191P4D12 junto con agentes quimioterapéuticos o radiación o combinaciones de los mismos. En otras palabras, la inhibición del crecimiento tumoral por un CAF de 191P4D12 mejora más de lo esperado cuando se combina con agentes quimioterapéuticos o radiación o combinaciones de los mismos. La sinergia se puede mostrar, por ejemplo, mediante una mayor inhibición del crecimiento tumoral con el tratamiento combinado de lo que se esperaría de un tratamiento de solo CAF 191P4D12 o el efecto aditivo del tratamiento con un CAF 191P4D12 y un agente quimioterapéutico o de radiación. Preferiblemente, la sinergia se demuestra mediante la remisión del cáncer en el que no se espera la remisión desde el tratamiento de un CAF de 191P4D12 o con el tratamiento usando una combinación aditiva de un CAF de 191P4D12 y un agente quimioterapéutico o de radiación.

20 El método para inhibir el crecimiento de células tumorales usando un CAF 191P4D12 y una combinación de quimioterapia o radiación o ambos comprende administrar el CAF 191P4D12 antes, durante o después de comenzar la quimioterapia o radioterapia, así como cualquier combinación de los mismos (es decir, antes y durante, antes y después, durante y después, o antes, durante y después de comenzar la quimioterapia y/o la radioterapia). Por ejemplo, el CAF 191P4D12 se administra típicamente entre 1 y 60 días, preferiblemente entre 3 y 40 días, más preferiblemente entre 5 y 12 días antes de comenzar la radioterapia y/o la quimioterapia. Sin embargo, dependiendo del protocolo de tratamiento y las necesidades específicas del paciente, el método se realiza de una manera que proporcionará el tratamiento más eficaz y, en última instancia, prolongará la vida del paciente.

30 La administración de agentes quimioterapéuticos se puede llevar a cabo de varias maneras, incluyendo, sistémicamente, mediante las vías enteral y parenteral. En una realización, los CAFs 191P4D12 y el agente quimioterapéutico se administran como moléculas separadas. Ejemplos particulares de agentes quimioterapéuticos o de quimioterapia incluyen cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptozocina, ciclofosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina), daunorubicina, procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo, vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleucina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cladribina, dacarbazina, floxuridina, fludarabina, hidroxiaurea, ifosfamida, interferón alfa, leuprolida, megestrol, melfalán, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, plicamicina, estreptozocina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, gemcitabina, clorambucilo, taxol y combinaciones de los mismos.

40 La fuente de radiación, utilizada en combinación con un CAF 191P4D12, puede ser externa o interna para el paciente que se está tratando. Cuando la fuente es externa al paciente, la terapia se conoce como radioterapia de haz externo (EBRT). Cuando la fuente de radiación es interna para el paciente, el tratamiento se llama braquiterapia (BT).

45 Los regímenes terapéuticos descritos anteriormente pueden combinarse adicionalmente con agentes y/o regímenes adicionales de tratamiento del cáncer, por ejemplo, quimioterapia adicional, vacunas contra el cáncer, inhibidores de la señal de transducción, agentes útiles para tratar el crecimiento anormal de células o cáncer, anticuerpos (p. ej., anticuerpos anti-CTLA-4 como se describe en el documento WO/2005/092380 (Pfizer)) u otros ligandos que inhiben el crecimiento tumoral uniéndose a IGF-1R y citoquinas.

50 Cuando el mamífero se somete a quimioterapia adicional, se pueden usar los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente. Además, se pueden usar inhibidores del factor de crecimiento, modificadores de la respuesta biológica, terapia antihormonal, moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), inhibidores de la angiogénesis y antiandrógenos. Por ejemplo, pueden usarse anti-hormonas, por ejemplo, anti-estrógenos tales como Nolvadex (tamoxifeno) o, anti-andrógenos tales como Casodex (4'-ciano-3-(4-fluorofenilsulfonil)-2-hidroxi-2-metil-3-(trifluorometil)propionanilida).

55 Los enfoques terapéuticos anteriores se pueden combinar con cualquiera de una amplia variedad de regímenes quirúrgicos, de quimioterapia o radioterapia. Los enfoques terapéuticos de la invención pueden permitir el uso de dosis reducidas de quimioterapia (u otras terapias) y/o una administración menos frecuente, una ventaja para todos los pacientes y particularmente para aquellos que no toleran bien la toxicidad del agente quimioterapéutico.

XVI.) Kits/Artículos de manufactura

Para uso en las aplicaciones de laboratorio, de pronóstico, profilácticas, diagnósticas y terapéuticas descritas en este documento, los kits están dentro del alcance de la invención. Dichos kits pueden comprender un envase, paquete o recipiente que está compartimentado para alojar uno o más recipientes tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de los recipientes uno de los elementos separados para ser usados en el método, junto con un marcador o inserto que comprende instrucciones de uso, tal como un uso descrito en este documento. Por ejemplo, el/los recipiente(s) puede(n) comprender un anticuerpo que es o puede estar marcado detectablemente. Los kits pueden comprender un recipiente que comprende una unidad farmacéutica. El kit puede incluir la totalidad o parte de las secuencias de aminoácidos en la FIG. 2, o la FIG. 3 o análogos de los mismos, o una molécula de ácido nucleico que codifica tales secuencias de aminoácidos.

El kit de la invención comprenderá típicamente el recipiente descrito anteriormente y uno o más de otros recipientes asociados con el mismo que comprenden materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, que incluyen tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas; vehículos, paquetes, recipientes, etiquetas de viales y/o tubos que enumeran los contenidos y/o las instrucciones de uso, y los prospectos con instrucciones de uso.

Un marcador puede estar presente en el recipiente o con éste para indicar que la composición se utiliza para una terapia específica o aplicación no terapéutica, como una aplicación de pronóstico, profiláctica, diagnóstica o de laboratorio, y también puede indicar instrucciones para su uso in vivo o in vitro, tal como los descritos en este documento. Las instrucciones u otra información también se pueden incluir en uno o varios prospectos o etiquetas que se incluyen dentro del kit o junto a éste. La etiqueta puede estar sobre el recipiente o asociada a éste. Se puede conseguir una etiqueta en un recipiente modelando o grabando las letras, los números u otros caracteres que forman la etiqueta en el propio recipiente; una etiqueta puede adjuntarse a un recipiente cuando está presente dentro de un receptáculo o soporte que también sostiene el recipiente, por ejemplo, como un prospecto del paquete. La etiqueta puede indicar que la composición se usa para diagnosticar, tratar, prevenir o pronosticar una afección, tal como un cáncer de un tejido expuesto en la Tabla I.

Los términos "kit" y "artículo de fabricación" se pueden usar como sinónimos.

En otra realización de la invención, se proporcionan el artículo o artículos de fabricación que contiene composiciones, tales como anticuerpo(s), o conjugados de anticuerpo y fármaco (CAF), por ejemplo, materiales útiles para el diagnóstico, pronóstico, profilaxis y/o tratamiento de cánceres de tejidos tales como los expuestos en la Tabla I. El artículo de fabricación comprende típicamente al menos un recipiente y al menos un marcador. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales tales como vidrio, metal o plástico. El recipiente puede contener secuencias de aminoácidos, moléculas pequeñas, secuencias de ácidos nucleicos, poblaciones de células y/o anticuerpos. En otra realización, un recipiente comprende un anticuerpo, fragmento de unión del mismo o proteína de unión específica para usar en la evaluación de la expresión de proteína de 191P4D12 en células y tejidos, o para fines relevantes de laboratorio, pronóstico, diagnóstico, profilácticos y terapéuticos; las indicaciones y/o directrices para tales usos se pueden incluir en dicho recipiente o con éste, al igual que los reactivos y otras composiciones o herramientas utilizadas para estos fines.

El recipiente puede contener alternativamente una composición que sea eficaz para tratar, diagnosticar, pronosticar o prevenir una afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de una solución intravenosa o un vial con un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Los agentes activos en la composición pueden ser un anticuerpo capaz de unirse específicamente a 191P4D12 o un conjugado de anticuerpo y fármaco que se una específicamente a 191P4D12.

El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y/o solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agitadores, agujas, jeringas y/o prospectos con indicaciones y/o instrucciones de uso.

Ejemplos

Diversos aspectos de la invención se describen e ilustran adicionalmente por medio de los diversos ejemplos que siguen, ninguno de los cuales pretende limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

El antígeno 191P4D12

La secuencia del gen 191P4D12 se descubrió usando métodos de Hibridación Sustractiva por Supresión (SSH) conocidos en la técnica. La secuencia 191P4D12 SSH de 223 bp fue identificada a partir de ADNc de sentido negativo de un tumor de vejiga derivado de un conjunto de nueve (9) tejidos normales utilizando métodos estándar. Se aisló un clon de ADNc de longitud completa para 191P4D12 de una biblioteca de ADNc de cáncer de vejiga. El ADNc tiene una longitud de 3464 bp y codifica un ORF de 510 aminoácidos (véase la figura 1). El gen 191P4D12 muestra homología con el gen Nectin-4. Para una referencia adicional ver, el documento US2004/0083497

(Agensys, Inc., Santa Monica, CA) y la Publicación PCT WO2004/016799 (Agensys, Inc., Santa Monica, CA). Para realizaciones ejemplares del antígeno 191P4D12, véase la FIG. 1.

Ejemplo 2

Generación de anticuerpos monoclonales 191P4D12 (MAbs)

5 En una realización, los Anticuerpos Monoclonales terapéuticos ("MAB") frente a las variantes 191P4D12 y 191P4D12 comprenden aquellos que reaccionan con epítomos específicos para cada proteína o que son específicos a secuencias en común entre las variantes que unirían, internalizarían, interrumpirían o modularían la función biológica de las variantes 191P4D12 o 191P4D12, por ejemplo, aquellas que interrumpirían la interacción con ligandos, sustratos y parejas de unión. Los inmunógenos para la generación de tales MAbs incluyen aquellos diseñados para
10 codificar o contener los dominios extracelulares o la secuencia de proteína 191P4D12 completa, regiones que se predice que contienen motivos funcionales, y regiones de las variantes de proteína 191P4D12 predichas como antigénicas del análisis por computadora de la secuencia de aminoácidos. Los inmunógenos incluyen péptidos y proteínas recombinantes tales como tag5-191P4D12, una proteína marcada con His derivada de una célula de mamífero purificada. Además, las células diseñadas para expresar altos niveles de 191P4D12, como RAT1-191P4D12 ó 300.19-191P4D12, se usan para inmunizar ratones.

Se generaron MAbs para 191P4D12 usando XenoMouse technology® (Amgem Fremont) en donde los loci de la cadena ligera kappa y pesada murina se han inactivado y se han insertado la mayoría de los loci de inmunoglobulina de la cadena ligera kappa y pesada humana. El MAb designado como Ha22-2(2,4)6.1 se generó a partir de la inmunización de γ 1 humano que produce XenoMice con pTag5/mychis-191P4D12 (aminoácidos 23-351).

20 El MAb Ha22-2(2,4)6.1 de 191P4D12 se une específicamente a la proteína pTag5/mychis-191P4D12 por ELISA, así como a las células que expresan 191P4D12 recombinante y a las líneas celulares de cáncer múltiples que expresan 191P4D12.

El hibridoma que produce un anticuerpo designado como Ha22-2(2,4)6.1 se envió (a través de Federal Express) a la American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, Va. 20108 el 18 de agosto de 2010 y número de acceso asignado PTA-11267.

Se determinaron secuencias codificantes de ADN para MAb Ha22-2(2,4)6.1 de 191P4D12 después de aislar el ARNm de las células de hibridoma respectivas con reactivo Trizol (Life Technologies, Gibco BRL).

Se secuenciaron secuencias de ácidos nucleicos variables de cadena pesada y ligera anti-191P4D12 Ha22-2(2,4)6.1 a partir de las células de hibridoma utilizando el siguiente protocolo. Se lisaron células secretoras de hibridoma Ha22-2 (2,4)6.1 con reactivo Trizol (Life Technologies, Gibco BRL). El ARN total fue purificado y cuantificado. Los ADNc de la primera cadena se generaron a partir del ARN total con cebado de oligo (dT)12-18 usando el sistema Gibco-BRL Superscript Preamplification. El ADNc de la primera hebra se amplificó usando 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 las regiones variables de cadena pesada y ligera se determinaron.

Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de las regiones de cadena pesada y ligera variables se enumeran en la FIG. 2 y FIG. 3. La alineación del mAb Ha22-2(2,4)6.1 con la línea germinal de Ig humana se expone en la FIG. 4A-4B.

Ejemplo 3

40 Expresión de Ha22-2(2,4)6.1 usando métodos de ADN recombinante

Para expresar Ha22-2(2,4)6.1 MAb de manera recombinante en células transfectadas, las secuencias Ha22-2(2,4)6.1 MAb de cadena pesada y ligera variables se clonaron cadena arriba de las regiones constantes de IgG1 de cadena pesada humana y Igk de cadena ligera humana, respectivamente. Se clonaron los casetes completos de cadenas pesadas y cadenas ligeras humanas de MAb Ha22-2(2,4)6.1 cadena abajo del promotor/potenciador de CMV en un vector de clonación. Se incluyó un sitio de poliadenilación cadena abajo de la secuencia de codificación MAb. Las construcciones de expresión de MAb recombinante Ha22-2(2,4)6.1 se transfectaron en células CHO. El MAb Ha22-2(2,4)6.1 secretado a partir de células recombinantes se evaluó para la unión a la superficie celular de 191P4D12 por citometría de flujo (Figura 5A). Las células RAT-control y RAT-191P4D12 se tiñeron con mAb Ha22-2(2,4)6.1 de cualquier hibridoma o de células CHO transfectadas con constructos de vector de cadena pesada y ligera Ha22-2(2,4)6.1. La unión se detectó mediante citometría de flujo.

Los resultados muestran que el Ha22-2(2,4)6.1 expresado de forma recombinante expresado en células CHO se une a 191P4D12 de forma similar al Ha22-2(2,4)6.1 purificado a partir de hibridoma. El MAb Ha22-2(2,4)6.1 secretado a partir de células recombinantes también se evaluó para determinar la unión a la proteína recombinante 191P4D12 mediante ELISA. Como se muestra en la FIG. 5B, la unión de Ha22-2(2,4)6.1 a la proteína 191P4D12 fue idéntica entre el material MAb derivado de CHO y de las células de hibridoma.

Ejemplo 4

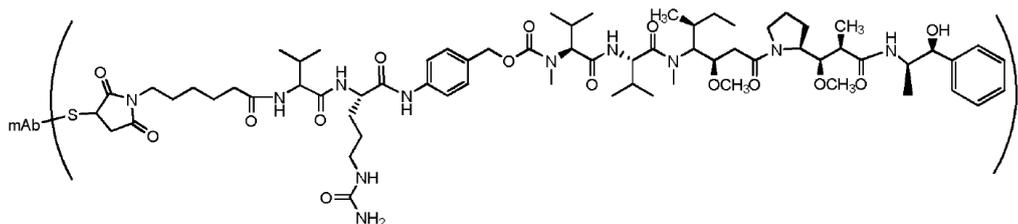
Conjugación de fármaco y anticuerpo de Ha22-2(2,4)6.1 MAb

El Ha22-2(2,4)6.1 Mab (Figura 2) se conjugó con un derivado de auristatina designado MMAE (Fórmula XI) usando un enlazante vc (Val-Cit) descrito en la presente para crear el conjugado de anticuerpo y fármaco (CAF) de la invención designada Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE usando los siguientes protocolos. La conjugación del enlazante vc (Val-Cit) al MMAE (Seattle Genetics, Inc., Seattle, WA) se completó usando el método general expuesto en la Tabla IV para crear el vcMMAE citotóxico (véase la Patente de Estados Unidos N°. 7.659.241).

A continuación, el conjugado de anticuerpo y fármaco (CAF) de la invención designado Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE se realizó usando los siguientes protocolos.

Brevemente, se agrega una solución de 15 mg/ml de Ha22-2(2,4)6.1Mab en acetato 10 mM a pH 5,0, 1% de sorbitol, 3% de L-arginina con un 20% de volumen de TrisCl 0,1 M a pH 8,4, EDTA 25 mM y NaCl 750 mM para ajustar el pH de la solución a 7,5, EDTA 5 mM y cloruro sódico 150 mM. A continuación, el Mab se reduce parcialmente añadiendo 2,3 equivalentes molares de TCEP (con relación a moles de Mab) y luego se agita a 37°C durante 2 horas. La solución Mab parcialmente reducida se enfría después a 5°C y se añaden 4,4 equivalentes molares de vcMMAE (con respecto a los moles de anticuerpo) como una solución al 6% (v/v) de DMSO. La mezcla se agita durante 60 minutos a 5°C, luego durante 15 minutos adicionales después de la adición de 1 equivalente molar de N-acetilcisteína con respecto a vcMMAE. El exceso de vcMMAE inactivado y otros componentes de la reacción se eliminan mediante ultrafiltración/diafiltración del conjugado de anticuerpo y fármaco (CAF) con 10 volúmenes de histidina 20 mM, pH 6,0.

El conjugado de fármaco y anticuerpo resultante (CAF) se denomina Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE y tiene la siguiente fórmula:



en donde Mab es Ha22-2(2,4)6.1 (Figura 2 y Figura 3) y p es de 1 a 8. El valor de p del conjugado de fármaco y anticuerpo expuesto en este ejemplo fue aproximadamente 3,8.

Ejemplo 5

Caracterización de Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE

Los conjugados de fármaco y anticuerpo que se unen a 191P4D12 se generaron usando los procedimientos expuestos en el ejemplo titulado "Conjugación de fármaco y anticuerpo de Mab Ha22-2(2,4)6.1" y se rastrearon, identificaron y caracterizaron usando una combinación de ensayos conocidos en la técnica.

A. Determinación de la afinidad por FACS

Se evaluó Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE para determinar su afinidad de unión a 191P4D12 expresado en la superficie de las células PC3-humana-191P4D12, PC3-macaco rhesus-191P4D12 y PC3-rata-191P4D12, respectivamente. Brevemente, se incubaron once (11) diluciones de Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE con cada uno de los tipos de células (50.000 células por pocillo) durante la noche a 4°C a una concentración final de 160 nM a 0,011 nM. Al final de la incubación, las células se lavaron e 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. Los valores medios de intensidad de fluorescencia (MFI) se obtuvieron como se detalla en las Figs. 6-8. Los valores de MFI se introdujeron en el software Graphpad Prism y se analizaron usando la ecuación de unión de un sitio (hipérbola) de $Y = B_{max} * X / (K_d + X)$ para generar curvas de saturación de Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE mostradas también en las FIGS. 6-8 respectivamente. B_{max} es el valor de IMF en la unión máxima de Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE a 191P4D12; K_d es la afinidad de unión Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE que es la concentración de Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE requerida para alcanzar la mitad de la unión máxima.

La afinidad calculada (K_d) de Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE a 191P4D12 expresada en la superficie de las células PC3-humana-191P4D12, PC3-macaco rhesus-191P4D12 y PC3-rata-191P4D12, respectivamente, es de 0,69 nM (Fig. 6), 0,34 nM (figura 7) y 1,6 nM (figura 8).

B. Determinación de afinidad por SPR

La afinidad de Ha22-2(2,4)6.1 MAb y Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE a 191P4D12 recombinante purificado (ECD aminoácidos 1-348) se realizó mediante Resonancia de Plasmón Superficie (SPR) (BIAcore). Brevemente, los anticuerpos policlonales Fcy de cabra antihumano (Jackson Immuno Research Labs, Inc.) se inmovilizaron covalentemente en la superficie de un chip sensor CM5 (Biacore). A continuación, se capturaron Ha22-2(2,4)6.1 MAb o Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE purificados en la superficie de dicho chip. En promedio, se capturaron aproximadamente 300 RU de prueba Ha22-2(2,4)6.1 MAb o Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE en cada ciclo. Posteriormente, se inyectó una serie de cinco (5) a seis (6) diluciones de 191P4D12 recombinante (ECD aminoácidos 1-348) que variaban de 1 nM a 100 nM sobre dicha superficie para generar curvas de unión (sensogramas) que se procesaron y ajustaron globalmente a un modelo de interacción 1:1 usando el software BIAevaluation 3.2 y CLAMP (Myszka y Morton, 1998) (Figura 22). La Tabla V resume las constantes de velocidad de asociación y disociación, así como las afinidades de Ha22-2(2,4)6.1 MAb y Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE a 191P4D12 recombinante (ECD aminoácidos 1-348).

C. Asignación de dominios de Ha22-2(2,4)6.1 MAb

Para mapear el sitio de unión del mAb Ha22-2(2,4)6.1 a un dominio específico de la proteína 191P4D12, se generaron varias líneas celulares recombinantes Rat1 (E) que expresaban tales dominios (o una combinación de los mismos) (Tabla VI). La unión de Ha22-2(2,4)6.1 a la superficie celular se evaluó mediante FACS usando protocolos estándar. Como se muestra en la FIG. 10, Ha22-2(2,4)6.1 MAb se une a las células que expresan el dominio VC1, así como a 191P4D12 de tipo salvaje, pero no a las células que expresan el dominio C1C2. Adicionalmente, otro MAb 191P4D12 denominado Ha22-8e6.1 reconoce el dominio C1C2 de 191P4D12 en la superficie celular, pero no el dominio VC1. Esto sugiere que el sitio de unión para Ha22-2(2,4)6.1 MAb está localizado en el dominio 1-147 aa de 191P4D12, pero que no todos los MAb que se unen a 191P4D12 reconocen este dominio.

Para corroborar adicionalmente los resultados expuestos en la FIG. 10, se realizó un análisis de transferencia Western. Brevemente, toda la porción extracelular de 191P4D12 (longitud completa), así como los dominios específicos expuestos en la Tabla VI se expresaron en células 293T como proteínas de fusión Fc murinas y se purificaron. Se usaron anti-ratón-HRP de cabra como control. Como se muestra en la FIG. 11, cuando se resolvió en SDS-PAGE (no reducido) y se sondó con Ha22-2(2,4)6.1-biotina seguido de estreptavidina-HRP, se reconocieron las bandas correspondientes a 191P4D12 de longitud completa (carril 1), V (carril 2) y las construcciones de fusión de VC1 (carril 3), pero no se reconoció la construcción de fusión de C1C2 (carril 4). Esto sugiere además que el epítipo de unión para Ha22-2(2,4)6.1 MAb se encuentra dentro del dominio 1-147 aa de 191P4D12.

Ejemplo 6

30 Citotoxicidad celular mediada por Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE

La capacidad de Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE para mediar en la citotoxicidad dependiente de 191P4D12 se evaluó en células PC3 modificadas genéticamente para expresar 191P4D12 humano, 191P4D12 de macaco Rhesus y 191P4D12 de rata. Brevemente, se sembraron células PC3-Neo, PC3-humana-191P4D12, PC3-macaco Rhesus-191P4D12 o PC3-rata-191P4D12 (1500 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos el día 1. Al día siguiente, un volumen igual de medio que contenía la concentración indicada de Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE o un MAb de control conjugado con vcMMAE (es decir, control-vcMMAE) se añadió a cada pocillo. Las células se dejaron incubar durante 4 días a 37°C. Al final del período de incubación, se añadió Alamar Blue a cada pocillo y la incubación continuó durante 4 horas adicionales. La fluorescencia resultante se detectó utilizando un lector de placas Biotek con una longitud de onda de excitación de 620 nM y una longitud de onda de emisión de 540 nM.

Los resultados en las Figuras 9A-9D muestran que la citotoxicidad mediada por Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE en células PC3-humana-191P4D12 (Figura 9A), PC3-macaco Rhesus-191P4D12 (Figura 9B), y PC3-rata-191P4D12 (Fig. 9C) tuvo efecto mientras que una IgG humana de control conjugada con vcMMAE no la tuvo. La especificidad de Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE se demostró adicionalmente por la falta de toxicidad para las células PC3-Neo que no expresan 191P4D12 (Figura 9D). Por lo tanto, estos resultados indican que Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE puede administrar selectivamente un fármaco citotóxico a las células que expresan 191P4D12 que conducen a su destrucción.

Ejemplo 7

Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE inhibe el crecimiento de tumores in vivo

La expresión significativa de 191P4D12 en la superficie celular de los tejidos tumorales, junto con su expresión restrictiva en tejidos normales, hace que 191P4D12 sea un buen objetivo para la terapia de anticuerpos y, de forma similar, la terapia a través de CAF. Por lo tanto, se evalúa la eficacia terapéutica de Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE en modelos en ratón de xenoinjerto de cáncer de vejiga, pulmón, mama y páncreas humanos.

La eficacia del conjugado de anticuerpo y fármaco en el crecimiento tumoral y la formación de metástasis se estudia en modelos de xenoinjerto de cáncer de ratón (por ejemplo, subcutáneo y ortotópicamente).

Los tumores subcutáneos (s.c.) se generan por inyección de 5×10^4 – 10^6 células cancerosas mezcladas en una dilución 1:1 con Matrigel (Collaborative Research) en el costado derecho de ratones SCID macho. Para evaluar la eficacia de CAF en la formación de tumores, las inyecciones de CAF se inician el mismo día que las inyecciones de

las células tumorales. Como control, a los ratones se les inyecta IgG o PBS humanos purificados; o un MAb purificado que reconoce un antígeno irrelevante no expresado en células humanas. En estudios preliminares, no se encontraron diferencias entre el control de IgG o PBS en el crecimiento tumoral. Los tamaños de los tumores se determinan mediante medidas de calibre, y el volumen del tumor se calcula como $\text{ancho}^2 \times \text{Longitud}/2$, donde el ancho es la dimensión más pequeña y la longitud es la dimensión más grande. Se sacrifican los ratones con tumores subcutáneos mayores de 1,5 cm de diámetro.

Los tumores de los ovarios a menudo se metastatizan y crecen dentro de la cavidad peritoneal. En consecuencia, el crecimiento intraperitoneal de tumores ováricos en ratones se realiza mediante inyección de 2 millones de células directamente en el peritoneo de ratones hembra. Los ratones son monitoreados en cuanto a salud general, actividad física y apariencia hasta que se vuelven moribundos. En el momento del sacrificio, la cavidad peritoneal se puede examinar para determinar la carga tumoral y los pulmones se recuperan para evaluar la metástasis en sitios distantes. Alternativamente, la muerte se puede usar como punto final. A continuación, los ratones se segregan en grupos para los tratamientos apropiados, con 191P4D12 o MABs de control inyectados i.p.

Una ventaja de los modelos de cáncer de xenoinjerto es la capacidad de estudiar la neovascularización y la angiogénesis. El crecimiento tumoral depende en parte del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. Aunque el sistema capilar y la red sanguínea en desarrollo es de origen huésped, la iniciación y la arquitectura de la neovascularización está regulada por el tumor del 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 de la molécula pequeña sobre la neovascularización se estudia de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica, tales como el análisis IHC de tejidos tumorales y su microambiente circundante.

Ha22-2(2,4)6.1ADC inhibe la formación de xenoinjertos de cáncer de pulmón, vejiga, mama y cáncer de páncreas. Estos resultados indican la utilidad de Ha22-2(2,4)6.1ADC en el tratamiento de estadios locales y avanzados del cáncer y preferiblemente aquellos cánceres expuestos en la Tabla I.

CAF 191P4D12:

Se generaron anticuerpos monoclonales contra 191P4D12 como se describe en el Ejemplo titulado "Generación de anticuerpos monoclonales 191P4D12 (MABs)". Además, los MABs se conjugaron a una toxina como se describe en el Ejemplo titulado "Conjugación de Anticuerpo y Fármaco de MAb Ha22-2(2,4)6.1" para formar Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE. El Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE se caracteriza por FACS, y otros métodos conocidos en la técnica para determinar su capacidad para unir 191P4D12.

Líneas celulares y xenoinjertos:

Las células BT-483 y HPAC se mantienen en DMEM, complementado con L-glutamina y 10% de FBS, como se conoce en la técnica. Los xenoinjertos AG-B8, AG-Panc4, AG-Panc2, AG-B1, AG-L4 y AG-Panc3 se mantienen por propagación en serie en ratones SCID.

Evaluación del mAb Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE en el modelo de formación de tumores subcutáneos de xenoinjerto de cáncer de pulmón humano AG-L4 en ratones SCID

En este experimento, el xenoinjerto AG-L4 de cáncer de pulmón derivado del paciente se mantuvo mediante pases seriados en ratones SCID. Los tumores en existencia se cosecharon de forma estéril y se digirieron enzimáticamente en suspensiones de células individuales. Se implantaron dos (2) millones de células en el costado de ratones SCID individuales. Los animales se asignaron aleatoriamente a siete grupos: seis (6) grupos tratados con anticuerpo 191P4D12 y un grupo control de anticuerpo H3-1.10.1.2 (n = 10). Todos los anticuerpos se dosificaron por vía intraperitoneal a 750 µg/animal dos veces a la semana hasta el final del estudio. El crecimiento tumoral se controló usando medidas de calibre cada 3 a 4 días. El volumen del tumor se calculó como $\text{Ancho}^2 \times \text{Longitud}/2$, donde el ancho es la dimensión más pequeña y la longitud es la dimensión más grande.

Los resultados muestran que el MAB de 191P4D12 no inhibió significativamente el crecimiento tumoral en el xenoinjerto de cáncer de pulmón humano AG-L4 en ratones SCID. Además, otros MABs de 191P4D12 se utilizaron en este estudio. Los resultados no se muestran. (Figura 12).

Evaluación del MAb Ha22-2(2,4)6.1 en el modelo de formación tumoral subcutánea de xenoinjerto de cáncer de páncreas humano HPAC en ratones SCID

En otro experimento, se inyectaron células HPAC de cáncer de páncreas humano (2,0 millones/ratón) en el costado de ratones SCID individuales. Los animales se asignaron aleatoriamente a ocho grupos: siete (7) grupos tratados con anticuerpo 191P4D12 y un grupo de anticuerpo de control H3-1.4.1.2 (n = 10). Todos los anticuerpos se dosificaron por vía intraperitoneal a 500 µg/animal dos veces a la semana hasta el final del estudio. El crecimiento tumoral se controló usando medidas de calibre cada 3 a 4 días. El volumen del tumor se calculó como $\text{Ancho}^2 \times \text{Longitud}/2$, donde el ancho es la dimensión más pequeña y la longitud es la dimensión más grande.

Los resultados muestran que el MAb 191P4D12 no inhibió el crecimiento tumoral en un xenoinjerto pancreático humano en ratones SCID en comparación con el anticuerpo de control. Además, otros MAbs de 191P4D12 se utilizaron en este estudio. Los resultados no se muestran. (Figura 13).

5 Evaluación del MAb Ha22-2(2,4)6.1 en el modelo de formación tumoral subcutánea de xenoinjerto de cáncer pancreático humano AG-Panc3 en ratones SCID.

10 En otro experimento, el xenoinjerto de cáncer de páncreas AG-Panc3 derivado del paciente se mantuvo mediante pases seriados en ratones SCID. Los tumores en existencia se recogieron estérilmente y se trituraron en trozos de 1 mm³. Seis piezas se implantaron en el costado de ratones SCID individuales. Los animales se asignaron aleatoriamente a las siguientes cohortes (n = 10): dos (2) grupos tratados con MAb 191P4D12 y un grupo de anticuerpo de control H3-1.4.1.2. Todos los anticuerpos se dosificaron por vía intraperitoneal a 500 µg/animal dos veces a la semana hasta el final del estudio. El crecimiento tumoral se controló usando medidas de calibre cada 3 a 4 días. El volumen del tumor se calculó como Ancho² × Longitud/2, donde el ancho es la dimensión más pequeña y la longitud es la dimensión más grande.

15 Los resultados muestran que el MAb 191P4D12 no inhibió el crecimiento tumoral en un xenoinjerto pancreático humano en ratones SCID en comparación con el anticuerpo de control. Además, otros MAbs de 191P4D12 se utilizaron en este estudio. Los resultados no se muestran. (Figura 14).

Eficacia de Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE en xenoinjerto de cáncer de pulmón humano establecido por vía subcutánea AG-L4 en ratones SCID

20 En otro experimento, el xenoinjerto AG-L13 de cáncer de pulmón derivado del paciente se mantuvo mediante pases seriados en ratones SCID. Los tumores en existencia se recogieron estérilmente y se trituraron en trozos de 1 mm³. Seis (6) piezas se implantaron en el costado de ratones SCID individuales. Los tumores se dejaron crecer sin tratar hasta que alcanzaron un volumen aproximado de 200 mm³. El Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE y el control CAF se dosificaron a 10 mg/kg cada siete (7) días para dos dosis mediante inyección intravenosa en bolo. La cantidad de CAF administrada se basó en el peso corporal individual de cada animal obtenido inmediatamente antes de la dosificación. El crecimiento tumoral se controló usando medidas de calibre cada 3 a 4 días. El volumen del tumor se calculó como Ancho² × Longitud/2, donde el ancho es la dimensión más pequeña y la longitud es la dimensión más grande.

25 Los resultados muestran que el tratamiento con Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de pulmón AG-L4 implantados por vía subcutánea en ratones atímicos en comparación con el control de CAF. Además, otros MAbs de 191P4D12 se utilizaron en este estudio. Los resultados no se muestran. (Figura 15).

Eficacia de Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE en xenoinjerto de cáncer de mama humano subcutáneo BT-483 en ratones SCID

35 En este experimento, se usaron células BT-483 de cáncer de mama humano para generar xenoinjertos de reserva, que se mantuvieron mediante pases seriados en ratones SCID. Los tumores en existencia se recogieron estérilmente y se trituraron en trozos de 1 mm³. Seis (6) piezas se implantaron en el costado de ratones SCID individuales. Los tumores se dejaron crecer sin tratar hasta que alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm³. El Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE y el control CAF se dosificaron a 5 mg/kg cada cuatro (4) días para cuatro (4) dosis por inyección intravenosa en bolo. La cantidad de CAF administrada se basó en el peso corporal individual de cada animal obtenido inmediatamente antes de la dosificación. El crecimiento tumoral se controló usando medidas de calibre cada 3 a 4 días. El volumen del tumor se calculó como Ancho² × Longitud/2, donde el ancho es la dimensión más pequeña y la longitud es la dimensión más grande.

40 Los resultados muestran que el tratamiento con Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de tumor de mama BT-483 implantados por vía subcutánea en ratones SCID en comparación con el control de CAF. Además, otros MAbs de 191P4D12 se utilizaron en este estudio. Los resultados no se muestran. (Figura 16).

Eficacia de Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE en xenoinjerto de cáncer de vejiga humano establecido por vía subcutánea AG-B1 en ratones SCID

50 En otro experimento, el xenoinjerto de cáncer de vejiga derivado del paciente AG-B1 se mantuvo mediante pases seriados en ratones SCID. Los tumores en existencia se recogieron estérilmente y se trituraron en trozos de 1 mm³. Seis (6) piezas se implantaron en el costado de ratones SCID individuales. Los tumores se dejaron crecer sin tratar hasta que alcanzaron un volumen aproximado de 230 mm³. El Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE y el control CAF se dosificaron a 4 mg/kg una vez mediante inyección en bolo intravenoso. La cantidad de CAF administrada se basó en el peso corporal individual de cada animal obtenido inmediatamente antes de la dosificación. El crecimiento tumoral se controló usando medidas de calibre cada 3 a 4 días. El volumen del tumor se calculó como Ancho² × Longitud/2, donde el ancho es la dimensión más pequeña y la longitud es la dimensión más grande.

55

Los resultados muestran que el tratamiento con Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de vejiga AG-B1 en comparación con el control de CAF. Además, otros MAb de 191P4D12 se utilizaron en este estudio. Los resultados no se muestran. (Figura 17).

5 Eficacia de Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE en el xenoinjerto del cáncer de páncreas humano establecido por vía subcutánea AG-Panc2 en ratones SCID

10 En otro experimento, el xenoinjerto de cáncer de páncreas AG-Panc2 derivado del paciente se mantuvo mediante pases seriados en ratones SCID. Los tumores en existencia se recogieron estérilmente y se trituraron en trozos de 1 mm³. Se implantaron cinco (5) piezas en el costado de ratones SCID individuales. Los tumores se dejaron crecer sin tratar hasta que alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm³. El Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE y el control de CAF se dosificaron a 5 mg/kg cada cuatro (4) días para cuatro (4) dosis mediante inyección intravenosa en bolo. La cantidad de CAF administrada se basó en el peso corporal individual de cada animal obtenido inmediatamente antes de la dosificación. El crecimiento tumoral se controló usando medidas de calibre cada 3 a 4 días. El volumen del tumor se calculó como Ancho² × Longitud/2, donde el ancho es la dimensión más pequeña y la longitud es la dimensión más grande.

15 Los resultados muestran que el tratamiento con Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de páncreas AG-Panc2 en comparación con el control de CAF. Además, otros MAb de 191P4D12 se utilizaron en este estudio. Los resultados no se muestran. (Figura 18).

Eficacia de Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE en el xenoinjerto de cáncer de páncreas humano establecido por vía subcutánea AG-Panc4 en ratones SCID

20 En otro experimento, el xenoinjerto de cáncer de páncreas AG-Panc4 derivado del paciente se mantuvo mediante pases seriados en ratones SCID. Los tumores en existencia se recogieron estérilmente y se trituraron en trozos de 1 mm³. Seis (6) piezas se implantaron en el costado de ratones SCID individuales. El Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE y el control de CAF se dosificaron a 5 mg/kg cada siete (7) días para tres dosis mediante inyección en bolo intravenoso. La cantidad de CAF administrada se basó en el peso corporal individual de cada animal obtenido inmediatamente antes de la dosificación. El crecimiento tumoral se controló usando medidas de calibre cada 3 a 4 días. El volumen del tumor se calculó como Ancho² × Longitud/2, donde el ancho es la dimensión más pequeña y la longitud es la dimensión más grande.

30 Los resultados muestran que el tratamiento con Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de páncreas AG-Panc4 en comparación con el control de CAF. Además, otros MAb de 191P4D12 se utilizaron en este estudio. Los resultados no se muestran. (Figura 19).

Eficacia de Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE a dosificación comparativa en xenoinjerto de cáncer de vejiga humano establecido por vía subcutánea AG-B8 en ratones SCID

35 En este experimento, el xenoinjerto AG-B8 de cáncer de vejiga derivado del paciente se mantuvo mediante pases seriados en ratones SCID. Los tumores en existencia se recogieron estérilmente y se trituraron en trozos de 1 mm³. Seis (6) piezas se implantaron en el costado de ratones SCID individuales. Los tumores se dejaron crecer sin tratamiento hasta que alcanzaron un volumen aproximado de 200 mm³. Los animales se asignaron aleatoriamente a las siguientes tres cohortes (n = 6): dos (2) grupos tratados con Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE y un grupo control CAF VCD37-5ce5p-vcMMAE. Se dosificó Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE a 5 mg/kg o 10 mg/kg y se administró el control CAF a 5 mg/kg. Todos los CAF se dosificaron una vez mediante inyección en bolo intravenoso. La cantidad de CAF administrada se basó en el peso corporal individual de cada animal obtenido inmediatamente antes de la dosificación. El crecimiento tumoral se controló usando medidas de calibre cada 3 a 4 días. El volumen del tumor se calculó como Ancho² × Longitud/2, donde el ancho es la dimensión más pequeña y la longitud es la dimensión más grande.

45 Los resultados muestran que el tratamiento con Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE a 10 mg/kg inhibió el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de vejiga AG-B8 en comparación con Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE a 5 mg/kg. (Figura 20).

Conclusión

50 En resumen, las Figs. 12-20 muestran que el CAF 191P4D12 denominado Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE inhibió significativamente el crecimiento de células tumorales que expresaban 191P4D12 en comparación con el CAF de control. Por lo tanto, el Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE puede usarse con fines terapéuticos para tratar y controlar los cánceres expuestos en la Tabla I.

Ejemplo 8

Ensayos clínicos en humanos para el tratamiento y el diagnóstico de carcinomas humanos mediante el uso de CAF 191P4D12s

Se usan CAF 191P4D12 de acuerdo con la presente invención que se unen específicamente a 191P4D12, y se usan en el tratamiento de ciertos tumores, preferiblemente los mencionados en la Tabla I. En conexión con cada una de estas indicaciones, se siguen dos enfoques clínicos con éxito.

- 5 I.) Terapia adyuvante: en la terapia adyuvante, los pacientes se tratan con CAF 191P4D12 en combinación con un agente quimioterapéutico o antineoplásico y/o radioterapia o una combinación de los mismos. Las dianas cancerosas primarias, como las enumeradas en la Tabla I, se tratan según protocolos estándar mediante la adición de CAF 191P4D12 a la terapia de primera y segunda línea estándar. Los diseños del protocolo abordan la efectividad evaluada mediante los siguientes ejemplos, que incluyen, entre otros, reducción en la masa tumoral de lesiones primarias o metastásicas, aumento de la supervivencia libre de progresión, supervivencia global, mejora de la salud del paciente, estabilización de la enfermedad, así como la capacidad de reducir dosis habituales de quimioterapia estándar y otros agentes biológicos. Estas reducciones de dosis permiten una terapia adicional y/o prolongada al reducir la toxicidad relacionada con la dosis del agente quimioterapéutico o biológico. Los CAF 191P4D12 se utilizan en varios ensayos clínicos complementarios en combinación con los agentes quimioterapéuticos o antineoplásicos.
- 10
- 15 II.) Monoterapia: en relación con el uso de los CAF 191P4D12 en monoterapia de tumores, los CAF 191P4D12 se administran a pacientes sin un agente quimioterapéutico o antineoplásico. En una realización, la monoterapia se lleva a cabo clínicamente en pacientes con cáncer en fase terminal con enfermedad metastásica extensa. Los diseños del protocolo abordan la efectividad evaluada mediante los siguientes ejemplos, que incluyen, entre otros, reducción en la masa tumoral de lesiones primarias o metastásicas, aumento de la supervivencia libre de progresión, supervivencia global, mejora de la salud del paciente, estabilización de la enfermedad, así como la capacidad de reducir dosis habituales de quimioterapia estándar y otros agentes biológicos.
- 20

Dosificación

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada. Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación, como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la invención está dictada y depende directamente de (a) las características únicas del anticuerpo y/o CAF y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se desea alcanzar, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de componer tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

25

30

35 Un intervalo ejemplar no limitativo para una cantidad terapéuticamente eficaz de un CAF 191P4D12 administrado en combinación de acuerdo con 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 intervalos ejemplares 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 de más de 10 mg/kg. Debe tenerse en cuenta que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección que se va a aliviar, y pueden incluir dosis únicas o múltiples. Debe entenderse además que, para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación establecidos en este documento son ejemplares solo y no están destinados a limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

40

45

Plan de Desarrollo Clínico (CDP)

El CDP sigue y desarrolla tratamientos de CAF 191P4D12 en relación con la terapia adyuvante o la monoterapia. Los ensayos inicialmente demuestran seguridad y luego confirman la eficacia en dosis repetidas. Los ensayos son abiertos comparando la quimioterapia estándar con la terapia estándar más CAF 191P4D12. Como se apreciará, un criterio no limitante que se puede utilizar en relación con el enrolamiento de pacientes es la expresión de 191P4D12 en sus tumores según se determina mediante biopsia.

50

Como con cualquier proteína o agente terapéutico basado en la infusión de anticuerpos, los problemas de seguridad están relacionados principalmente con (i) el síndrome de liberación de citocinas, es decir, hipotensión, fiebre, temblores, escalofríos; (ii) el desarrollo de una respuesta inmunogénica al material (es decir, el desarrollo de anticuerpos humanos por parte del paciente para el anticuerpo terapéutico, o respuesta HAMA); y, (iii) la toxicidad para células normales que expresan 191P4D12. Las pruebas estándar y el seguimiento se utilizan para monitorear cada uno de estos problemas de seguridad. Los CAF 191P4D12 se encuentran seguros en la administración humana.

55

Ejemplo 9

Detección de la proteína 191P4D12 en muestras de pacientes con cáncer por IHC

- La expresión de la proteína 191P4D12 por inmunohistoquímica se probó en muestras de tumores de pacientes de (i) vejiga, (ii) de mama, (iii) de páncreas, (iv) de pulmón, (v) cáncer de ovario, (vi) esofágico y (vii) de cabeza y de cuello. Brevemente, los tejidos incrustados con cera de parafina, fijados con formalina, se cortaron en cuatro (4) micrómetros y se montaron en portaobjetos de vidrio. Las secciones se eliminaron con cera, se rehidrataron y se trataron con solución de recuperación de antígeno EDTA (Biogenex, San Ramon, CA) en el microondas EZ-Retriever (Biogenex, San Ramon, CA) durante 30 minutos a 95°C. Las secciones entonces se trataron con solución de peróxido de hidrógeno al 3% para inactivar la actividad de peroxidasa endógena. Se utilizó bloque de proteína libre de suero (Dako, Carpintería, CA) para inhibir la unión no específica antes de la incubación con anticuerpo monoclonal de ratón anti-191P4D12 o un control de isotipo. Posteriormente, las secciones se trataron con el sistema de detección de polímero-peroxidasa de rábano picante (HRP) Super Sensitive™ que consiste en una incubación en reactivo Super Enhancer™ seguido de una incubación con conjugado de anticuerpo secundario polímero-HRP (BioGenex, San Ramon, CA). Las secciones se desarrollaron usando el kit DAB (BioGenex, San Ramon, California). Los núcleos se tiñeron usando hematoxilina y se analizaron mediante microscopía de campo brillante. Se detectó tinción específica en muestras de pacientes usando el anticuerpo inmunorreactivo 191P4D12, como se indica por la tinción marrón. (Ver, Figuras 21 (A), 21 (C), 21 (E), 21 (G), 21 (I), 21 (K) y 21 (M)). Por el contrario, el anticuerpo de control no tiñó ninguna de las muestras del paciente. (Ver, Figuras 21 (B), 21 (D), 21 (F), 21 (H), 21 (J), 21 (L) y 21 (N)).
- Los resultados muestran la expresión de 191P4D12 en las células tumorales de tejidos de pacientes con cáncer de vejiga, mama, páncreas, pulmón, ovarios, esófago y cabeza y cuello. Estos resultados indican que 191P4D12 se expresa en cánceres humanos y que los anticuerpos dirigidos a este antígeno y al conjugado de anticuerpo y fármaco designado Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE son útiles para fines de diagnóstico y terapéuticos. (Figura 21).

Ejemplo 10

25 Determinación del epítipo de unión de MAb Ha22-2(2,4)6.1

- La proteína 191P4D12 de origen humano, cinomólogo, rata y murino se sobreexpresó recombinantemente en una línea celular PC3 para determinar la reactividad cruzada de Ha22-2(2,4)6.1 con estos ortólogos. Se demostró que Ha22-2(2,4)6.1 tiene una fuerte reacción cruzada con ortólogos cinomólogos y de rata de 191P4D12 (Figura 23). Los valores de unión de EC50 se muestran en la Tabla VII. La unión de Ha22-2(2,4)6.1 a ortólogo murino muestra una reducción significativa en el valor de EC50 de unión, que muestra sustituciones de aminoácidos importantes en el dominio V (en comparación con las secuencias humanas y de rata) que afectan a la afinidad de Ha22-2(2,4)6.1 a 191P4D12.

- La Tabla VIII muestra una alineación de secuencia de proteína 1-180 de ortólogos de 191P4D12 que contienen el dominio V. Solo dos aminoácidos en la secuencia de ortólogos de rata, Thr-75 y Ser-90, están sustituidos en la secuencia de ortólogos murinos por Ile y Asn, respectivamente (marcados en negrita). Debe observarse que los aminoácidos correspondientes en la secuencia humana son Ala-76 y Ser-91. Para determinar si estos aminoácidos comprenden el epítipo de unión de Ha22-2(2,4)6.1, se generaron varias construcciones mutantes de 191P4D12 y su ortólogo murino y se expresaron en células PC3 (Tabla IX). Se introdujeron aminoácidos "murinos" en lugar de una mutagénesis de sustitución de alanina estándar en la secuencia humana y viceversa en la secuencia de ratón.

- Se demostró que la mutación de Ser-91 a Asn en el 191P4D12 afecta gravemente a la unión de Ha22-2(2,4)6.1 confirmando que este aminoácido, Ser-91, es esencial para la unión y debe comprender el epítipo reconocido por el MAb Ha22-2(2,4)6.1. La mutación adicional de Ala en la posición 76 (A76I, doble mutante S91N) también se introdujo en 191P4D12. Se demostró que la unión de Ha22-2(2,4)6.1 al doble mutante A76I, S91N es muy similar a la unión de ortólogos murinos (Figura 24). Por el contrario, la mutación de Asn-90 en la secuencia murina a Ser mejora drásticamente la unión de Ha22-2(2,4)6.1 al ortólogo mutante murino confirmando además la importancia del aminoácido en esta posición para la unión de Ha22-2(2,4)6.1. La unión de Ha22-2(2,4)6.1 al mutante doble ortólogo murino A90S, I75A parece muy similar al ortólogo humano de 191P4D12.

- Tomados en conjunto, estos datos demuestran que Ser-91 y Ala-76 desempeñan un papel crucial en la unión de la proteína Ha22-2(2,4)6.1 a 191P4D12 en la superficie celular y constituyen parte del epítipo reconocido por Ha22-2(2,4)6.1 en la superficie de 191P4D12.

Para visualizar este concepto, se generó un modelo informático del dominio V de 191P4D12 basado en los datos de la estructura cristalina publicados para miembros de familia de proteínas que contienen 191P4D12 y dominio Ig que usan PyMOL (Figura 25). Se muestran las posiciones de Ala-76 (punteado) y Ser-91 (rayado cruzado).

- Además, para refinar aún más el sitio de unión de Ha22-2(2,4)6.1 en la molécula 191P4D12, se diseñó y expresó un fragmento de 191P4D12 correspondiente al dominio V en la superficie de las células E de rata (1). La siguiente construcción se generó en el vector retroviral:

191P4D12 (aa1-150, 347-510)

5 La unión de MAb Ha22-2(2,4)6.1 fue evaluada por FACS. Como se muestra en la FIG. 26, Ha22-2(2,4)6.1 se une a células que expresan el dominio V (A) así como también a 191P4D12 (B) de tipo salvaje, pero no a células que expresan el dominio C1C2 generadas anteriormente (C). Esto demuestra que el sitio de unión para este anticuerpo está localizado en el dominio V de 191P4D12 dentro de los primeros 150 aminoácidos.

Los resultados muestran que el MAb Ha22-2(2,4)6.1 se une al dominio v de la proteína 191P4D12 de la posición 1-150 aa y muestra adicionalmente que el epítipo específico que comprende el aa Ser-91 y aa Ala-76 es crítico para unir el mAb Ha22-2(2,4)6.1.

10 A lo largo de esta solicitud, se hace referencia a diversos contenidos de sitios web, publicaciones, solicitudes de patente y patentes. (Los sitios web están referenciados por su localizador uniforme de recursos, o direcciones URL, en la World Wide Web).

15 La presente invención no tiene un alcance limitado por las realizaciones descritas en este documento, que funcionan como ilustraciones únicas de aspectos individuales de la invención, y cualquiera que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance de la invención. Diversas modificaciones a los modelos y métodos de la invención, además de las descritas en la presente memoria, resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción y las enseñanzas anteriores, y se pretende que entren de manera similar dentro del alcance de la invención. Tales modificaciones u otras realizaciones pueden practicarse sin apartarse del verdadero alcance y espíritu de la invención.

Tablas

20 Tabla I: Tejidos que expresan 191P4D12 cuando son malignos.

Colon

Páncreas

Ovarios

Mama

25 Pulmón

Vejiga

Tabla II: Abreviaturas de aminoácidos

| UNA 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 |

| UNA LETRA | TRES LETRAS | NOMBRE COMPLETO |
|-----------|-------------|-----------------|
| 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

Adaptada de la matriz de sustitución de aminoácidos del programa GCG Software 9.0 BLOSUM62 (matriz de sustitución de bloques). Cuanto mayor sea el valor, más probable es que se encuentre una sustitución en las proteínas naturales relacionadas.

5

| 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: Método general para la síntesis de vcMMAE

Donde: AA1 = aminoácido 1

AA2 = aminoácido 2

AA5 = Aminoácido 5

DIL = Dolaisoleuina

DAP = Dolaproína

Enlazante = Val-Cit (vc)

10

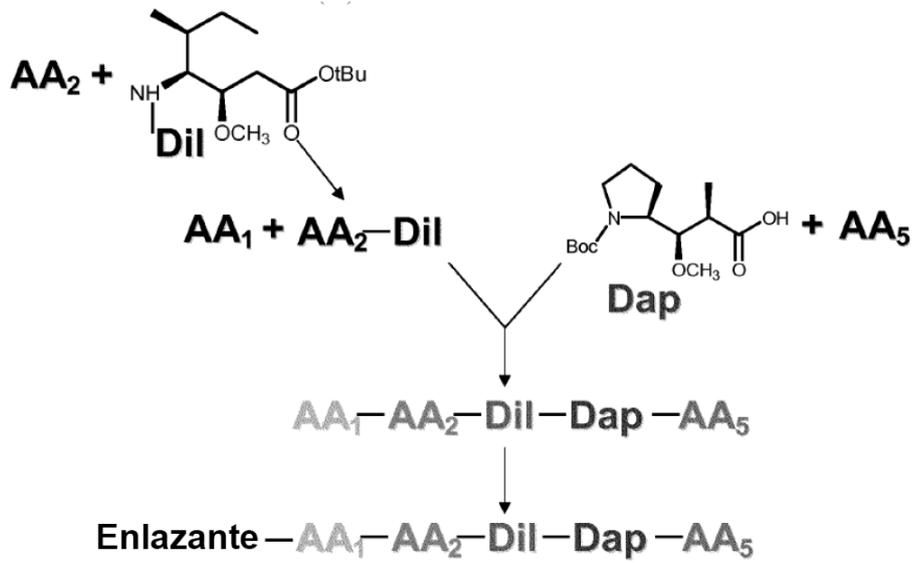


Tabla V: Velocidades de asociación y disociación Biacore y cálculo de la afinidad resultante

| | kon, M ⁻¹ s ⁻¹ | koff, s ⁻¹ | KD, M |
|----------------------|--------------------------------------|-----------------------|----------|
| Ha22-2(2,4)6.1 | 3,8 E + 05 | 5,8 E-03 | 1,6 E-08 |
| Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE | 4,5E + 05 | 5,2E -03 | 1,1 E-08 |

Tabla VI: Construcciones de 191P4D12 usadas en el ensayo de mapeo de dominio

| Construcciones | Nombre |
|------------------------------|---------------------------------|
| 191P4D12 (1-242 aa, 347-510) | VC1, línea que expresa Rat1(E) |
| 191P4D12 (1-31 aa, 147-510) | C1C2, línea que expresa Rat1(E) |
| 191P4D12 (1-242 aa) | mFc-VC1, proteína de fusión |
| 191P4D12 (1-31 aa, 147-346) | mFc-C1C2, proteína de fusión |
| 191P4D12 (1-141 aa) | mFc-V, proteína de fusión |

5

Tabla VII

| | PC3-191P4D12 | ortólogo Rhesus | ortólogo de rata | ortólogo murino |
|------------|--------------|-----------------|------------------|-----------------|
| Bmax (MFI) | 816 | 1146 | 679 | 325 |
| EC50 (nM) | 0,28 | 0,30 | 0,44 | 70,3 |

10

Tabla VIII (SEQ ID N°: 11-13, en orden de aparición)

Ratón MPLSLGAEMWGPEAWLR-LLFLASFTGQYSAGELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDPDE 59
Rata MPLSLGAEMWGPEAWLL-LLFLASFTGRYSAGELETSDLVTVVLGQDAKLPCFYRGDPDE 59
Humano MPLSLGAEMWGPEAWLLLLLLLLASFTGRCPAGELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGE 60
 ***** **:**
Ratón QVGQVAVARVDPNEGIRELALLHSHYGLHVNPAYEDRVEQPPPPRDPLDGSVLLRNAVQA 119
Rata QVGQVAVARVDPNEGIRELALLHSHYGLHVS PAYEDRVEQPPPPRDPLDGSILLRNAVQA 119
Humano QVGQVAVARVDAGEGAQELALLHSHYGLHVS PAYEGRVEQPPPPRNPLDGSVLLRNAVQA 120
 ***** .*:*:*:*:*:*:*:*:*:*.*.*.*.*.*.*.*:*:*:*:*:*:*:*:*:**
Ratón DEGEYECRVSTFPAGSFQARMRLRVLVPLPSLNPGPPLEEGQGLTLAASCTAEGSPAPS 179
Rata DEGEYECRVSTFPAGSFQARMRLRVLVPLPSLNPGPPLEEGQGLTLAASCTAEGSPAPS 179
Humano DEGEYECRVSTFPAGSFQARLRLRVLVPLPSLNPGPALEEGQGLTLAASCTAEGSPAPS 180
 *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*.*.*.*.*.*.*.*:*:*:*:*:*:*:*:*:**

10 Tabla IX

| Construcciones naturales | construcciones mutantes | construcciones doble mutantes |
|---|-------------------------|-------------------------------|
| 191P4D12, tipo salvaje | S91N | S91N, A76I |
| Ortólogo murino de 191P4D12, tipo salvaje | N90S | N90S, I75A |

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AGENSYS, INC.
 SEATTLE GENETICS, INC.
 SATPAYEV, Daulet
 5 MORRISON, Robert Kendall
 MORRISON, Karen Jane Meyrick
 GUDAS, Jean
 JAKOBOVITS, Aya
 10 TORGOV, Michael
 AN, Zili

<120> CONJUGADOS DE ANTICUERPOS Y FÁRMACOS (CAF) QUE SE UNEN A LAS PROTEÍNAS 191P4D12

<130> 511582008250

15 <140> Aún no asignada
 <141> Simultáneamente con esta

<150> US 61/387,933
 <151> 296-09-2010

20 <160> 13

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

25 <210> 1
 <211> 3464
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <221> CDS
 <222> (264)...(1796)

35 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)...(3464)
 <223> 191P4D12

<400> 1
 ggccgtcggt gttggccaca gcgtggaag cagctctggg ggagctcggg gctcccgatc 60
 acggcttctt ggggtagct acggctgggt gtgtagaacg gggccggggc tggggctggg 120
 tcccctagtg gagacccaag tgcgagaggc aagaactctg cagcttcctg ccttctgggt 180
 cagttcctta ttcaagtctg cagccggctc ccagggagat ctgggtggaa cttcagaaac 240
 gctgggcagt ctgcctttca acc atg ccc ctg tcc ctg gga gcc gag atg tgg 293
 Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp
 1 5 10

ggg cct gag gcc tgg ctg ctg ctg ctg cta ctg ctg gca tca ttt aca 341
 Gly Pro Glu Ala Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ser Phe Thr
 15 20 25

ggc cgg tgc ccc gcg ggt gag ctg gag acc tca gac gtg gta act gtg 389
 Gly Arg Cys Pro Ala Gly Glu Leu Glu Thr Ser Asp Val Val Thr Val
 30 35 40

gtg ctg ggc cag gac gca aaa ctg ccc tgc ttc tac cga ggg gac tcc 437
 Val Leu Gly Gln Asp Ala Lys Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Ser
 45 50 55

ggc gag caa gtg ggg caa gtg gca tgg gct cgg gtg gac gcg ggc gaa 485
 40 Gly Glu Gln Val Gly Gln Val Ala Trp Ala Arg Val Asp Ala Gly Glu

ES 2 680 624 T3

| 60 | 65 | 70 | |
|---|----|----|------|
| ggc gcc cag gaa cta gcg cta ctg cac tcc aaa tac ggg ctt cat gtg Gly Ala Gln Glu Leu Ala Leu Leu His Ser Lys Tyr Gly Leu His Val 75 80 85 90 | | | 533 |
| agc ccg gct tac gag ggc cgc gtg gag cag ccg ccg ccc cca cgc aac Ser Pro Ala Tyr Glu Gly Arg Val Glu Gln Pro Pro Pro Pro Arg Asn 95 100 105 | | | 581 |
| ccc ctg gac ggc tca gtg ctc ctg cgc aac gca gtg cag gcg gat gag Pro Leu Asp Gly Ser Val Leu Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu 110 115 120 | | | 629 |
| ggc gag tac gag tgc cgg gtc agc acc ttc ccc gcc ggc agc ttc cag Gly Glu Tyr Glu Cys Arg Val Ser Thr Phe Pro Ala Gly Ser Phe Gln 125 130 135 | | | 677 |
| gcg cgg ctg cgg ctc cga gtg ctg gtg cct ccc ctg ccc tca ctg aat Ala Arg Leu Arg Leu Arg Val Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn 140 145 150 | | | 725 |
| cct ggt cca gca cta gaa gag ggc cag ggc ctg acc ctg gca gcc tcc Pro Gly Pro Ala Leu Glu Glu Gly Gln Gly Leu Thr Leu Ala Ala Ser 155 160 165 170 | | | 773 |
| tgc aca gct gag ggc agc cca gcc ccc agc gtg acc tgg gac acg gag Cys Thr Ala Glu Gly Ser Pro Ala Pro Ser Val Thr Trp Asp Thr Glu 175 180 185 | | | 821 |
| gtc aaa ggc aca acg tcc agc cgt tcc ttc aag cac tcc cgc tct gct Val Lys Gly Thr Thr Ser Ser Arg Ser Phe Lys His Ser Arg Ser Ala 190 195 200 | | | 869 |
| gcc gtc acc tca gag ttc cac ttg gtg cct agc cgc agc atg aat ggg Ala Val Thr Ser Glu Phe His Leu Val Pro Ser Arg Ser Met Asn Gly 205 210 215 | | | 917 |
| cag cca ctg act tgt gtg gtg tcc cat cct ggc ctg ctc cag gac caa Gln Pro Leu Thr Cys Val Val Ser His Pro Gly Leu Leu Gln Asp Gln 220 225 230 | | | 965 |
| agg atc acc cac atc ctc cac gtg tcc ttc ctt gct gag gcc tct gtg Arg Ile Thr His Ile Leu His Val Ser Phe Leu Ala Glu Ala Ser Val 235 240 245 250 | | | 1013 |
| agg ggc ctt gaa gac caa aat ctg tgg cac att ggc aga gaa gga gct Arg Gly Leu Glu Asp Gln Asn Leu Trp His Ile Gly Arg Glu Gly Ala 255 260 265 | | | 1061 |
| atg ctc aag tgc ctg agt gaa ggg cag ccc cct ccc tca tac aac tgg Met Leu Lys Cys Leu Ser Glu Gly Gln Pro Pro Pro Ser Tyr Asn Trp 270 275 280 | | | 1109 |
| aca cgg ctg gat ggg cct ctg ccc agt ggg gta cga gtg gat ggg gac Thr Arg Leu Asp Gly Pro Leu Pro Ser Gly Val Arg Val Asp Gly Asp 285 290 295 | | | 1157 |
| act ttg ggc ttt ccc cca ctg acc act gag cac agc ggc atc tac gtc Thr Leu Gly Phe Pro Pro Leu Thr Thr Glu His Ser Gly Ile Tyr Val 300 305 310 | | | 1205 |
| tgc cat gtc agc aat gag ttc tcc tca agg gat tct cag gtc act gtg Cys His Val Ser Asn Glu Phe Ser Ser Arg Asp Ser Gln Val Thr Val 315 320 325 330 | | | 1253 |

ES 2 680 624 T3

gat gtt ctt gac ccc cag gaa gac tct ggg aag cag gtg gac cta gtg 1301
 Asp Val Leu Asp Pro Gln Glu Asp Ser Gly Lys Gln Val Asp Leu Val
 335 340 345

tca gcc tcg gtg gtg gtg ggt gtg atc gcc gca ctc ttg ttc tgc 1349
 Ser Ala Ser Val Val Val Val Gly Val Ile Ala Ala Leu Leu Phe Cys
 350 355 360

ctt ctg gtg gtg gtg gtg ctc atg tcc cga tac cat cgg cgc aag 1397
 Leu Leu Val Val Val Val Val Leu Met Ser Arg Tyr His Arg Arg Lys
 365 370 375

gcc cag cag atg acc cag aaa tat gag gag gag ctg acc ctg acc agg 1445
 Ala Gln Gln Met Thr Gln Lys Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Leu Thr Arg
 380 385 390

gag aac tcc atc cgg agg ctg cat tcc cat cac acg gac ccc agg agc 1493
 Glu Asn Ser Ile Arg Arg Leu His Ser His His Thr Asp Pro Arg Ser
 395 400 405 410

cag ccg gag gag agt gta ggg ctg aga gcc gag ggc cac cct gat agt 1541
 Gln Pro Glu Glu Ser Val Gly Leu Arg Ala Glu Gly His Pro Asp Ser
 415 420 425

ctc aag gac aac agt agc tgc tct gtg atg agt gaa gag ccc gag ggc 1589
 Leu Lys Asp Asn Ser Ser Cys Ser Val Met Ser Glu Glu Pro Glu Gly
 430 435 440

cgc agt tac tcc acg ctg acc acg gtg agg gag ata gaa aca cag act 1637
 Arg Ser Tyr Ser Thr Leu Thr Val Arg Glu Ile Glu Thr Gln Thr
 445 450 455

gaa ctg ctg tct cca ggc tct ggg cgg gcc gag gag gag gaa gat cag 1685
 Glu Leu Leu Ser Pro Gly Ser Gly Arg Ala Glu Glu Glu Glu Asp Gln
 460 465 470

gat gaa ggc atc aaa cag gcc atg aac cat ttt gtt cag gag aat ggg 1733
 Asp Glu Gly Ile Lys Gln Ala Met Asn His Phe Val Gln Glu Asn Gly
 475 480 485 490

acc cta cgg gcc aag ccc acg ggc aat ggc atc tac atc aat ggg cgg 1781
 Thr Leu Arg Ala Lys Pro Thr Gly Asn Gly Ile Tyr Ile Asn Gly Arg
 495 500 505

gga cac ctg gtc tga cccaggcctg cctcccttcc ctaggcctgg ctccttctgt 1836
 Gly His Leu Val *
 510

tgacatggga gattttagct catcttgggg gcctccttaa acacccccat ttcttgcgga 1896
 agatgctccc catcccactg actgcttgac ctttacctcc aacccttctg ttcacgcca 1956
 gggctccacc aattgagtct ctcccacat gcatgcaggt cactgtgtgt gtgcatgtgt 2016
 gcctgtgtga gtgttgactg actgtgtgtg tgtggagggg tgactgtccg tggaggggtg 2076
 actgtgtccg tgggtgtgat tatgctgtca tatcagagtc aagtgaactg tgggtgatgt 2136
 gccacgggat ttgagtgggt gcgtgggcaa cactgtcagg gtttggcgtg tgtgtcatgt 2196
 ggctgtgtgt gacctctgcc tgaaaaagca ggtattttct cagaccccag agcagtatta 2256
 atgatgcaga gggtggagga gagaggtgga gactgtggct cagacccagg tgtgcgggca 2316
 tagctggagc tggaatctgc ctccggtgtg agggaacctg tctcctacca cttcggagcc 2376
 atgggggcaa gtgtgaagca gccagtccct gggtcagcca gaggctttaa ctgttacaga 2436
 agccctctgc cctctggtgg cctctgggcc tgctgcatgt acatattttc tgtaaatata 2496
 catgcgccgg gagcttcttg caggaatact gctccgaatc acttttaatt ttttctttt 2556
 tttttcttg cccttccat tagttgtatt ttttattat ttttattttt atttttttt 2616
 agagatggag tctcactatg ttgctcaggc tggcctttaa ctctgggct caagcaatcc 2676
 tcctgcctca gcctccctag tagctgggac ttttaagtga caccactgtg cctgctttga 2736
 atcctttacg aagagaaaaa aaaaattaa gaaagccttt agatttatcc aatgtttact 2796

ES 2 680 624 T3

actgggattg cttaaagtga ggcccctcca acaccagggg gttaattcct gtgattgtga 2856
aaggggctac ttccaaggca tcttcatgca ggcagcccct tgggagggca cctgagagct 2916
ggtagagtct gaaattaggg atgtgagcct cgtgggttact gagtaaggta aaattgcatc 2976
caccattggt tgtgatacct tagggaattg cttggacctg gtgacaaggg ctctctgttca 3036
atagtgggtg tggggagaga gagagcagtg attatagacc gagagagtag gaggtagggt 3096
gaggtgaagg aggtgctggg ggtgagaatg tcgcctttcc ccctgggttt tggatcacta 3156
attcaaggct cttctggatg tttctctggg ttggggctgg agttcaatga ggtttatatt 3216
tagctggccc acccagatac actcagccag aatacctaga tttagtacc aaactcttct 3276
tagtctgaaa tctgctggat ttctggccta agggagaggc tcccatcctt cgttccccag 3336
ccagcctagg acttcgaatg tggagcctga agatctaaga tctaacaatg tacattttat 3396
gtaaataatg gcatatttgt acataaaatg atattctgtt tttaaataaa cagacaaaac 3456
ttgaaaaa 3464

<210> 2

<211> 510

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica miscelánea

10

<222> (1)...(510)

<223> 191P4D12

<400> 2

Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp Gly Pro Glu Ala Trp Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ser Phe Thr Gly Arg Cys Pro Ala Gly
20 25 30
Glu Leu Glu Thr Ser Asp Val Val Thr Val Val Leu Gly Gln Asp Ala
35 40 45
Lys Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Ser Gly Glu Gln Val Gly Gln
50 55 60
Val Ala Trp Ala Arg Val Asp Ala Gly Glu Gly Ala Gln Glu Leu Ala
65 70 75 80
Leu Leu His Ser Lys Tyr Gly Leu His Val Ser Pro Ala Tyr Glu Gly
85 90 95
Arg Val Glu Gln Pro Pro Pro Pro Arg Asn Pro Leu Asp Gly Ser Val
100 105 110
Leu Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Glu Cys Arg
115 120 125
Val Ser Thr Phe Pro Ala Gly Ser Phe Gln Ala Arg Leu Arg Leu Arg
130 135 140
Val Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn Pro Gly Pro Ala Leu Glu
145 150 155 160
Glu Gly Gln Gly Leu Thr Leu Ala Ala Ser Cys Thr Ala Glu Gly Ser
165 170 175
Pro Ala Pro Ser Val Thr Trp Asp Thr Glu Val Lys Gly Thr Thr Ser
180 185 190
Ser Arg Ser Phe Lys His Ser Arg Ser Ala Ala Val Thr Ser Glu Phe
195 200 205
His Leu Val Pro Ser Arg Ser Met Asn Gly Gln Pro Leu Thr Cys Val
210 215 220
Val Ser His Pro Gly Leu Leu Gln Asp Gln Arg Ile Thr His Ile Leu
225 230 235 240
His Val Ser Phe Leu Ala Glu Ala Ser Val Arg Gly Leu Glu Asp Gln
245 250 255
Asn Leu Trp His Ile Gly Arg Glu Gly Ala Met Leu Lys Cys Leu Ser
260 265 270
Glu Gly Gln Pro Pro Pro Ser Tyr Asn Trp Thr Arg Leu Asp Gly Pro
275 280 285
Leu Pro Ser Gly Val Arg Val Asp Gly Asp Thr Leu Gly Phe Pro Pro
290 295 300
Leu Thr Thr Glu His Ser Gly Ile Tyr Val Cys His Val Ser Asn Glu
305 310 315 320
Phe Ser Ser Arg Asp Ser Gln Val Thr Val Asp Val Leu Asp Pro Gln

15

ES 2 680 624 T3

```

          325          330          335
Glu Asp Ser Gly Lys Gln Val Asp Leu Val Ser Ala Ser Val Val Val
          340          345          350
Val Gly Val Ile Ala Ala Leu Leu Phe Cys Leu Leu Val Val Val
          355          360          365
Val Leu Met Ser Arg Tyr His Arg Arg Lys Ala Gln Gln Met Thr Gln
          370          375          380
Lys Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Leu Thr Arg Glu Asn Ser Ile Arg Arg
385          390          395          400
Leu His Ser His His Thr Asp Pro Arg Ser Gln Pro Glu Glu Ser Val
          405          410          415
Gly Leu Arg Ala Glu Gly His Pro Asp Ser Leu Lys Asp Asn Ser Ser
          420          425          430
Cys Ser Val Met Ser Glu Glu Pro Glu Gly Arg Ser Tyr Ser Thr Leu
          435          440          445
Thr Thr Val Arg Glu Ile Glu Thr Gln Thr Glu Leu Leu Ser Pro Gly
          450          455          460
Ser Gly Arg Ala Glu Glu Glu Asp Gln Asp Glu Gly Ile Lys Gln
465          470          475          480
Ala Met Asn His Phe Val Gln Glu Asn Gly Thr Leu Arg Ala Lys Pro
          485          490          495
Thr Gly Asn Gly Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Gly His Leu Val
          500          505          510

```

<210> 3
 <211> 1432
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (32)...(1432)

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)...(1432)
 15 <223> Ha22-2(2,4)6.1 cadena pesada

```

<400> 3
ggtgatcagc actgaacaca gaggactcac c atg gag ttg ggg ctg tgc tgg      52
          Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp
          1          5

ggt ttc ctt gtt gct att tta gaa ggt gtc cag tgt gag gtg cag ctg      100
Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly Val Gln Cys Glu Val Gln Leu
          10          15          20

gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc      148
Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
          25          30          35

tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat aac atg aac tgg      196
Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asn Met Asn Trp
          40          45          50          55

gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt tca tac att agt      244
Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser
          60          65          70

agt agt agt agt acc ata tac tac gca gac tct gtg aag ggc cga ttc      292
Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
          75          80          85

acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tca ctg tct ctg caa atg aac      340

```

ES 2 680 624 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|
| Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Lys | Asn | Ser | Leu | Ser | Leu | Gln | Met | Asn | | |
| | | 90 | | | | | 95 | | | | | 100 | | | | | |
| agc | ctg | aga | gac | gag | gac | acg | gct | gtg | tat | tac | tgt | gcg | aga | gca | tac | 388 | |
| Ser | Leu | Arg | Asp | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Ala | Tyr | | |
| | 105 | | | | | 110 | | | | | 115 | | | | | | |
| tac | tac | ggt | atg | gac | gtc | tgg | ggc | caa | ggg | acc | acg | gtc | acc | gtc | tcc | 436 | |
| Tyr | Tyr | Gly | Met | Asp | Val | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | | |
| | 120 | | | | 125 | | | | | 130 | | | | | 135 | | |
| tca | gcc | tcc | acc | aag | ggc | cca | tcg | gtc | ttc | ccc | ctg | gca | ccc | tcc | tcc | 484 | |
| Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | | |
| | | | | 140 | | | | | 145 | | | | | 150 | | | |
| aag | agc | acc | tct | ggg | ggc | aca | gcg | gcc | ctg | ggc | tgc | ctg | gtc | aag | gac | 532 | |
| Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | | |
| | | | 155 | | | | | 160 | | | | | | 165 | | | |
| tac | ttc | ccc | gaa | ccg | gtg | acg | gtg | tcg | tgg | aac | tca | ggc | gcc | ctg | acc | 580 | |
| Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | | |
| | | 170 | | | | | 175 | | | | | | 180 | | | | |
| agc | ggc | gtg | cac | acc | ttc | ccg | gct | gtc | cta | cag | tcc | tca | gga | ctc | tac | 628 | |
| Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | | |
| | 185 | | | | | 190 | | | | | | 195 | | | | | |
| tcc | ctc | agc | agc | gtg | gtg | acc | gtg | ccc | tcc | agc | agc | ttg | ggc | acc | cag | 676 | |
| Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | | |
| | 200 | | | | 205 | | | | | 210 | | | | | 215 | | |
| acc | tac | atc | tgc | aac | gtg | aat | cac | aag | ccc | agc | aac | acc | aag | gtg | gac | 724 | |
| Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | | |
| | | | | 220 | | | | | 225 | | | | | 230 | | | |
| aag | aga | gtt | gag | ccc | aaa | tct | tgt | gac | aaa | act | cac | aca | tgc | cca | ccg | 772 | |
| Lys | Arg | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | | |
| | | | 235 | | | | | 240 | | | | | 245 | | | | |
| tgc | cca | gca | cct | gaa | ctc | ctg | ggg | gga | ccg | tca | gtc | ttc | ctc | ttc | ccc | 820 | |
| Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | | |
| | | 250 | | | | | 255 | | | | | | 260 | | | | |
| cca | aaa | ccc | aag | gac | acc | ctc | atg | atc | tcc | cgg | acc | cct | gag | gtc | aca | 868 | |
| Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | | |
| | 265 | | | | | 270 | | | | | | 275 | | | | | |
| tgc | gtg | gtg | gtg | gac | gtg | agc | cac | gaa | gac | cct | gag | gtc | aag | ttc | aac | 916 | |
| Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | | |
| | 280 | | | | 285 | | | | | 290 | | | | | 295 | | |
| tgg | tac | gtg | gac | ggc | gtg | gag | gtg | cat | aat | gcc | aag | aca | aag | ccg | cgg | 964 | |
| Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | | |
| | | | | 300 | | | | | 305 | | | | | 310 | | | |
| gag | gag | cag | tac | aac | agc | acg | tac | cgt | gtg | gtc | agc | gtc | ctc | acc | gtc | 1012 | |
| Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | | |
| | | | 315 | | | | | 320 | | | | | | 325 | | | |
| ctg | cac | cag | gac | tgg | ctg | aat | ggc | aag | gag | tac | aag | tgc | aag | gtc | tcc | 1060 | |
| Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | | |
| | | | 330 | | | | 335 | | | | | | 340 | | | | |
| aac | aaa | gcc | ctc | cca | gcc | ccc | atc | gag | aaa | acc | atc | tcc | aaa | gcc | aaa | 1108 | |
| Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | | |

ES 2 680 624 T3

| | | | |
|---|-------------------------|-------------------------|------|
| 345 | 350 | 355 | |
| ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag | | | 1156 |
| Gly Gln Pro Arg Glu | Pro Gln Val Tyr Thr | Leu Pro Pro Ser Arg Glu | |
| 360 | 365 | 370 | 375 |
| gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc | | | 1204 |
| Glu Met Thr Lys Asn | Gln Val Ser Leu Thr Cys | Leu Val Lys Gly Phe | |
| | 380 | 385 | 390 |
| tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag | | | 1252 |
| Tyr Pro Ser Asp Ile | Ala Val Glu Trp Glu Ser | Asn Gly Gln Pro Glu | |
| | 395 | 400 | 405 |
| aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc | | | 1300 |
| Asn Asn Tyr Lys Thr | Thr Pro Pro Val Leu Asp | Ser Asp Gly Ser Phe | |
| | 410 | 415 | 420 |
| ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg | | | 1348 |
| Phe Leu Tyr Ser Lys | Leu Thr Val Asp Lys Ser | Arg Trp Gln Gln Gly | |
| | 425 | 430 | 435 |
| aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac | | | 1396 |
| Asn Val Phe Ser Cys | Ser Val Met His Glu Ala | Leu His Asn His Tyr | |
| | 440 | 445 | 450 |
| 445 | 450 | 455 | |
| acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa tga | | | 1432 |
| Thr Gln Lys Ser | Leu Ser Pro Gly Lys | * | |
| | 460 | 465 | |

<210> 4
 <211> 466
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> característica miscelánea
 10 <222> (1)...(466)
 <223> Ha22-2(2,4)6.1 cadena pesada

<400> 4
 Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Ser Leu Ser Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 145 150 155 160
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

15

ES 2 680 624 T3

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

5 <210> 5
 <211> 735
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (25)..(735)

15 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(735)
 <223> Ha22-2(2,4)6.1 cadena ligera

<400> 5
 agtcagacc agtcaggaca cagc atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc 51
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu
 1 5

ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg ttc cca ggt tcc aga tgc gac atc cag 99
 Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln
 10 15 20 25

atg acc cag tct cca tct tcc gtg tct gca tct gtt gga gac aga gtc 147
 Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 30 35 40

ES 2 680 624 T3

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 Gln Gly Ile Ser Gly Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ala Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110
 Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 7
 <211> 466
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> característica miscelánea
 10 <222> (1)...(466)
 <223> Ha22-2(2,4)6.1 cadena pesada

<400> 7
 Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Ser Leu Ser Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 145 150 155 160
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175

15

ES 2 680 624 T3

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

<210> 8
 <211> 236
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> característica miscelánea
 10 <222> (1)..(236)
 <223> Ha22-2(2,4)6.1 cadena ligera

<400> 8
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 Gln Gly Ile Ser Gly Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ala Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

15

ES 2 680 624 T3

Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 9

<211> 98

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica miscelánea

10 <222> (1)...(98)

<223> Línea germinal de la Ig humana VH3-48

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg

15

<210> 10

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (1)...(96)

<223> Línea germinal de la Ig humana L5

25

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro
 85 90 95

30

<210> 11

<211> 179

<212> PRT
<213> Mus musculus

5 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (1)...(179)
<223> Ortólogo de 191P4D12 que contiene el dominio V

<400> 11
Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp Gly Pro Glu Ala Trp Leu
1 5 10 15
Arg Leu Leu Phe Leu Ala Ser Phe Thr Gly Gln Tyr Ser Ala Gly Glu
20 25 30
Leu Glu Thr Ser Asp Val Val Thr Val Val Leu Gly Gln Asp Ala Lys
35 40 45
Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Pro Asp Glu Gln Val Gly Gln Val
50 55 60
Ala Trp Ala Arg Val Asp Pro Asn Glu Gly Ile Arg Glu Leu Ala Leu
65 70 75 80
Leu His Ser Lys Tyr Gly Leu His Val Asn Pro Ala Tyr Glu Asp Arg
85 90 95
Val Glu Gln Pro Pro Pro Arg Asp Pro Leu Asp Gly Ser Val Leu
100 105 110
Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Glu Cys Arg Val
115 120 125
Ser Thr Phe Pro Ala Gly Ser Phe Gln Ala Arg Met Arg Leu Arg Val
130 135 140
Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn Pro Gly Pro Pro Leu Glu Glu
145 150 155 160
Gly Gln Gly Leu Thr Leu Ala Ala Ser Cys Thr Ala Glu Gly Ser Pro
165 170 175

10 Ala Pro Ser

<210> 12
<211> 179
<212> PRT

15 <213> Rattus norvegicus

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (1)...(179)

20 <223> Ortólogo de 191P4D12 que contiene el dominio V

<400> 12
Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp Gly Pro Glu Ala Trp Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Phe Leu Ala Ser Phe Thr Gly Arg Tyr Ser Ala Gly Glu
20 25 30
Leu Glu Thr Ser Asp Leu Val Thr Val Val Leu Gly Gln Asp Ala Lys
35 40 45
Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Pro Asp Glu Gln Val Gly Gln Val
50 55 60
Ala Trp Ala Arg Val Asp Pro Asn Glu Gly Thr Arg Glu Leu Ala Leu
65 70 75 80
Leu His Ser Lys Tyr Gly Leu His Val Ser Pro Ala Tyr Glu Asp Arg
85 90 95
Val Glu Gln Pro Pro Pro Pro Arg Asp Pro Leu Asp Gly Ser Ile Leu
100 105 110
Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Glu Cys Arg Val
115 120 125
Ser Thr Phe Pro Ala Gly Ser Phe Gln Ala Arg Met Arg Leu Arg Val
130 135 140
Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn Pro Gly Pro Pro Leu Glu Glu
145 150 155 160
Gly Gln Gly Leu Thr Leu Ala Ala Ser Cys Thr Ala Glu Gly Ser Pro
165 170 175

25 Ala Pro Ser

<210> 13

<211> 180
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(180)
 <223> Ortólogo de 191P4D12 que contiene el dominio V

10 <400> 13
 Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp Gly Pro Glu Ala Trp Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ser Phe Thr Gly Arg Cys Pro Ala Gly
 20 25 30
 Glu Leu Glu Thr Ser Asp Val Val Thr Val Val Leu Gly Gln Asp Ala
 35 40 45
 Lys Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Ser Gly Glu Gln Val Gly Gln
 50 55 60
 Val Ala Trp Ala Arg Val Asp Ala Gly Glu Gly Ala Gln Glu Leu Ala
 65 70 75 80
 Leu Leu His Ser Lys Tyr Gly Leu His Val Ser Pro Ala Tyr Glu Gly
 85 90 95
 Arg Val Glu Gln Pro Pro Pro Pro Arg Asn Pro Leu Asp Gly Ser Val
 100 105 110
 Leu Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Glu Cys Arg
 115 120 125
 Val Ser Thr Phe Pro Ala Gly Ser Phe Gln Ala Arg Leu Arg Leu Arg
 130 135 140
 Val Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn Pro Gly Pro Ala Leu Glu
 145 150 155 160
 Glu Gly Gln Gly Leu Thr Leu Ala Ala Ser Cys Thr Ala Glu Gly Ser
 165 170 175
 Pro Ala Pro Ser
 180

15

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de fármaco y anticuerpo que comprende un anticuerpo anti-191P4D12 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada que consiste en el residuo de aminoácido 20 al residuo de aminoácido 136 de SEQ ID NO: 7 y una región variable de la cadena ligera que consiste en el residuo de aminoácido 23 al residuo de aminoácido 130 de la SEQ ID NO: 8, y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo está conjugado con monometil auristatina E (MMAE).
2. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en el residuo de aminoácido 20 al residuo de aminoácido 466 de la SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que consiste en el residuo de aminoácido 23 al residuo de aminoácido 236 de SEQ ID NO: 8.
3. Un conjugado de anticuerpo y fármaco que comprende un anticuerpo anti-191P4D12 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de un anticuerpo producido por un hibridoma depositado en la American Type Culture Collection (ATCC) N° de entrada PTA-11267, y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un anticuerpo producido por un hibridoma depositado bajo el número de entrada ATCC PTA-11267, y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo está conjugado con monometil auristatina E (MMAE).
4. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo producido por un hibridoma depositado bajo ATCC. N° de entrada PTA-11267, y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un anticuerpo producido por un hibridoma depositado bajo ATCC. N° de entrada PTA-11267.
5. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 1 ó 3, en el que el fragmento es un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv, Fd, dAb o scFv.
6. El conjugado de anticuerpo y fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano.
7. El conjugado de anticuerpo y fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo se produce recombinantemente.
8. El conjugado de anticuerpo y fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se conjuga con MMAE a través de una unidad enlazante.
9. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 8, en el que la unidad enlazante es escindible por enzimas.
10. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 8 ó 9, en el que la unidad enlazante forma un enlace con un átomo de azufre del anticuerpo o fragmento del mismo.
11. El conjugado de anticuerpo y fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el conjugado de anticuerpo y fármaco tiene la siguiente fórmula:



donde:

L es el anticuerpo anti-191P4D12 o fragmento del mismo,

(LU - D) es una unidad enlazante - resto de unidad farmacéutica, en donde:

LU es una unidad enlazante, y

D es MMAE; y

p es un número entero de 1 a 20.

12. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 11, en el que p varía de 1 a 10, o donde p varía de 2 a 5.

13. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 11 ó 12, en el que la unidad enlazante tiene la fórmula:



donde:

-A- es una unidad ensanchadora,

a es 0 ó 1;

-W- es una unidad de aminoácidos,

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

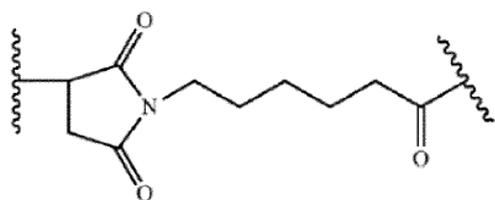
5 -Y- es una unidad espaciadora, e

y es 0, 1 ó 2.

14. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 13, en el que la unidad de aminoácido comprende valina-citulina (Val-Cit).

15. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 13 ó 14, en el que:

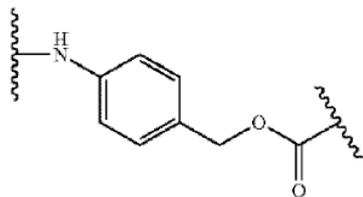
10 la unidad ensanchadora tiene la estructura de Fórmula IIIa:



Fórmula IIIa

la unidad de aminoácido es valina-citulina (Val-Cit); y

la unidad espaciadora tiene la estructura de Fórmula Xa:

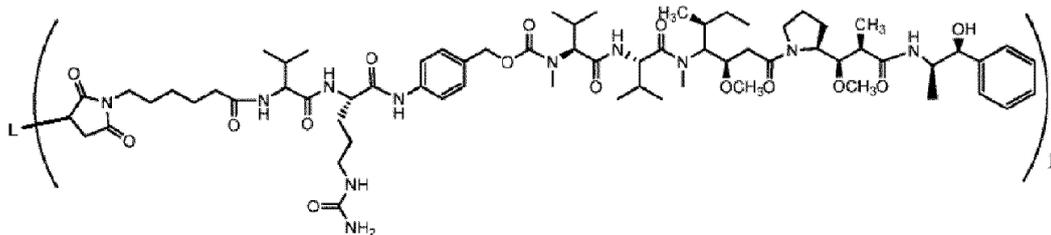


Fórmula Xa

15

16. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 15, en el que la unidad ensanchadora forma un enlace con un átomo de azufre del anticuerpo o fragmento del mismo; y en el que la unidad espaciadora está unida a MMAE a través de un grupo carbamato.

20 17. El conjugado de anticuerpo y fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en el que el conjugado de anticuerpo y fármaco tiene la siguiente estructura:



donde p varía de 1 a 10.

18. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 17, en el que p varía de 2 a 5.

25 19. Un conjugado de anticuerpo y fármaco, como se define en una de las reivindicaciones 1 a 18, para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto.

20. El conjugado de anticuerpo y fármaco para el uso de la reivindicación 19, en donde el cáncer es un cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello o cáncer de mama.
- 5 21. El conjugado de anticuerpo y fármaco para el uso de la reivindicación 20, en el que el cáncer es un cáncer de vejiga.
22. El conjugado de anticuerpo y fármaco para el uso de la reivindicación 21, en el que el cáncer de vejiga es un cáncer de vejiga avanzado.
23. El conjugado de anticuerpo y fármaco para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en el que el método comprende además administrar al sujeto radiación o un agente quimioterapéutico.
- 10 24. El conjugado de anticuerpo y fármaco para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, en el que el sujeto es un sujeto humano.
25. El conjugado de anticuerpo y fármaco para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, en el que el método comprende administrar al sujeto el conjugado de anticuerpo y fármaco en una cantidad de 0,5 mg/kg a 10 mg/kg.
- 15 26. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo y fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 en una forma de dosis unitaria humana.
27. La composición farmacéutica de la reivindicación 26, en la que la composición farmacéutica comprende además un agente quimioterapéutico.
- 20 28. La composición farmacéutica de la reivindicación 26, que comprende de 0,5 mg/kg a 10 mg/kg del conjugado de anticuerpo y fármaco.

Figura 1: La secuencia de ADNc (SEQ ID NO:1) y de aminoácidos (SEQ ID NO:2) de 191P4D12. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 264-1796 incluyendo el codón de parada.

```

1  ggccgctogttgttggccacagcgtgggaagcagctctgggggagctcggagctcccgato
61  acggcttcttggggtagctacggetgggtgtgtagaacggggccggggctggggctggg
121  tccccctagtgagacccaagtgcgagagggcaagaactctgcagcttccctgccttctgggt
181  cagttcccttattoaagtctgcagccggctcccagggagatctcgggtggaacttcagaaac
1      M P L S L G A E M W G P E
241  gctgggocagtctgcctttcaaccATGCCCTGTCCCTGGGAGCCGAGATGTGGGGCCTG
14   A W L L L L L L L A S F T G R C P A G E
301  AGGCCTGGCTGCTGCTGCTACTGCTGGCATTCAATTTACAGGCCGGTGCCTCCGGGGTG
34   L E T S D V V T V V L G Q D A K L P C F
361  AGCTGGAGACCTCAGACGTGGTAACTGTGGTGTGGGCUAGGACGCAAAACTGCCCTGCT
54   Y R G D S G E Q V G Q V A W A R V D A G
421  TCTACCGAGGGGACTCCGGCGAGCAAGTGGGGCAAGTGGCATGGGCTCGGGTGGACGCGG
74   E G A Q E L A L L H S K Y G L H V S P A
481  GCGAAGGGCCCCAGGAAGTACTGCACTCCAAATACGGGGCTTCAITGAGCCCCGG
94   Y E G R V E Q P P P P R N P L D G S V L
541  CTTACGAGGGCCCGCTGGAGCAGCCGCCGCCCCACGCAACCCCTGGACGGCTCAGTGC
114  L R N A V Q A D E G E Y E C R V S T F P
601  TCCTGCGCAACGCAGTGCAGGCGGATGAGGGCGAGTACGAGTGCCTGGGTCAGCACCTTCC
134  A G S F Q A R L R L R V L V P P L P S L
661  CCGCCGGCAGCTTCCAGGCGCGGCTGCGGGCTCCGAGTGTGGTGCCTCCCTGCCCTCAC
154  N P G P A L E E G Q G L T L A A S C T A
721  TGAATCCTGGTCCAGCACTAGAGAGGGCCAGGGCCTGACCCTGGCAGCCTCCTGCACAG
174  E G S P A P S V T W D T E V K G T T S S
781  CTGAGGGCAGCCAGCCCCAGCGTGCACCTGGGACACGGAGGTCAAAGGCACAACGTCCA
194  R S F K H S R S A A V T S E F H L V P S
841  GCCGTTCCCTCAAGCACTCCCGCTCTGCTGCCGTCACTCAGAGTCCACTTGGTGCCTA
214  R S M N G Q P L T C V V S H P G L L Q D
901  GCCGCAGCATGAATGGGCAGCCACTGACTTGTGTGGTGTCCCATCCTGGCCCTGCTCCAGG
234  Q R I T H I L H V S F L A E A S V R G L
961  ACCAAAGGATCACCCACATCCTCCACGTGTCTTCTTCTGCTGAGGCCTCTGTGAGGGGCC
254  E D Q N L W H I G R E G A M L K C L S E
1021 TTGAAGACCAAAATCTGTGGCACATTTGGCAGAGAAGGAGCTATGCTCAAGTGCCTGAGTG
274  G Q P P P S Y N W T R L D G P L P S G V
1081 AAGGGCAGCCCCCTCCCTCATACACTGGACACGGCTGGATGGGCCTCTGCCAGTGGGG
294  R V D G D T L G F P P L T T E H S G I Y
1141 TACGAGTGGATGGGGACACTTTGGGCTTCCCCCACTGACCACTGAGCACAGCGGCATCT
314  V C H V S N E F S S R D S Q V T V D V L
1201 ACGTCTGCCATGTCAGCAATGAGTTCTCCTCAAGGGATTCCTCAGGTCACCTGTGGATGTT
334  D F Q E D S G K Q V D L V S A S V V V V

```


Figura 2A: La secuencia de ADNc (SEQ ID NO:3) y de aminoácidos (SEQ ID NO:4) de la cadena pesada de Ha22-2(2,4)6.1. El doble subrayado es la secuencia líder, el subrayado sencillo es la región variable de la cadena pesada y el subrayado sencillo con una línea de puntos es la región constante de IgG1 humana

M E L G L C W V F L V A I L E

```

1  GGTGATCAGCACTGACACAGAGGACTCAACCAAGAGGTGGGGCTGTCGCGGGTTTCCTGATTTATTTAAG
  ·G V Q C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S
76  AGGTTGCCAGTGTGAGGTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGTGGTACAGCCGCGGGGGTCCCTCAGACTCTC
  ·C A A S G F T F S S Y N M N W V R Q A P G K G L E
151  CTGTGCAGCCCTCTGGATTCACTCTAGTACCTATAACATGCAACTGGGTCCGCCAGCCCTCCAGGGAAAGGGCTTGA
  ·W V S Y I S S S S S S T I Y Y A D S V K G R F T I S
226  GTGGTTTCATACATAGTAATAGTGTAGTACCTATACCTACAGCAGACTCTGTGAGGSCCGATTCAGCTATCC
  ·R D N A K N S L S L Q M N S L R D E D T A V Y Y C
301  CAGAGACAAITCCAGAACTCACTGTCTCTGCAAAATGAACAGTCTGAGAGACACAGACACCGGCTGTGTATTAAGT
  ·A R A Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S A S T K
376  TGCGAGGCATCTACTCTAGGTATGGAAGTGGGKCCAGGGAAOCAGGTCACCGTCTCCCTCAGCCCTCCACAA
  ·G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V
451  GGGCCCATCGGTTCTTCCCTCTGCACCCCTCTCCAGAGCACCTCTGGGGGACAGGGCCCTGGGGCTGGCTGGT
  ·K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P
526  CAGGACTACTTCCCGAACCCTGACCGTGTCTGTGCAACTCAGGCGCCCTGACAGCGCCCTGCACACCTTCC
  ·A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q
601  GGCTTCTCAGAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCTCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCA
  ·T Y F T C N V N H K P S N T R V D K R V E P K S C D
676  GACTTACATCTGCAAGTCAATCAAGCCCAAGCAACCAAGGTGACACAGAGGTTGAGCCCAATCTTGTGA
  ·K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K
751  CAAAATCAGACATGCCCAAGTGGCCAGTCTGCAACTCTGGGGGACCGCTCAGTCTTCTTCCCTCCCAAA
  ·P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P
826  ACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGAACCCTGAGGTCACTGCGTGGTGGTGGACCTCAGCCCGAGAGCC
  ·E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y
901  TGAGTCAAGTCAACTGGTCTGGAGCGGTGGAGTCCATAATGCCAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTA
  ·N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y R C
976  CACAGCAGCTAGCTGTGGTGGTCTCCAGCCCTCTCCCGCAGGACTGGCTCAATCCGAGGAGTACAGT
  ·K V S N K A E L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P
1051  CTAGTCTCCAGCAAGTCTTCCCAATCCATCCCAAGCAAGTCTTCCAGCAAGTCTTCCAGCAAGTCTTCC
  ·Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G
1126  ACNFTGATACCTTCTCCCAATCCCAATCCCAAGCAAGTCTTCCAGCAAGTCTTCCAGCAAGTCTTCC
  ·F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
1201  CTCTTATCCAGCCACATCCGCTCGAGTGGGAGGCAATGGCCAGCXXGAGACAACTACAGACCAAGCCCTCC
  ·V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N
1276  CTTCTGAGTCTGAGGCTCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
  ·V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G
1351  GTCCTTCTCAATCTCCGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
  ·K *
1426  TAATAA
    
```

Figura 2B: La secuencia de ADNc (SEQ ID NO:5) y de aminoácidos (SEQ ID NO:6) de la cadena ligera de Ha22-2(2,4)6.1. El doble subrayado es la secuencia líder, el subrayado sencillo es la región variable de la cadena ligera y el subrayado sencillo con una línea de puntos es la región constante kappa humana

M D M R V P A Q L L G L L L L W F

```

1  AGTCAGACCCAGTCCAGGACACAGGATGCAATGAGGGTCCCGCTCAGCTCTCCGGCTCCCTGCTGCTCCTG
  P G S R C D I Q M T Q S P S S V S A S V G E R V T
76  CCAGGTTCCAGATGCCACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTTCTGCACTCTGTGGAGACAGAGTCACC
  I T C R A S Q G T S G W L A W Y Q Q K P G K A P K
151  ATCACTTCTGCGGTCAGTCAAGGTTMTAGGGCTGGTACCCCTGTTATCAGGCAAAACCGAGGAAAGCCCTAAG
  F L I Y A A S T L Q S G V P S R F S G S G T D
226  TCCCTGATCTGAGGTCGATCTACTTTCGAAAGTGGGGTCCCTCCAGGTTCCAGCGGTCAGTGGATCTGGGACAG
  F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A N S F P
301  TCCAGCTCCACCAATCAGCAGCTGCGAGCTGAGAGATTTTCCACTTACTACTGTCAACAGGCTTACAGTTCCT
  P T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P
376  CCCACTTCCCGCCAGCCACCAAGGTTGAGATCAAAACCAACTGTGGCTGACCATCTGTCTCTTCTTCCCGCA
  S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K
451  TCTGATGAGCAGTGAATCTGAACTGCTCTGTTGTTGTGCTGCTGCTGAATAACTTCTTCCCGCAGAGGCCAAA
  V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V F E Q D S K D
526  CTACAGTGGAGGTGGATAACCGCTCCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTCTACAGAGCAGGACAGCAAGCAC
  S T T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E
601  AGCACTTACGCTCAGCAGCCCTGACCTGAGCAAGCAGACTACAGAAACCAAAAGTCTCAGCGCTGGGAA
  V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C *
676  GTCACCAATCAGGGCTGAGCTGGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG
    
```

Figura 3A: La secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:7) de la cadena pesada de Ha22-2(2,4)6.1. El doble subrayado es la secuencia líder, el subrayado sencillo es la región variable de la cadena pesada y el subrayado sencillo con una línea de puntos es la región constante de IgG1 humana

```

1  MELGLCWVFLVAILEGVOCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
51 YNMNVWRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYADSVKGRFTISRDNAKNSLSL
101 QMNSLRDEDTAVYYCARAYYYGMDVWGQGTFTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
151 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
201 LSSVVTYPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHCTCPCPA
251 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKENWYVDG
301 VEVHNAKTKEREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
351 IEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKRNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
401 ESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
451 LHNHYTQKSLSLSPGK

```

Figura 3B: La secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:8) de la cadena ligera de Ha22-2(2,4)6.1. El doble subrayado es la secuencia líder, el subrayado sencillo es la región variable de la cadena ligera y el subrayado sencillo con una línea de puntos es la región constante kappa humana

```

1  MDMRVPAQLLGLLLWFEGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQG
51 ISGWLAWYQOKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
101 QPEDFATYYCQQAANSFPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
151 TASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST
201 LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

```

Figura 4A: Alineación de la cadena pesada de Ha22-2(2,4)6.1 (una parte de SEQ ID NOS:3, 4) frente a la línea germinal de IgG humana VH3-48 (SEQ ID NO: 9)

```

ID#          <-----FWR1-----
  89          E V Q L V E S G G L V Q F G G S L R L S C A
             GAGGTGCAGCIGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTACAGCCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG 158
  1          E V Q L V E S G G L V Q F G G S L R L S C A
             ..... 70
-----
ID#          <-----CDR1-----> <-----FWR2-----
159          CCTCT GGATTCACCTCAGTAGCTATAAC ATGAACGGTCCGCCAGGCTCCAGGAGGGGCTGGAGTG 228
             A S G F T F S S Y S M N W V R Q A P G K G L E W
             ..... 140
-----
ID#          <-----CDR2-----> <-----FWR3-----
229          V S Y I S S S S T I Y Y A D S V K G R F T I 298
             GGTTTCATAC ATTAGTAGTAGTAGTAGTACCATA TACTACGAGACTCTGTGAGGGCCGATTCACCATC
             V S Y I S S S S T I Y Y A D S V K G R F T I 210
             .....
             <-----FWR3-----
299          S R D N A K N S L S L Q M N S L R D E D T A V 368
             TCCAGAGACATGCCAAGACTCACTGTCTGTGCAATGAACAGCTGAGACGAGGACCGCTGTGT
             S R D N A K N S L Y L Q M N S L R D E D T A V 280
             .....
             <-----FWR3-----
368          S R D N A K N S L Y L Q M N S L R D E D T A V 280
             .....
             <-----FWR3-----

```


Figura 4B: Alineación de la cadena ligera de Ha22-2(2,4)6.1 (una parte de SEQ ID NOS:5, 6) frente a la línea germinal de IgG humana L5 (SEQ ID NO: 10)

```

ID#<-----FWR1----->
  2(,4)6.1 91  D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C
GACATCCAGATGACCCAGTCCCAUUTTCCTGTCATGTCGGAGACAGATCACCACACTGTC 160
  98.6(283/287) L5  D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C
100(35/35) JK4  .....A..... 70
ID#<-----CDR1-----> <-----FWR2----->
  2(,4)6.1 161  R A S Q G I S G W L A W Y Q Q K P G K A F K F L
GGGCGAGT CAGGGTATTAGCGGTGG TTAGCCTGGTATCAGCAACAGCGGAAGCCCTAAGTTCCT 230
  98.6(283/287) L5  R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K P G K A F K L L
100(35/35) JK4  .....A.....C.... 140
ID#<-----CDR2-----> <-----FWR3----->
  2(,4)6.1 231  I Y A A S T L Q S G V P S R F S G S G S G T D
GATCTAT GCTGCATCC ACTTTGCAAGTGGTCCATCAAGSTTCAGGGCCAGTGGATCTGGACAGAT 300
  98.6(283/287) L5  I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D
100(35/35) JK4  .....G..... 210
ID#<----->
  2(,4)6.1 301  F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A N S
TTCACTCCACCATCAGAGCCTGAGCCTGCAAGATTTTCAGACTACTATTGT CACAGGCTACAGTT 370
  98.6(283/287) L5  F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A N S
100(35/35) JK4  ..... 290
ID#<----->
  2(,4)6.1 371  F P P T F G G T K V E I K
TCCCTCCACTTTCGGGGAGGACCAAGTGGAGATCAAC 412
  98.6(283/287) L5  F P P
100(35/35) JK4  ..... 287
  98.6(283/287) L5  ..... 281
100(35/35) JK4  4 ..... 38
  
```

Figura 5A: Unión del Mab Ha22-2(2,4)6.1 usando citometría de flujo

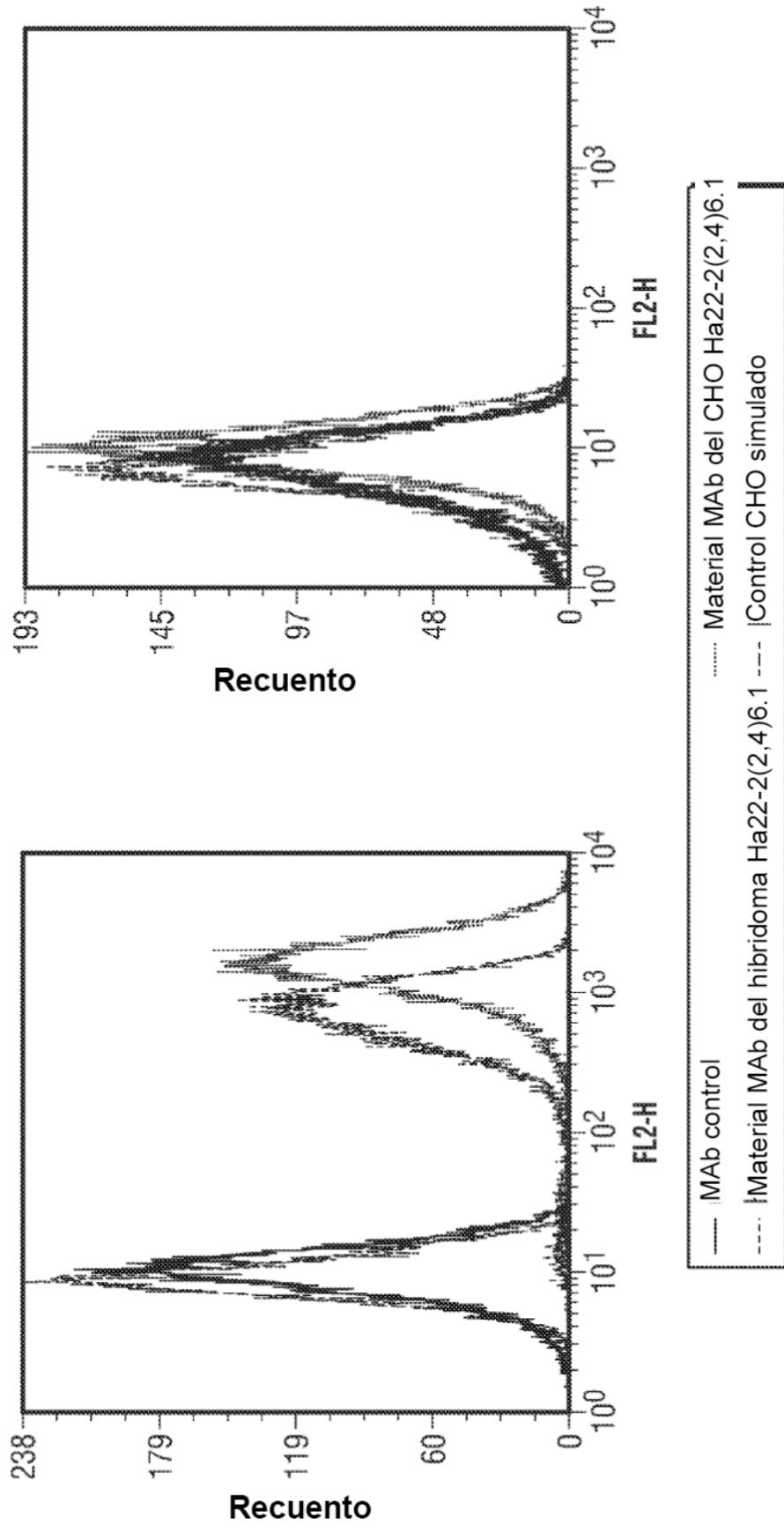


Figura 5B: Unión del Mab Ha22-2(2,4)6.1 usando ELISA

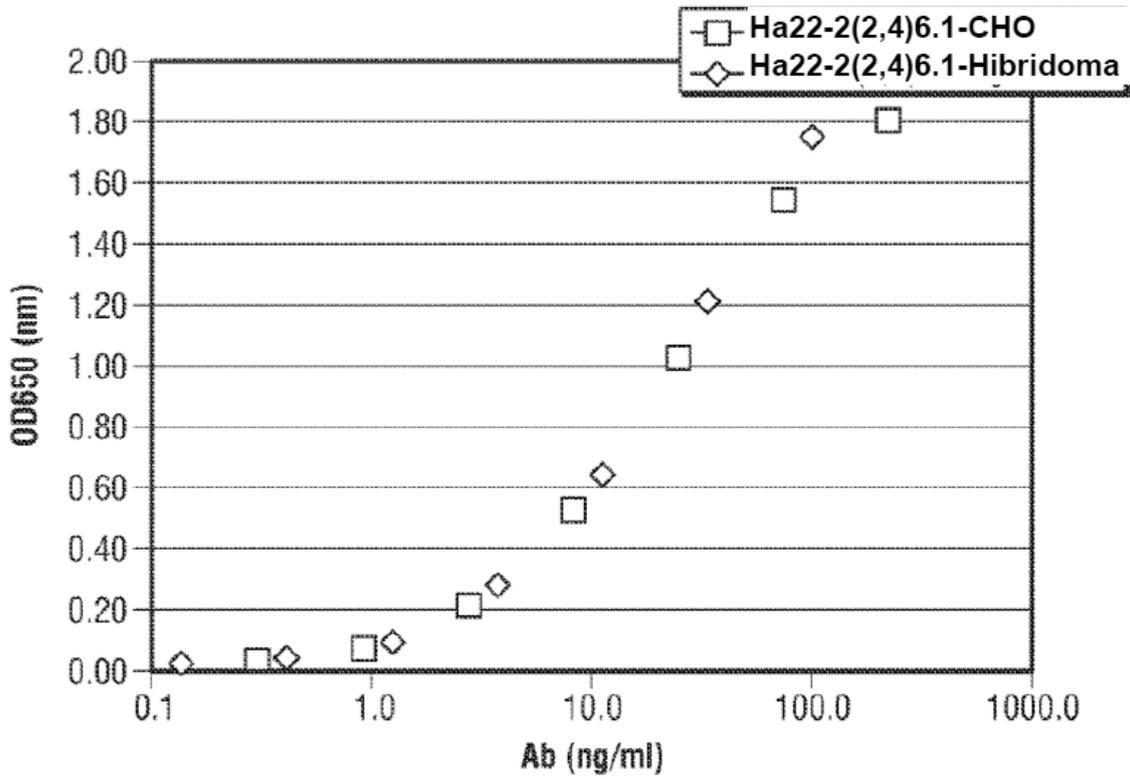
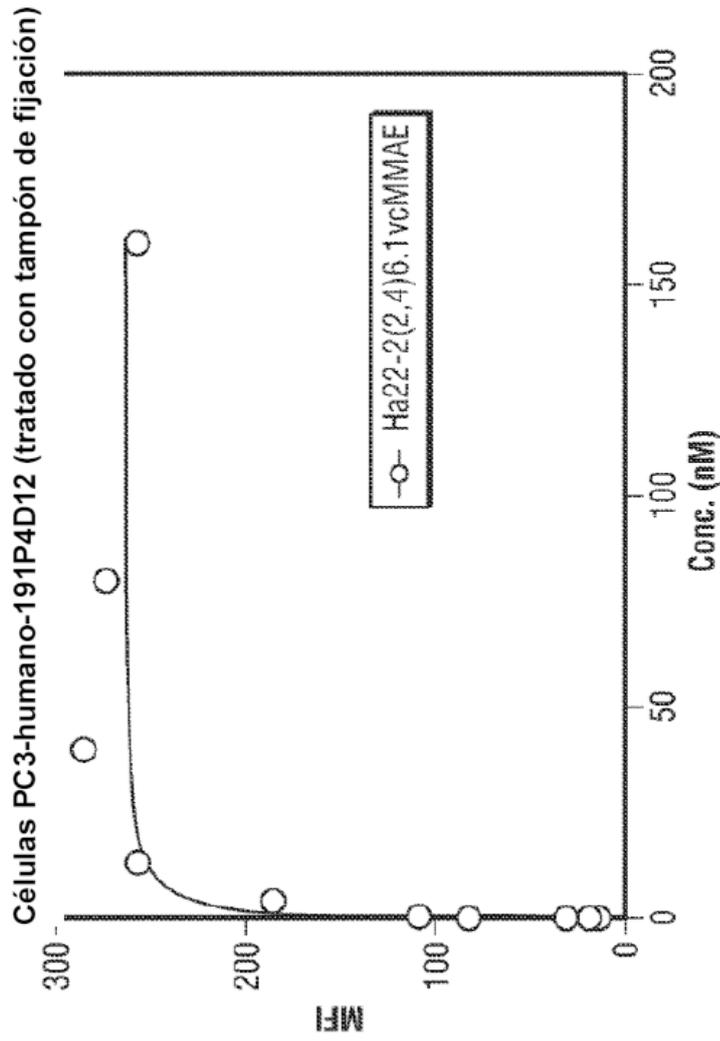


Figura 6: Determinación de la afinidad Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE mediante FACS usando PC3-humano-191P4D12

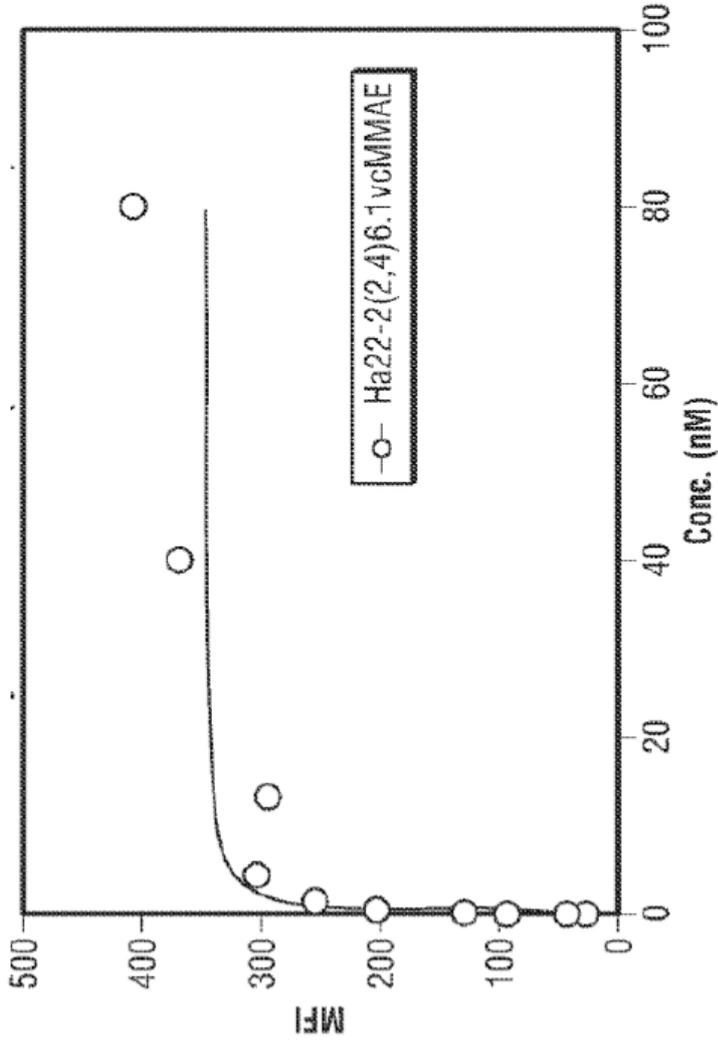


| Valores MFI (mM) | Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE | |
|------------------|----------------------|--|
| | Lot vcE-03 | |
| 160 | 257 | |
| 80 | 273 | |
| 40 | 285 | |
| 13.33 | 256 | |
| 4.44 | 183 | |
| 1.48 | 183 | |
| 0.49 | 105 | |
| 0.16 | 78 | |
| 0.05 | 26 | |
| 0.02 | 14 | |
| 0.01 | 9 | |
| 0.000 | 1 | |

| | |
|---------|----------------------|
| Bmax | Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE |
| | Lot vcE-03 |
| Kd (nM) | 265 |
| | 0.69 |

Figura 7: Determinación de la afinidad de Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE mediante FACS usando PC3-cinómologas-191P4D12

Células PC3-cinómologas-191P4D12 (tratado con tampón de fijación)



| Valores MFI (mM)) | Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE | |
|-------------------|----------------------|--|
| | Lot vcE-03 | |
| 160 | 375 | |
| 80 | 403 | |
| 40 | 364 | |
| 13.33 | 288 | |
| 4.44 | 298 | |
| 1.48 | 248 | |
| 0.49 | 196 | |
| 0.16 | 122 | |
| 0.05 | 86 | |
| 0.02 | 34 | |
| 0.01 | 19 | |
| 0.000 | 1 | |

| | |
|---------|----------------------|
| Bmax | Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE |
| | Lot vcE-03 |
| Kd (nM) | 343 |
| | 0.34 |

Figura 8: Determinación de la afinidad de Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE mediante FACS usando PC3-rata-191P4D12

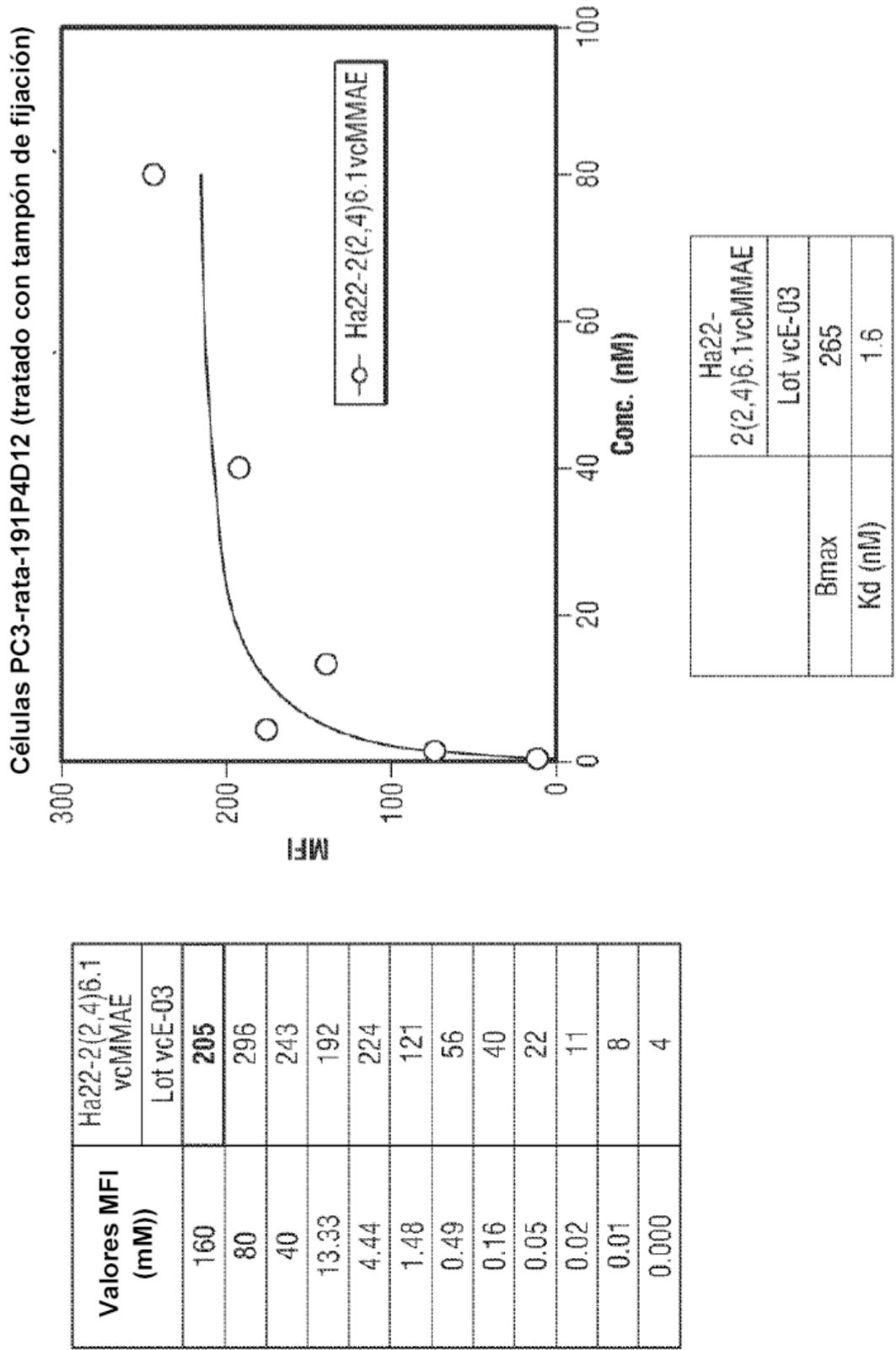
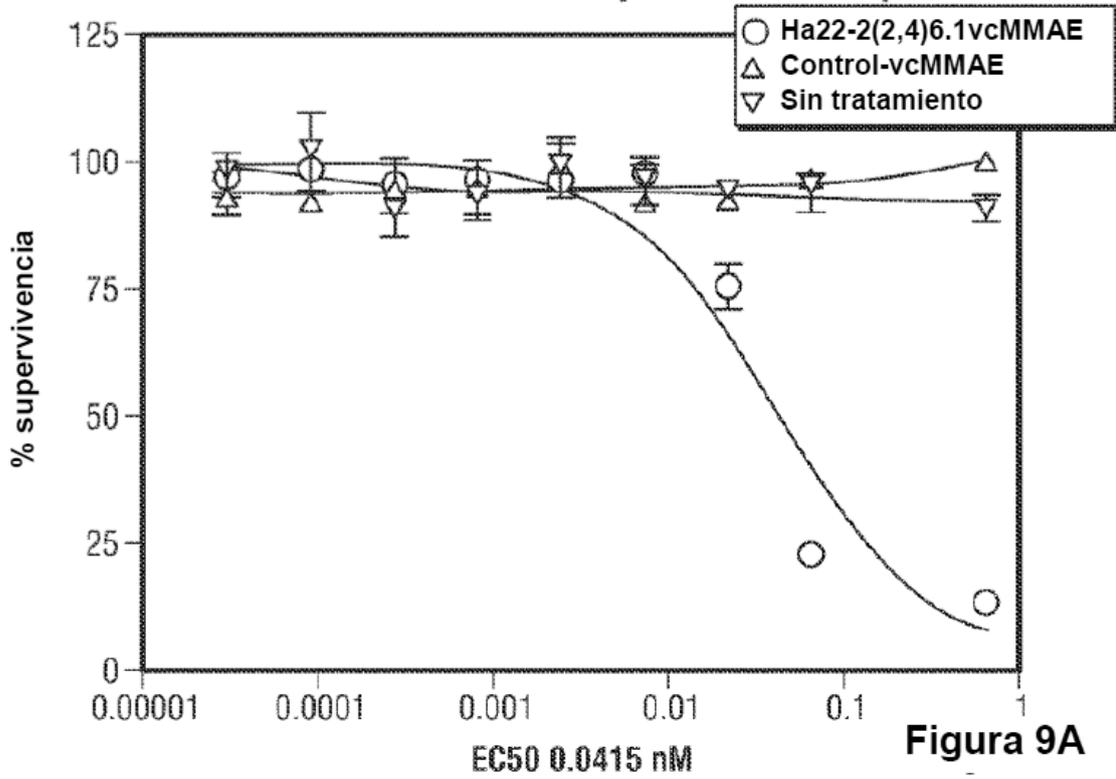


Figura 9: Citotoxicidad celular mediada por Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE PC-3 Humano-191P4D12: eliminación 4 días/1500 células por pocillo



PC-3 cino-191P4D12: eliminación 4 días/1500 células por pocillo

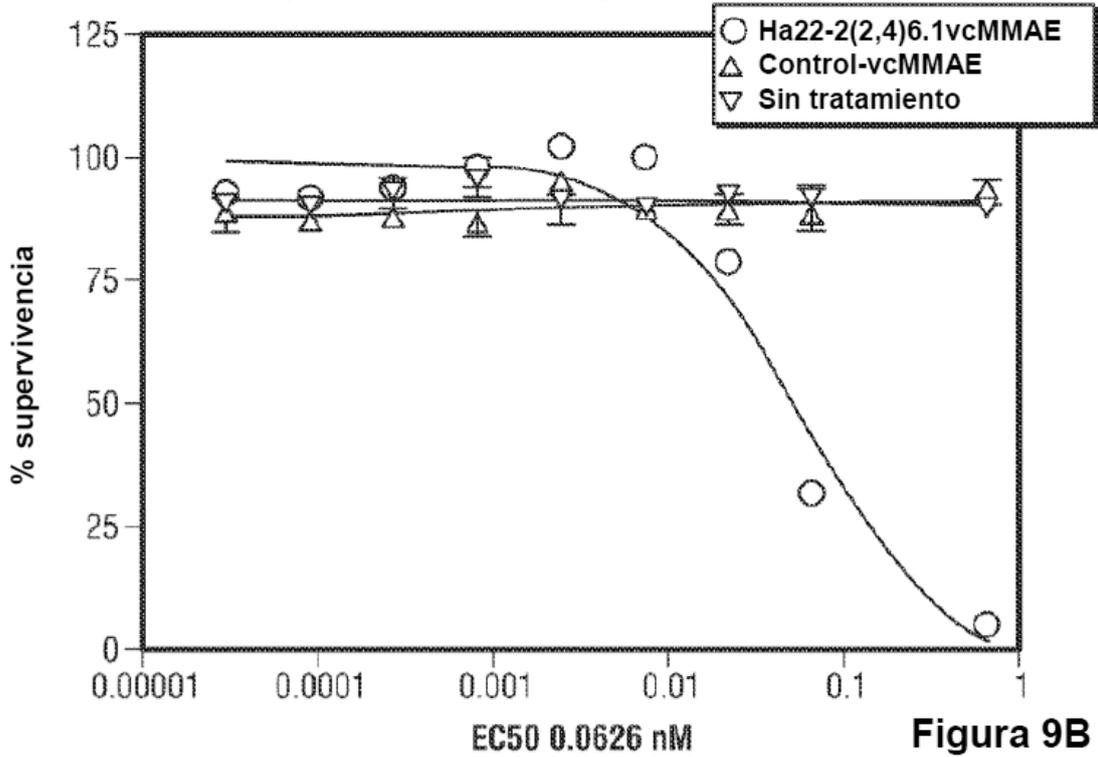
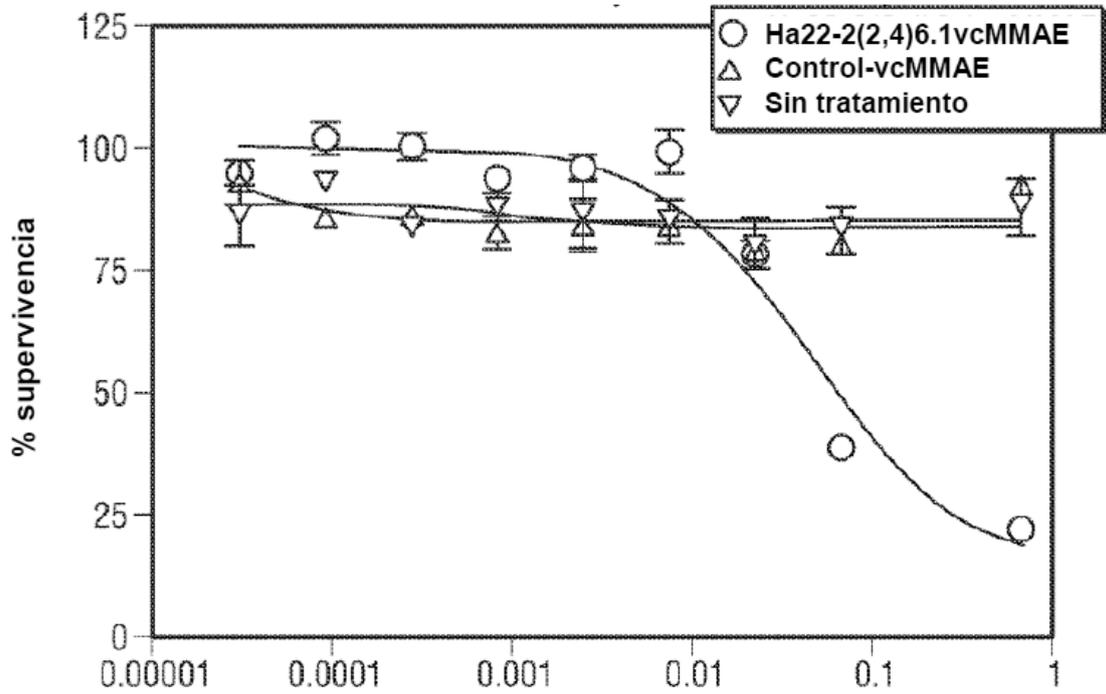


Figura 9: Citotoxicidad celular mediada por Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE PC-3 Rata-191P4D12: eliminación 4 días/1500 células por pocillo



EC50 0.0472 nM

Figura 9C

PC-3 Neo: eliminación 4 días/1500 células por pocillo

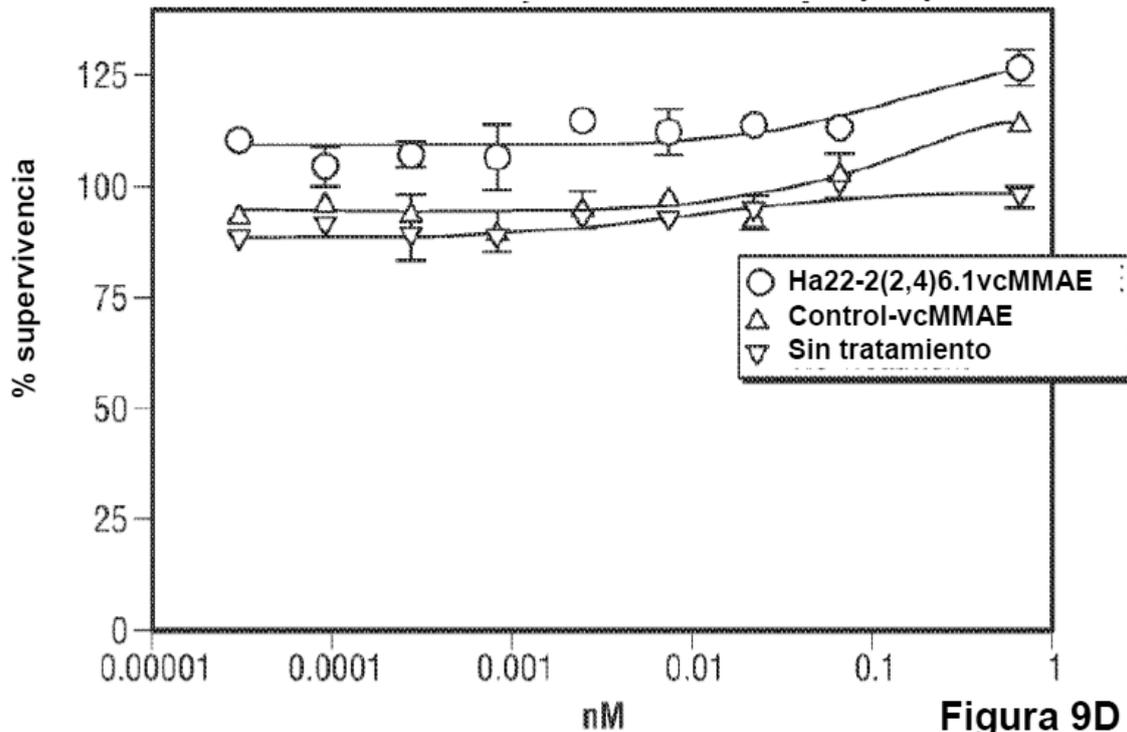


Figura 9D

Figura 10: Mapeo del dominio de MAb Ha22-2(2,4)6.1 por FACS

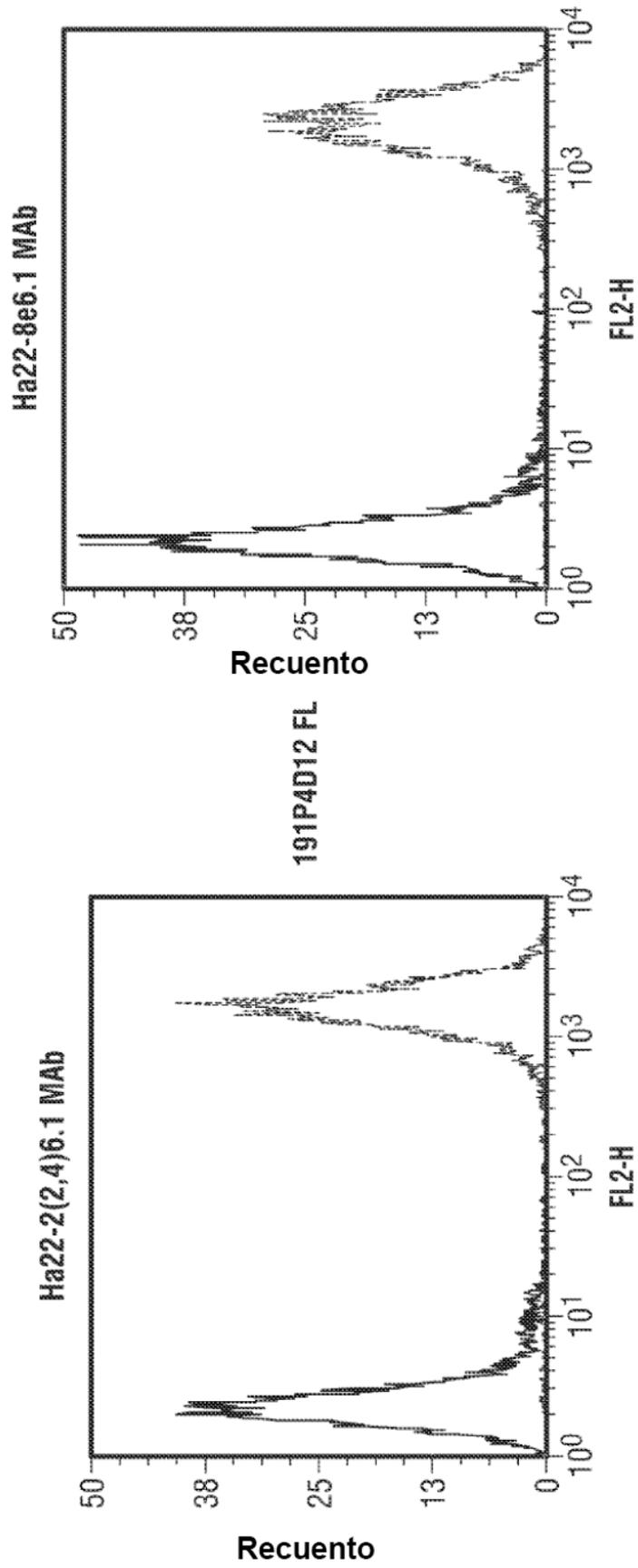


Figura 10 (Continuación): Mapeo del dominio de MAb Ha22-2(2,4)6.1 por FACS

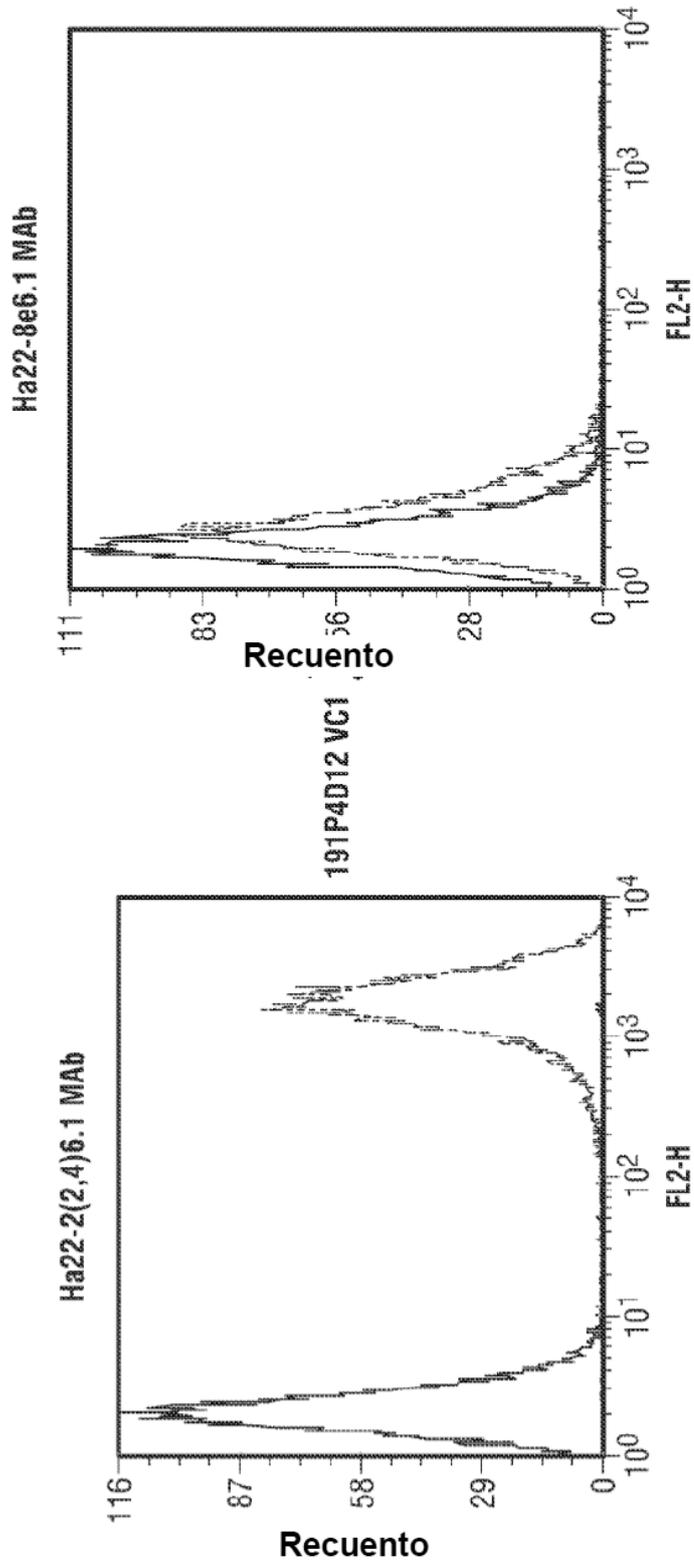


Figura 10 (Continuación): Mapeo del dominio de MAbs Ha22-2(2,4)6.1 por FACS

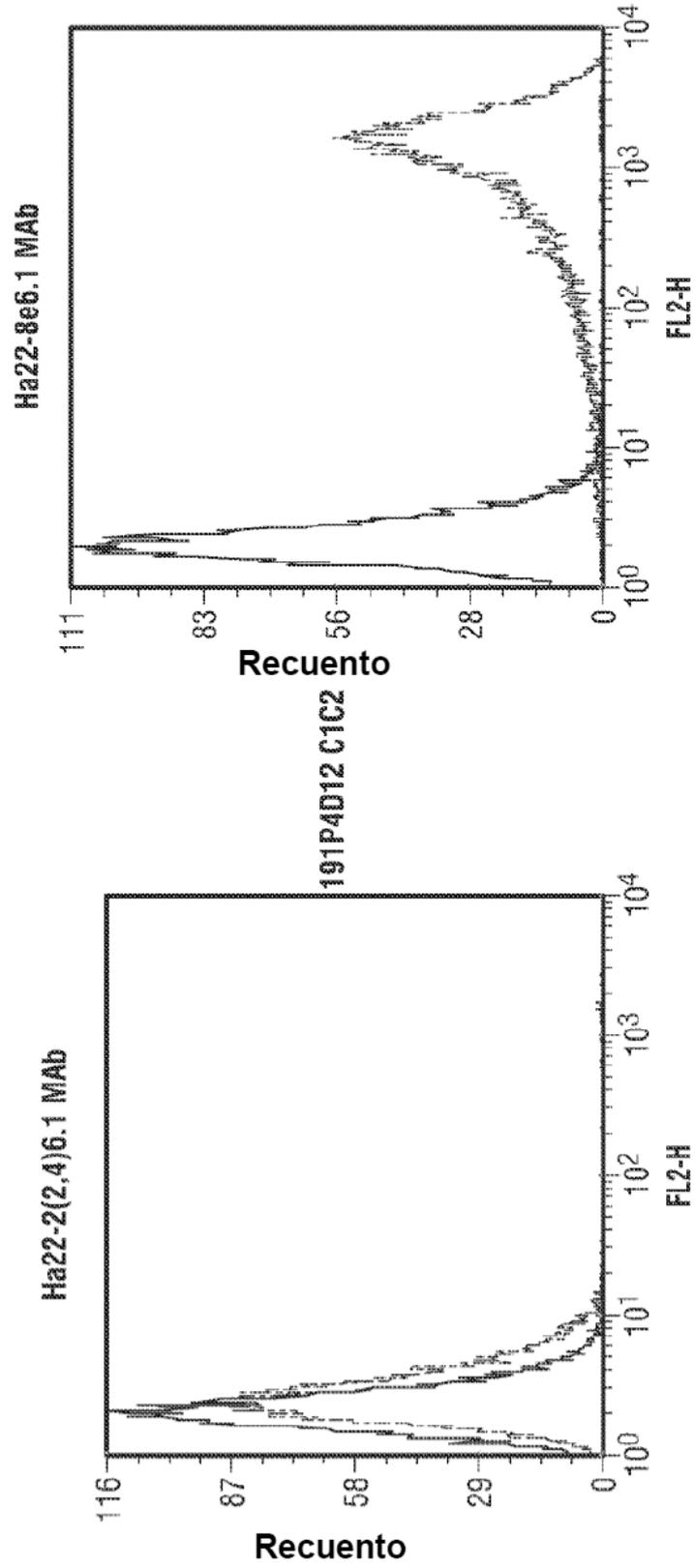
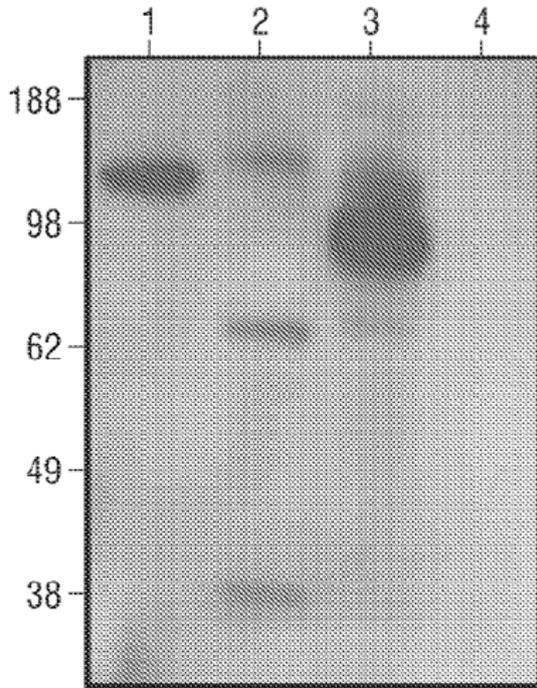
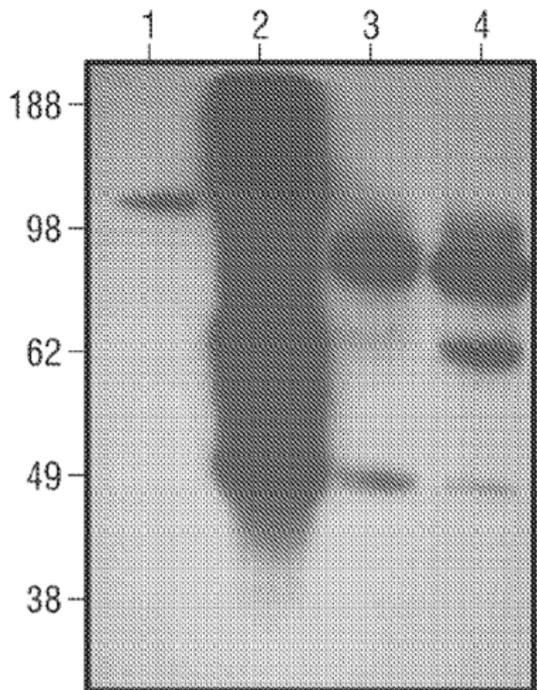


Figura 11: Mapeo del dominio de MAb Ha22-2(2,4)6.1 por Análisis de transferencia Western



Sondado con Ha22-2(2,4)6.1-biotina y estreptavidina-HRP

- ECD de cadena completa 191P4D12, fusión mFc
- 191P4D12 (aa1-147, Dominio V), fusión mFc
- 191P4D12 (aa1-242, Dominio VC1), fusión mFc
- 191P4D12 (aa1-31, 147-346, Dominio C1C2), fusión mFc



Sondado con conjugado de HRP anti-ratón de cabra

- ECD de cadena completa 191P4D12, fusión mFc
- 191P4D12 (aa1-147, Dominio V), fusión mFc
- 191P4D12 (aa1-242, Dominio VC1), fusión mFc
- 191P4D12 (aa1-31, 147-346, Dominio C1C2), fusión mFc

Figura 12: Evaluación de MAb Ha22-2(2,4)6.1 en el modelo de formación de tumor subcutáneo de xenoinjerto de cáncer de pulmón humano AG-L4 en ratones SCID

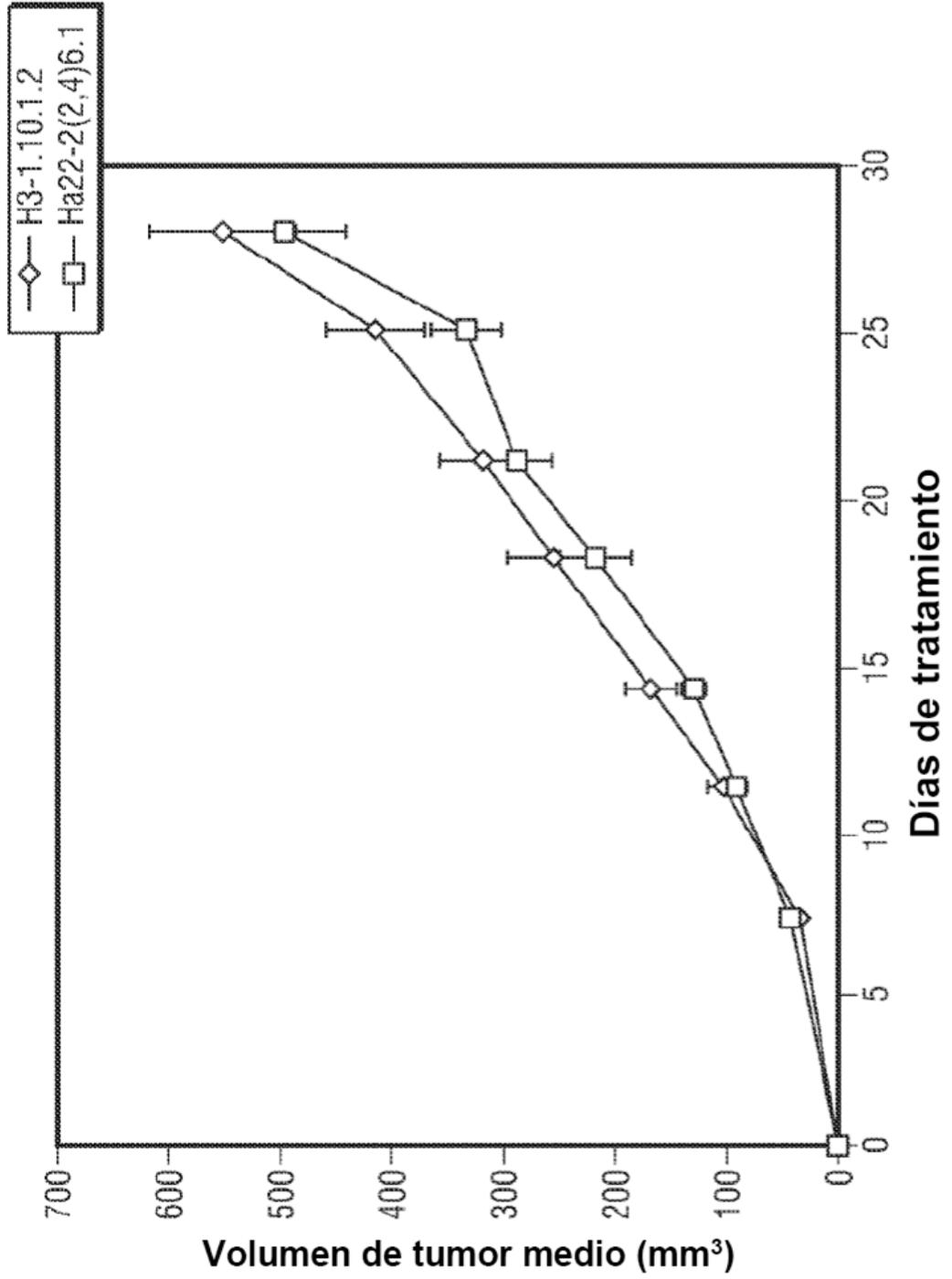


Figura 13: Evaluación de MAb Ha22-2(2,4)6.1 en el modelo de formación de tumor subcutáneo de xenoinjerto de cáncer de páncreas humano HPAC en ratones SCID

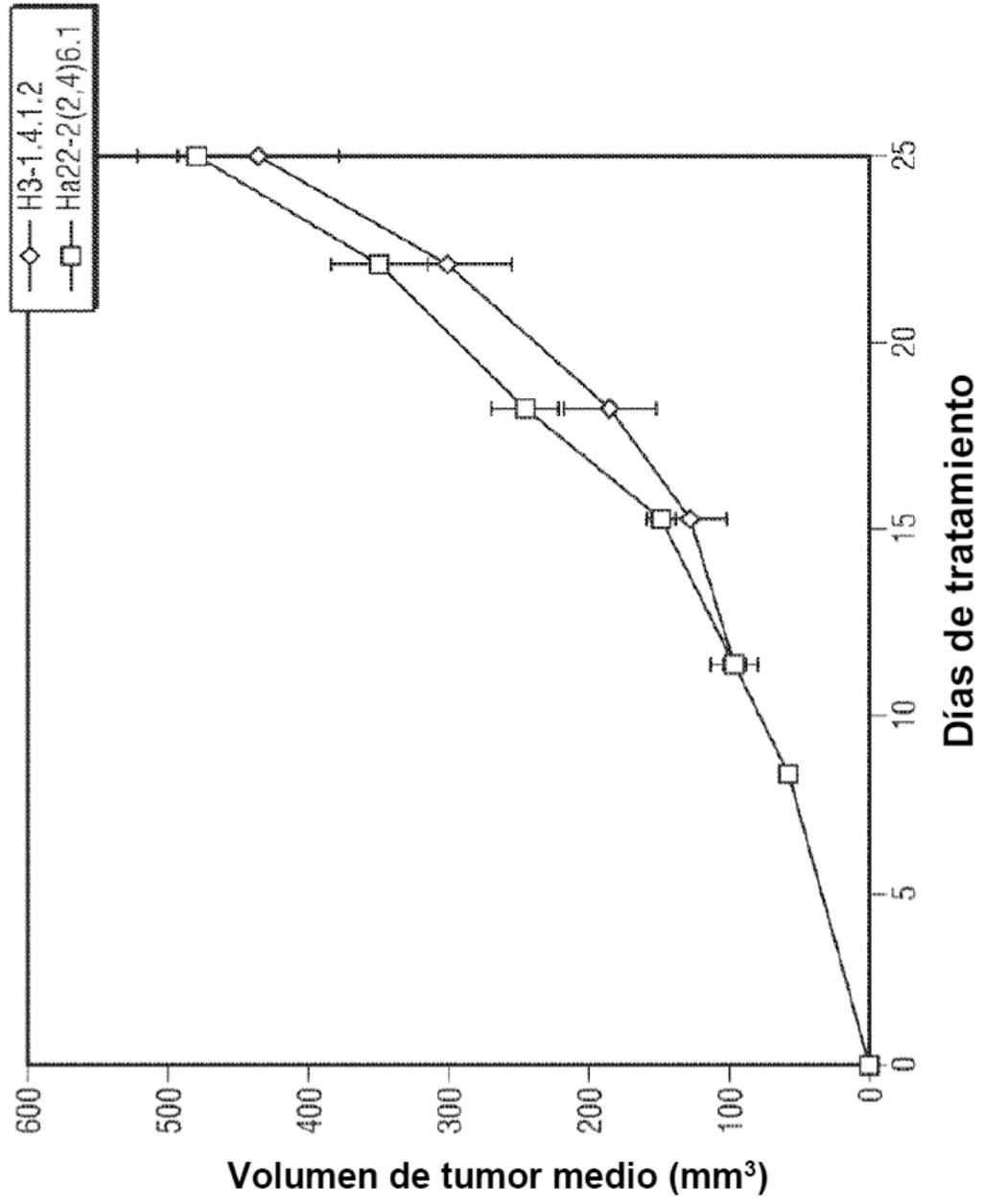


Figura 14: Evaluación de MAb Ha22-2(2,4)6.1 en el modelo de formación de tumor subcutáneo de xenoinjerto de cáncer de páncreas humano AG-Panc3 en ratones SCID

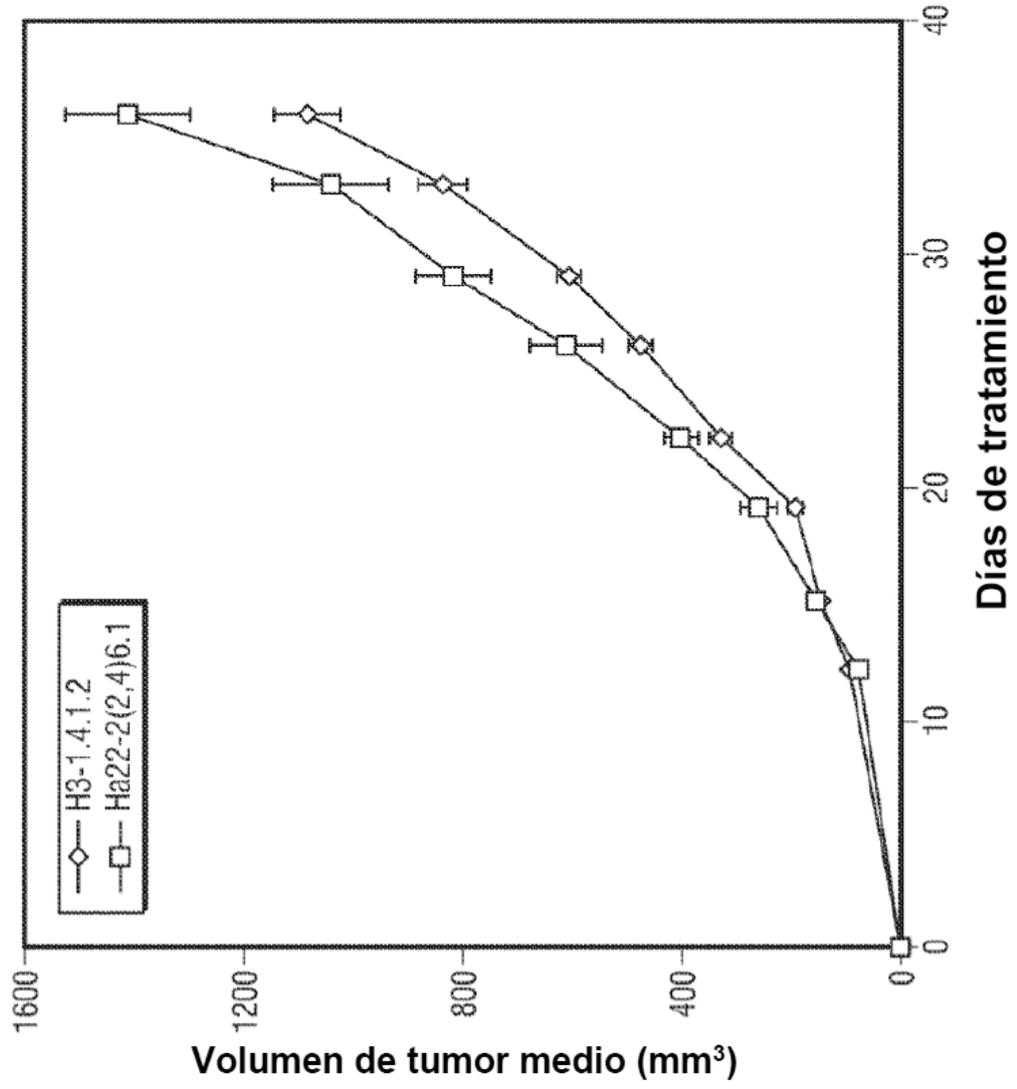


Figura 15: Eficacia de Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE en el xenoinjerto de cáncer de pulmón humano AG-L4 en ratones SCID

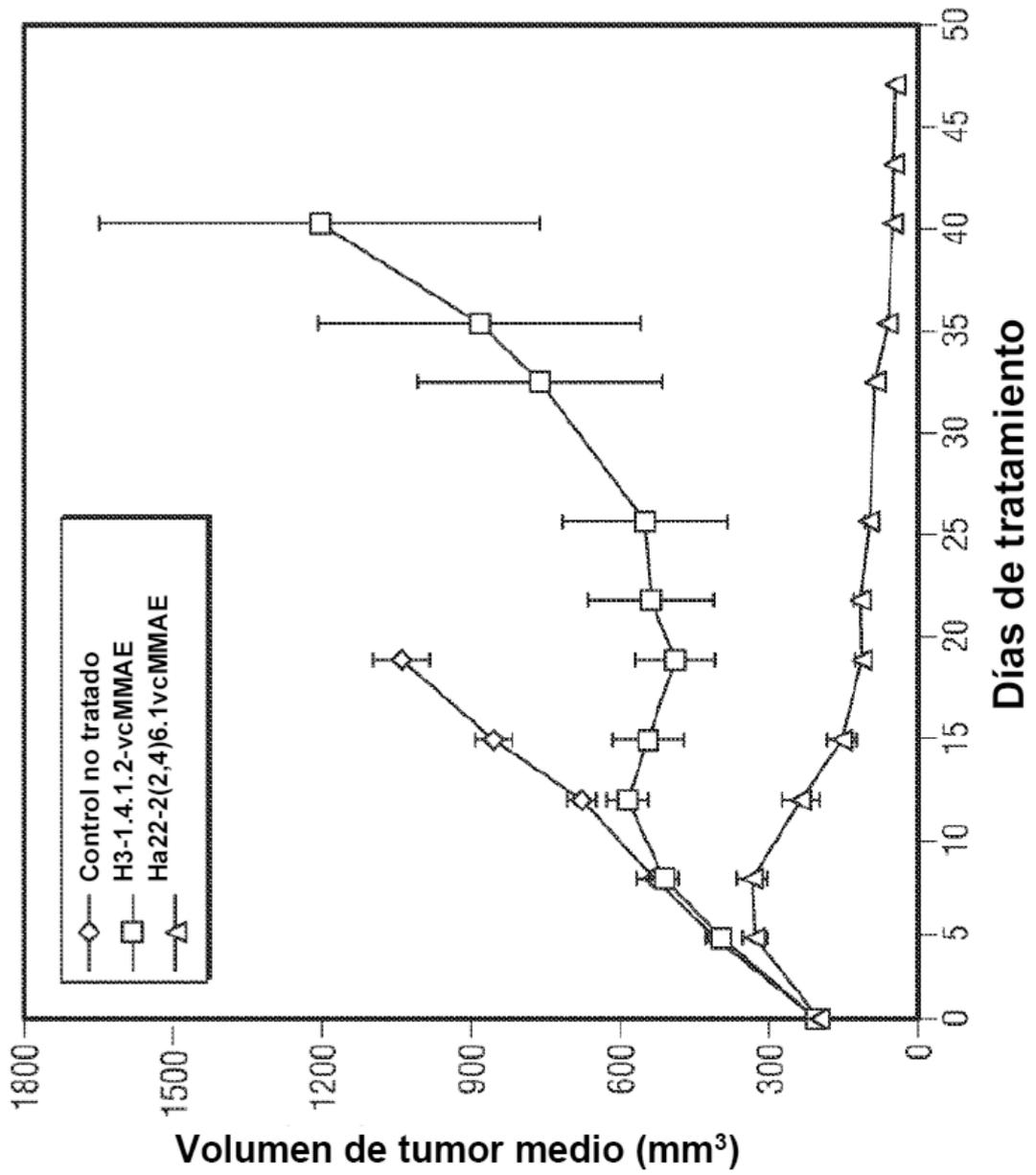


Figura 16: Eficacia de Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE en el xenoinjerto de cáncer de mama humano establecido subcutáneo BT-483 en ratones SCID

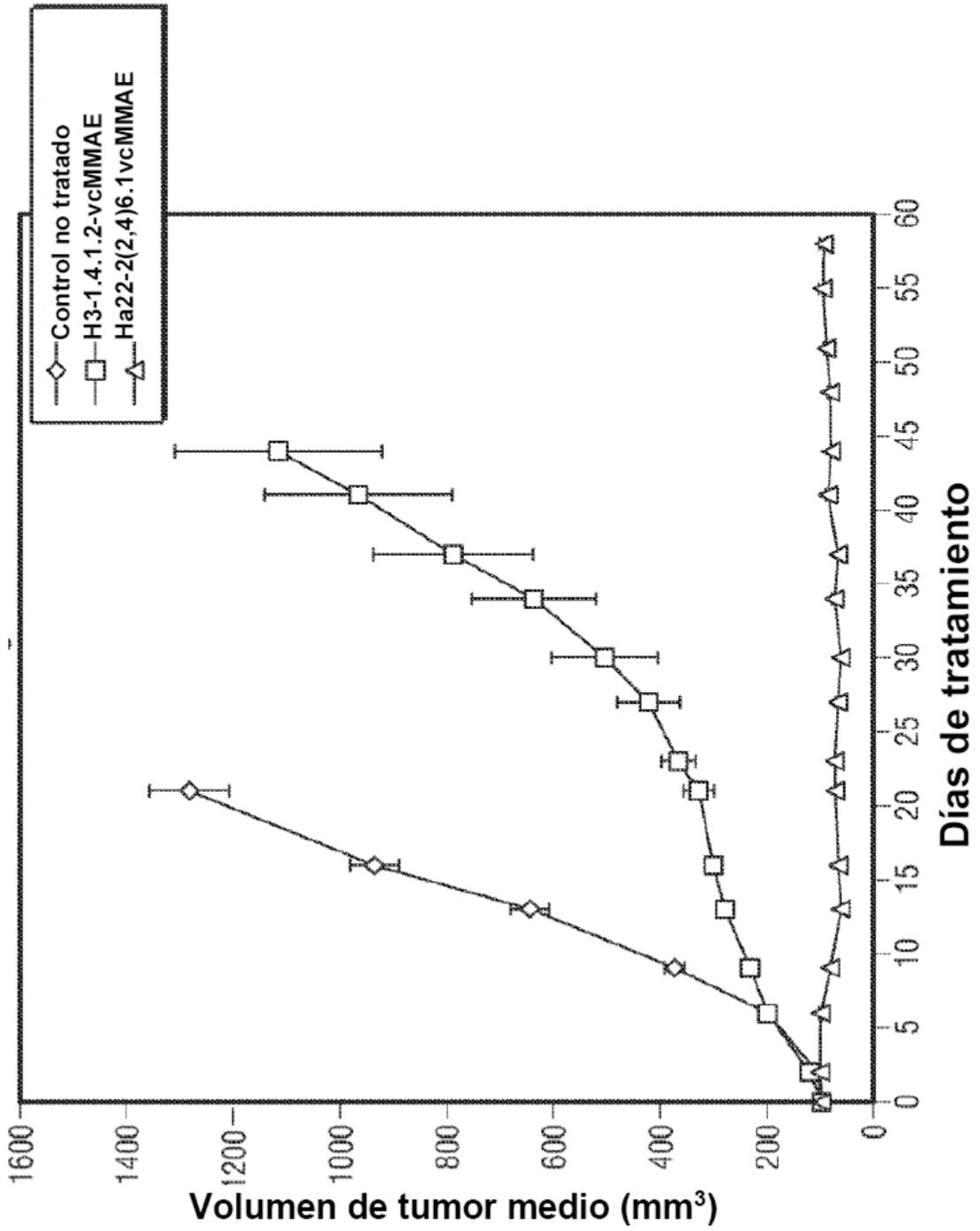


Figura 17: Eficacia de Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE en el xenoinjerto de cáncer de vejiga humano establecido subcutáneo AG-B1 en ratones SCID

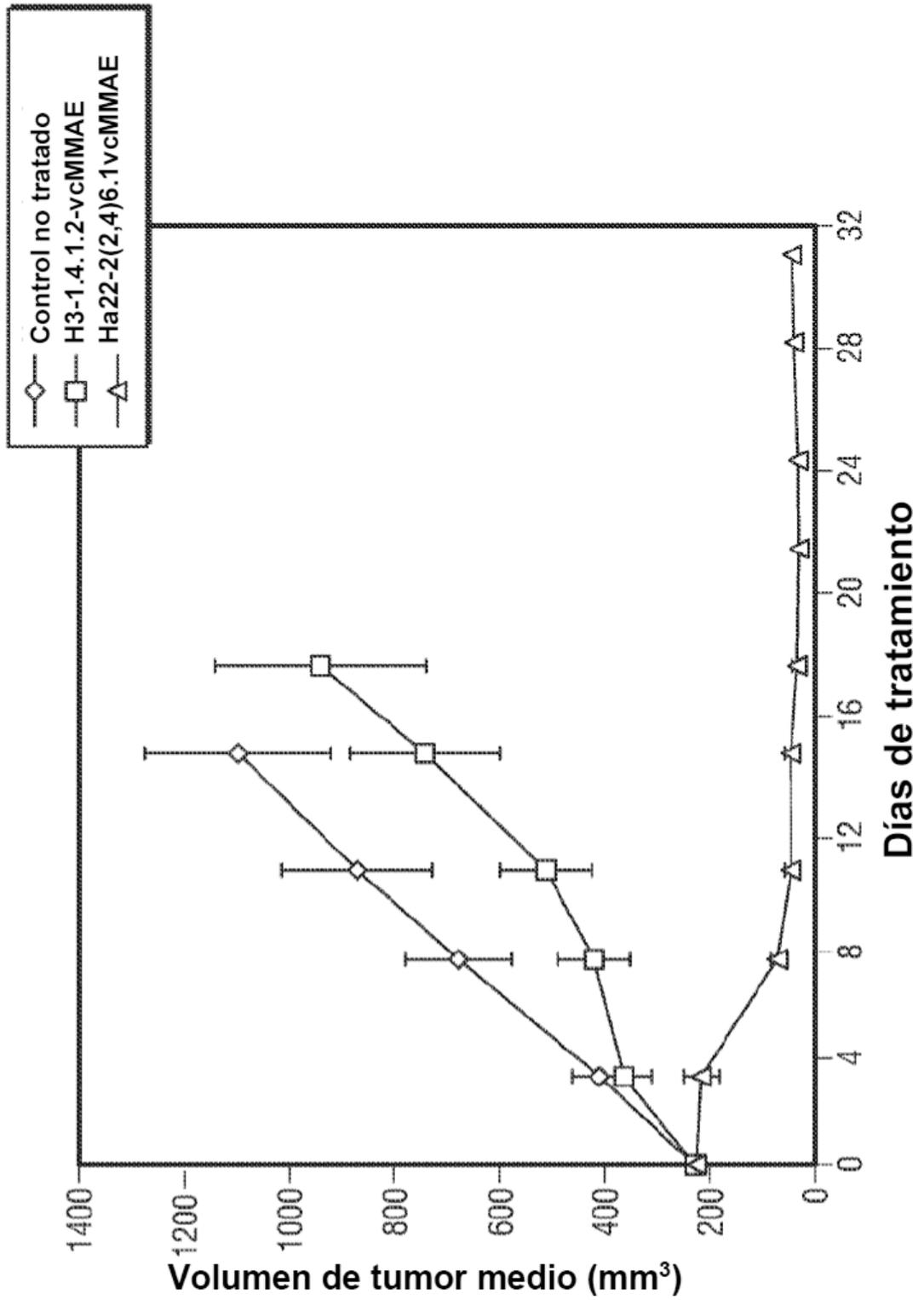


Figura 18: Eficacia de Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE en el xenoinjerto de cáncer de páncreas humano establecido subcutáneo AG-Panc2 en ratones SCID

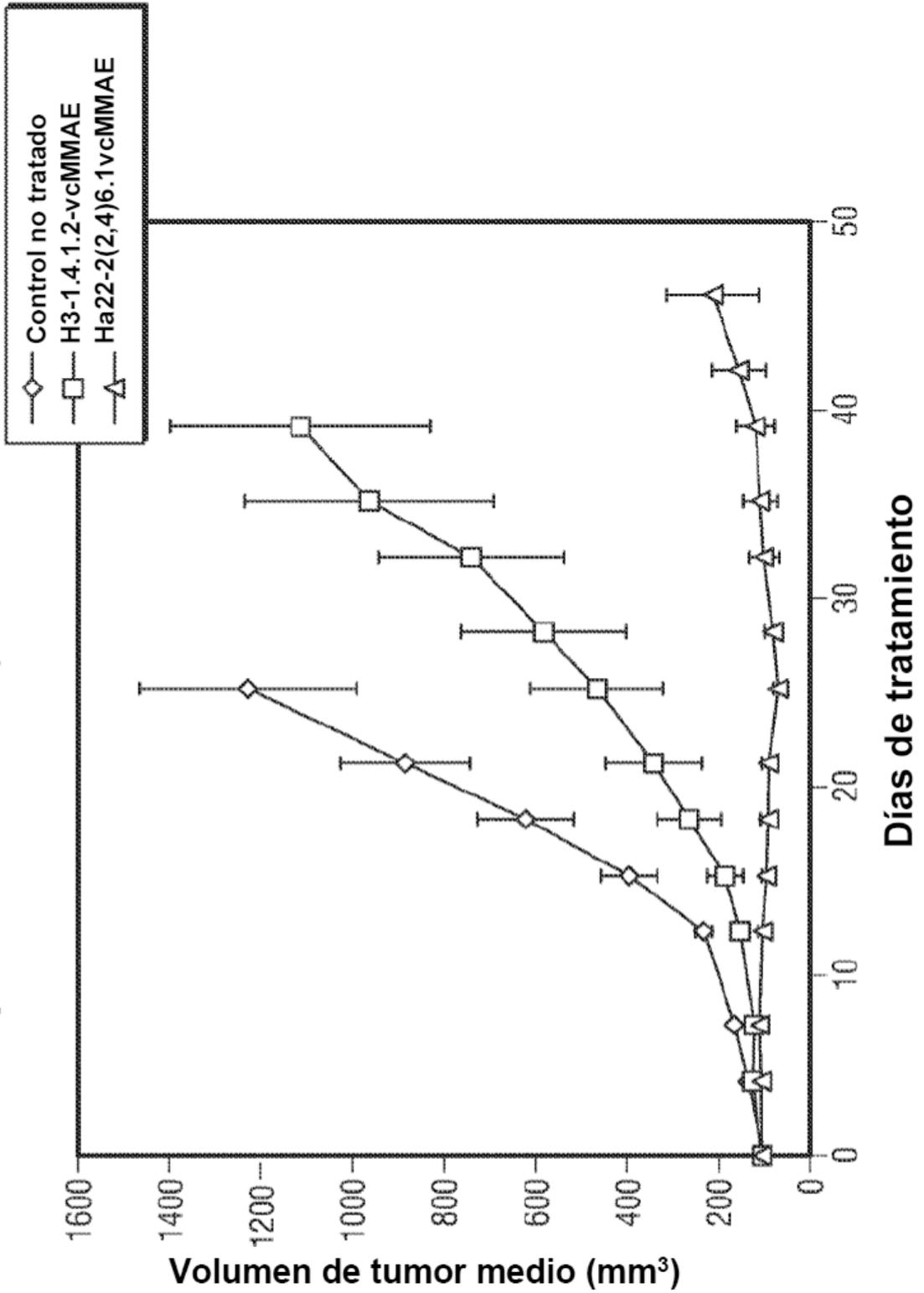


Figura 19: Eficacia de Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE en el xenoinjerto de cáncer de páncreas humano establecido subcutáneo AG-Panc2 en ratones SCID

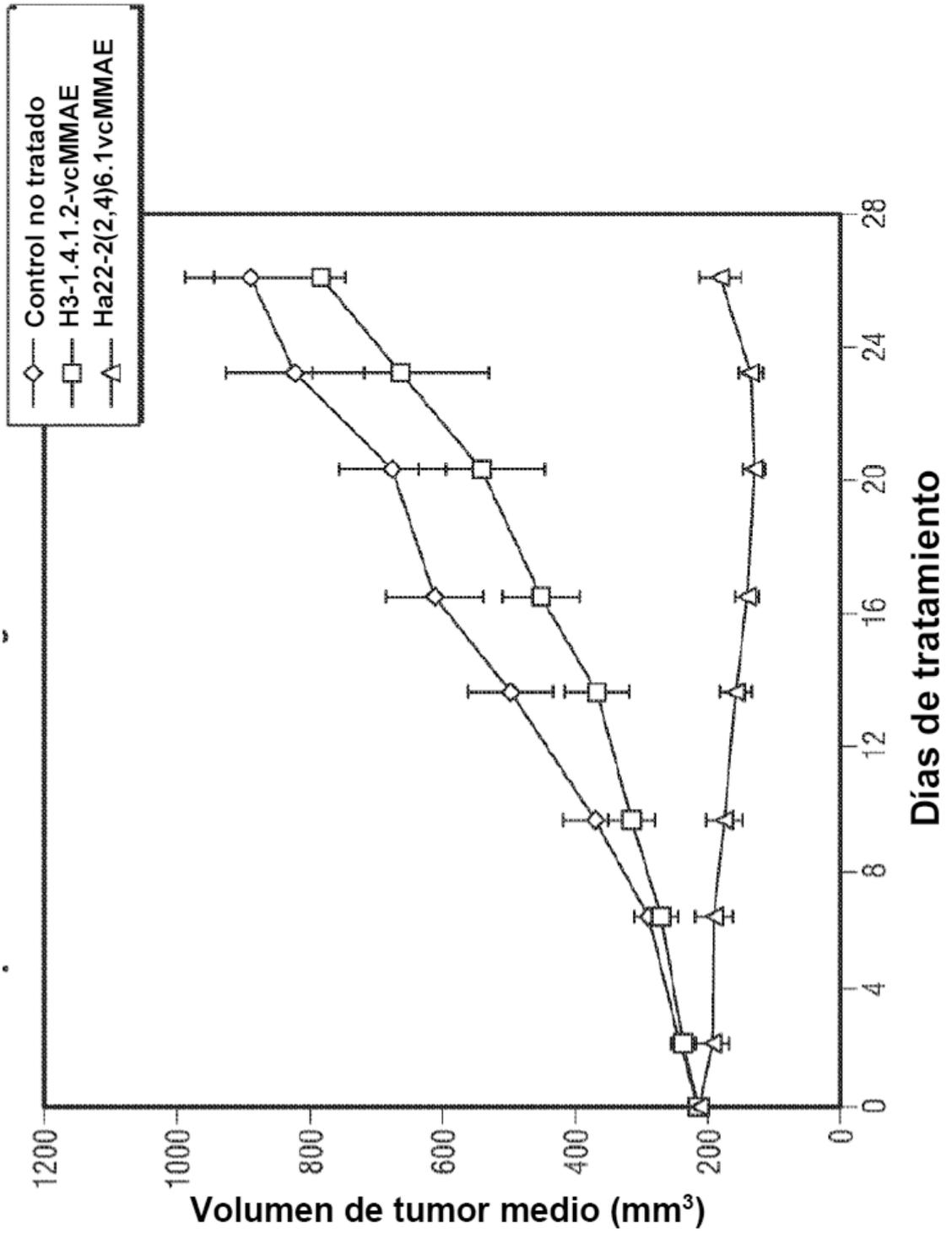


Figura 20: Eficacia de Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE en el xenoinjerto de cáncer de vejiga humano establecido subcutáneo AG-B8 en ratones SCID

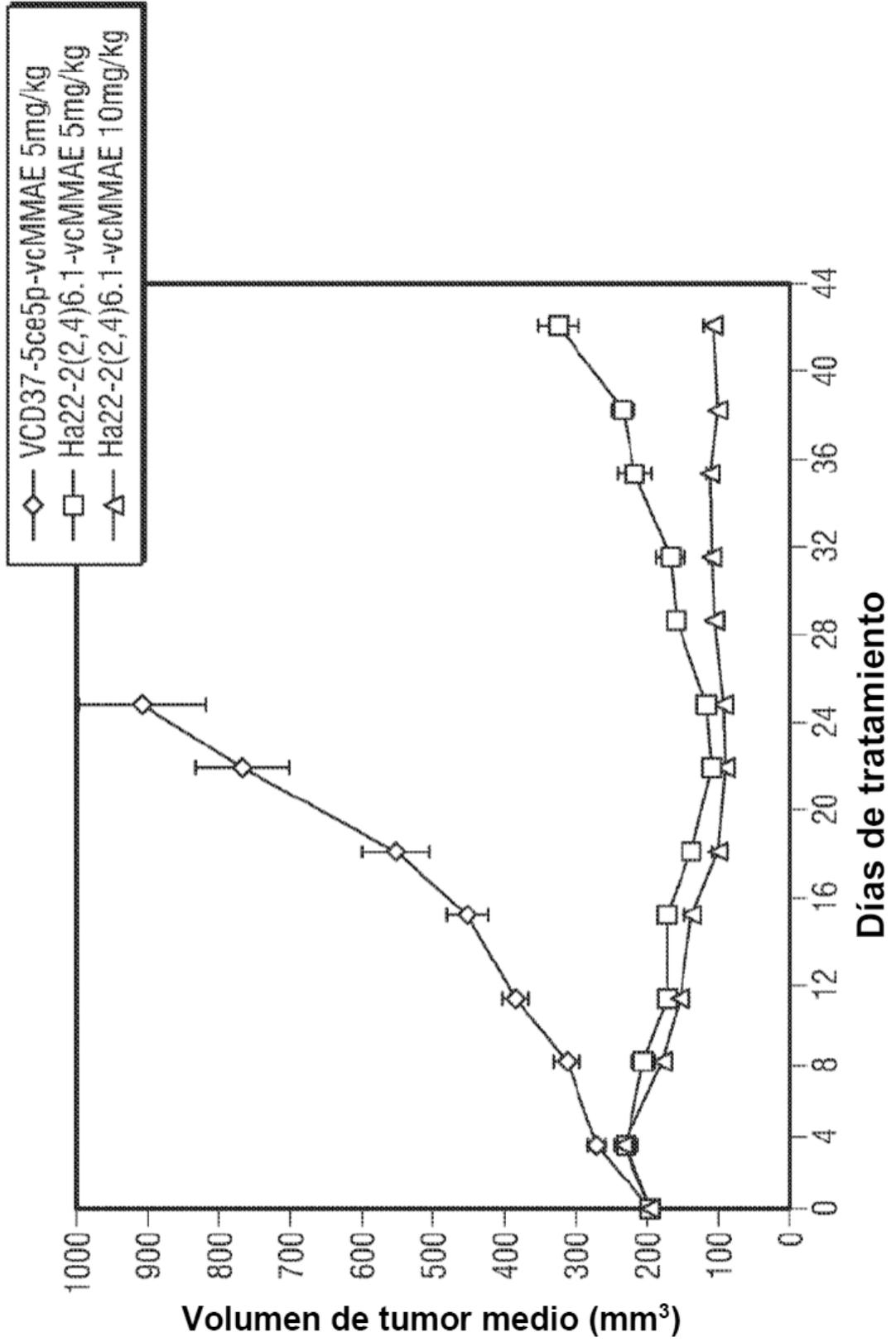


Figura 21: Detección de proteína 191P4D12 en muestras de pacientes con cáncer por inmunohistoquímica

Muestra de cáncer de vejiga

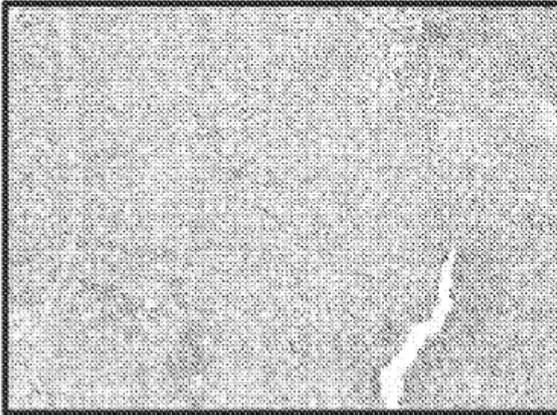


Figura 21A

Muestra de cáncer de vejiga



Figura 21B

Muestra de cáncer de mama

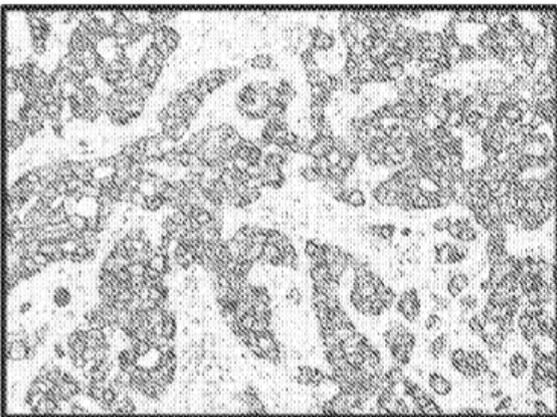


Figura 21C

Muestra de cáncer de mama



Figura 21D

Muestra de cáncer de páncreas

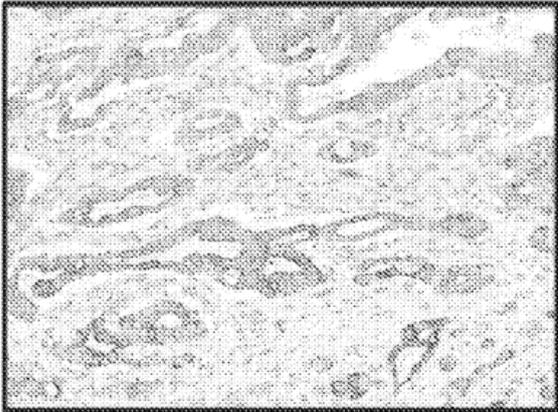


Figura 21E

Muestra de cáncer de páncreas



Figura 21F

Muestra de cáncer de pulmón

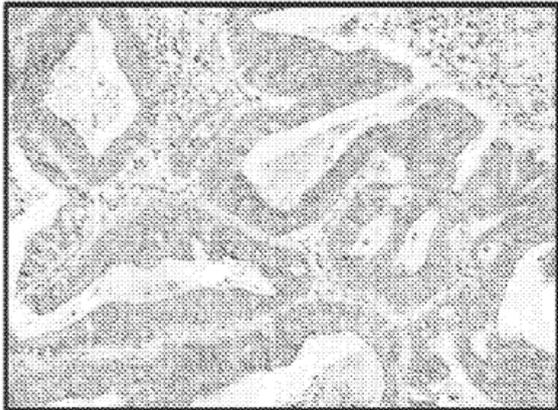


Figura 21G

Muestra de cáncer de pulmón



Figura 21H

Muestra de cáncer de ovario

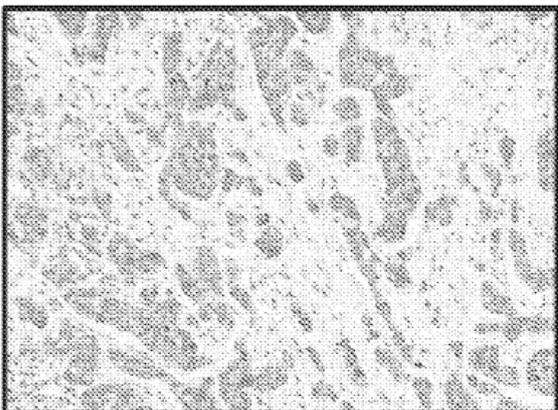


Figura 21I

Muestra de cáncer de ovario

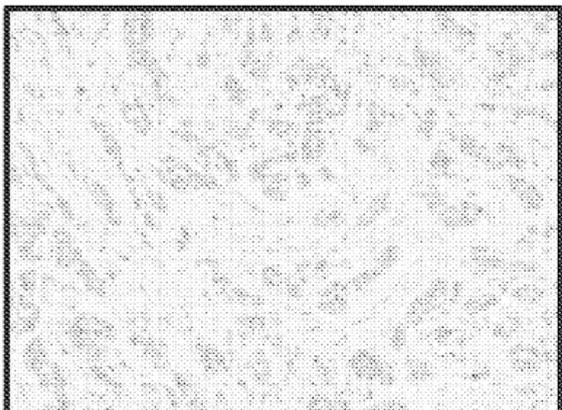


Figura 21J

Muestras de cáncer de esófago



Figura 21K

Muestras de cáncer de esófago

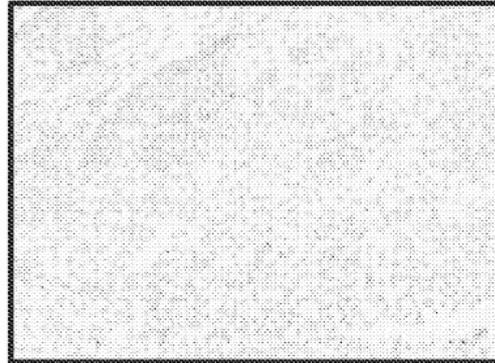


Figura 21L

Muestras de cáncer de cabeza y cuello



Figura 21M

Muestras de cáncer de cabeza y cuello



Figura 21N

Figura 22: Curvas de unión (Sensogramas) usadas para determinar la afinidad vía SPR

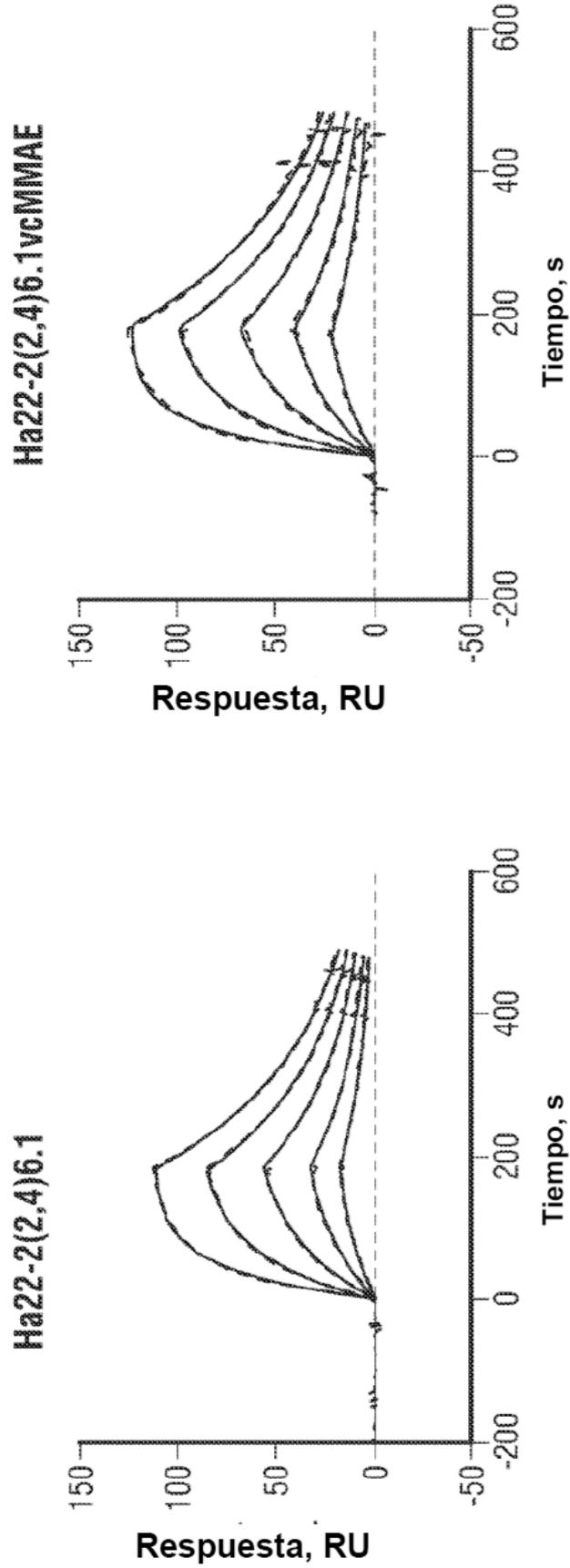


Figura 22B

Figura 22A

Figura 23: Ha22-2(4,6).1 se une a células PC3 que expresan 191P4D12 (A) y ortólogos de macacos Rhesus (B), rata (C) y ratón (D)

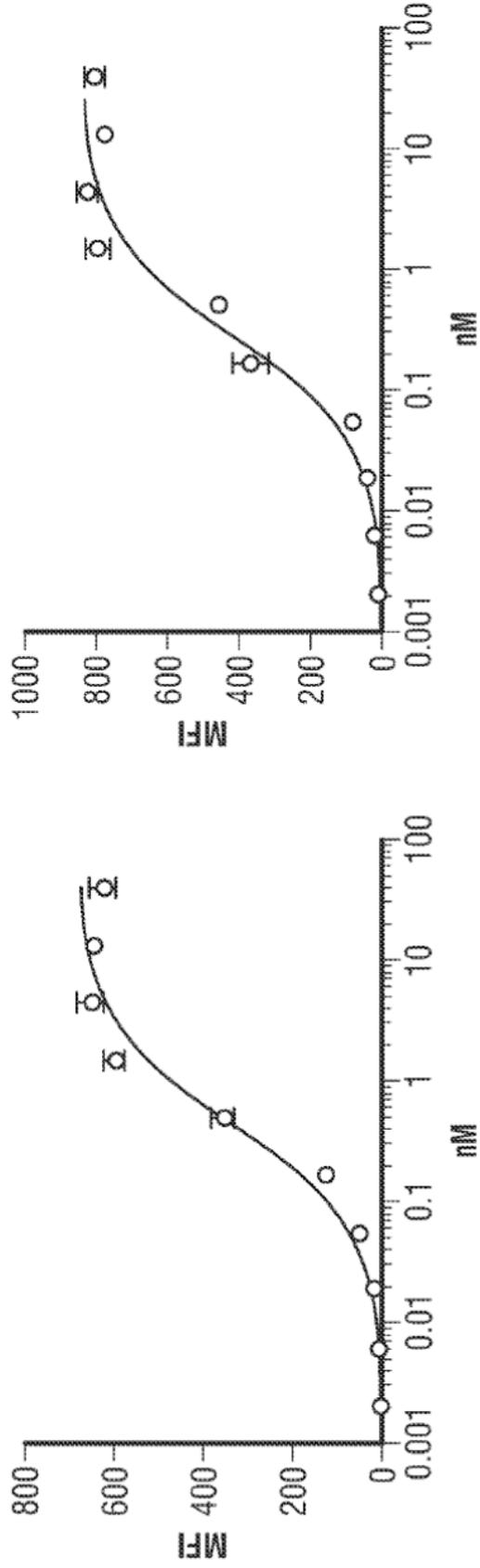


Figura 23B

Figura 23A

Figura 23 (continuación): Ha22-2(4,6).1 se une a células PC3 que expresan 191P4D12 (A) y ortólogos de macacos Rhesus (B), rata (C) y ratón (D)

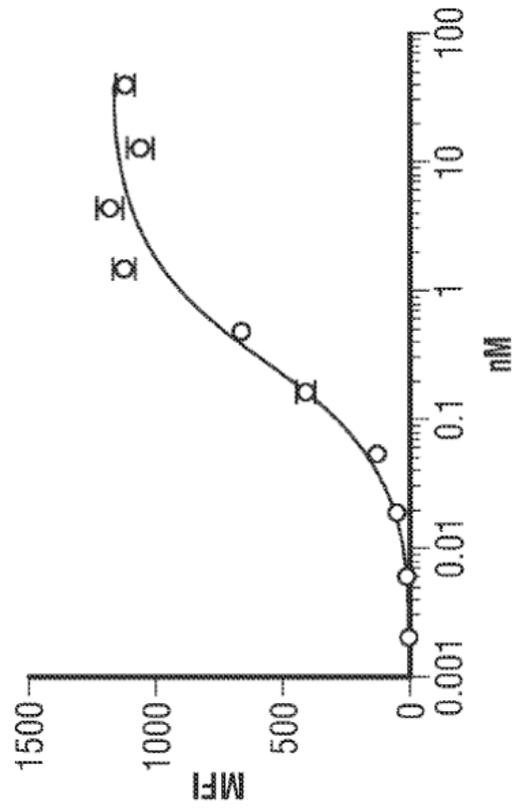


Figura 23C

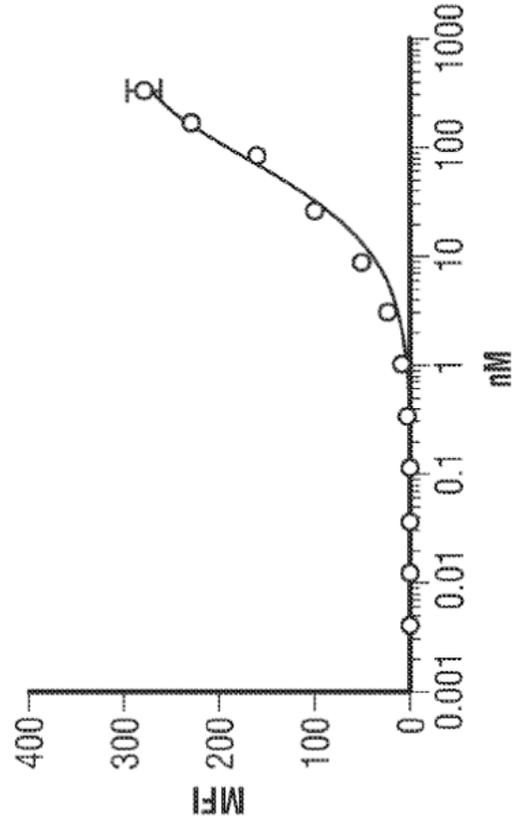


Figura 23D

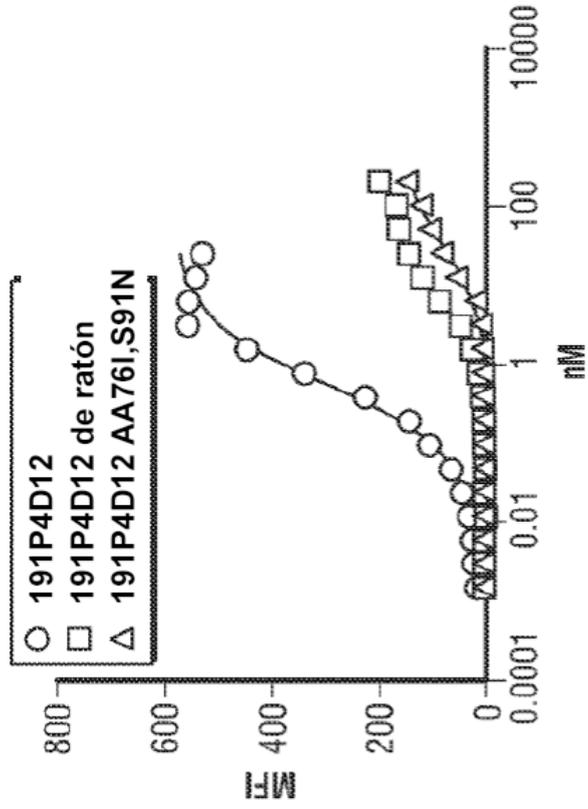


Figura 24B

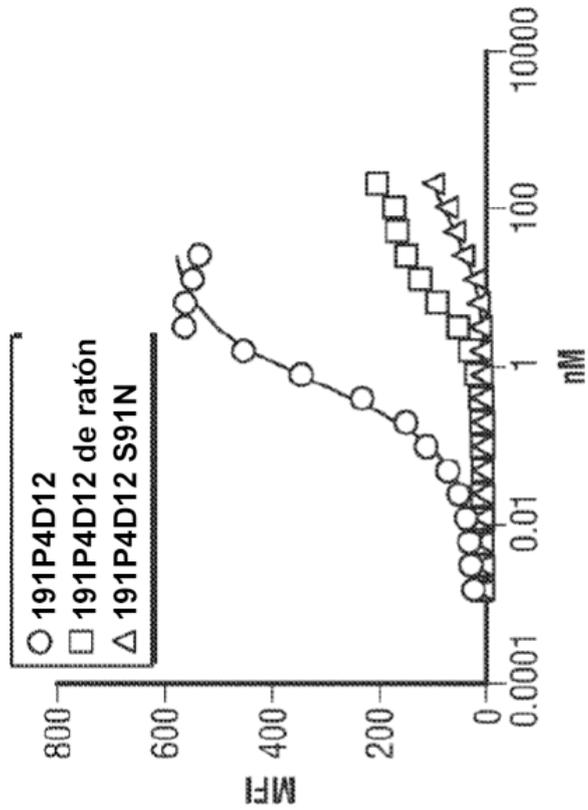


Figura 24A

Figura 24 (Continuación):

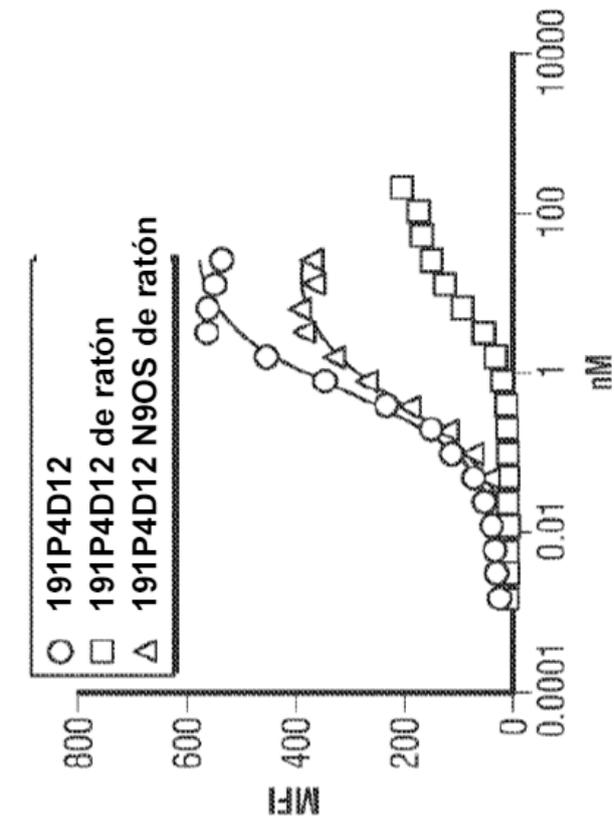


Figura 24C

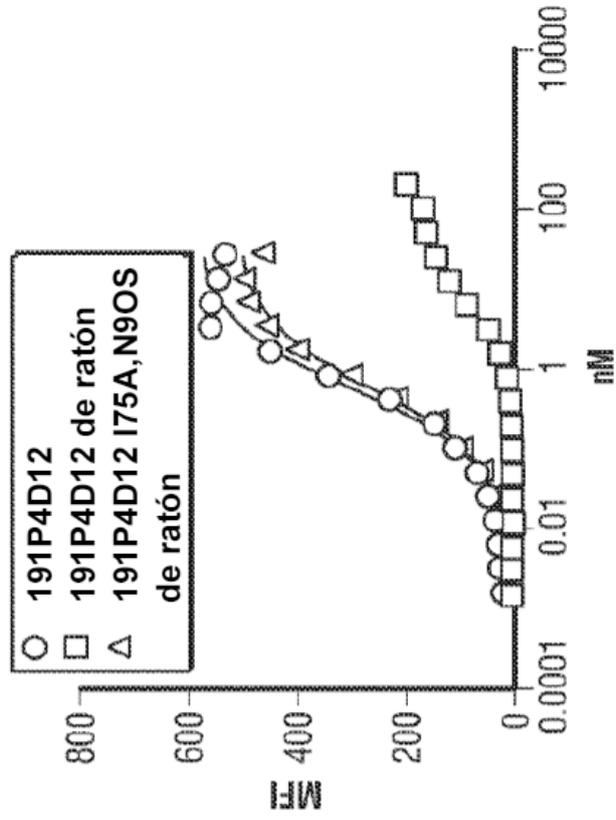


Figura 24D

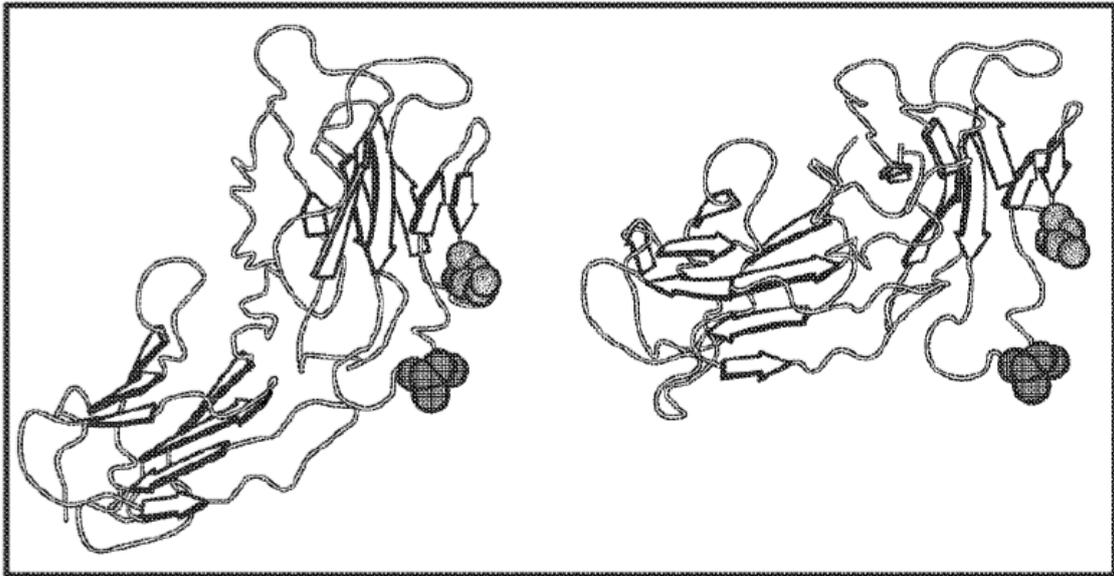


Figura 25

Figura 26: Unión de Mab Ha22-2(2,4)6.1 evaluada por FACS

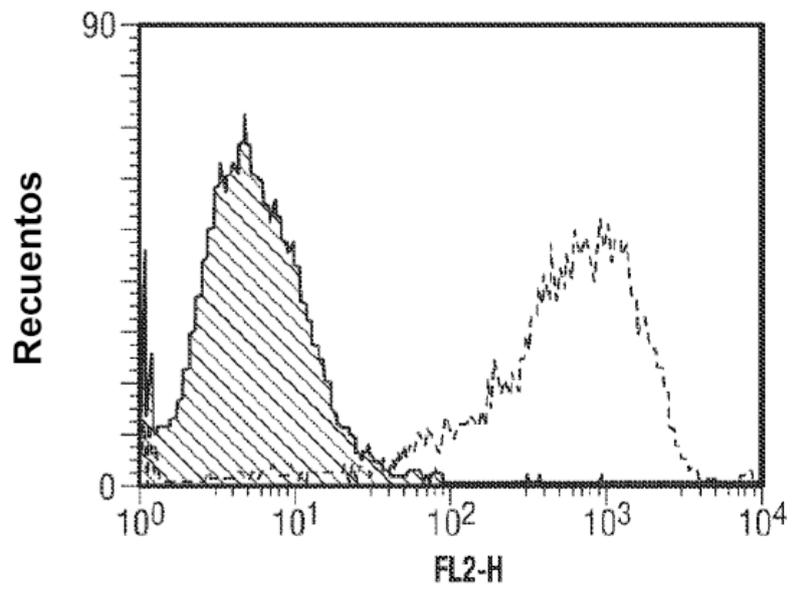


Figura 26A

**Figura 26 (Continuación): Unión de Mab Ha22-2(2,4)6.1
evaluada por FACS**

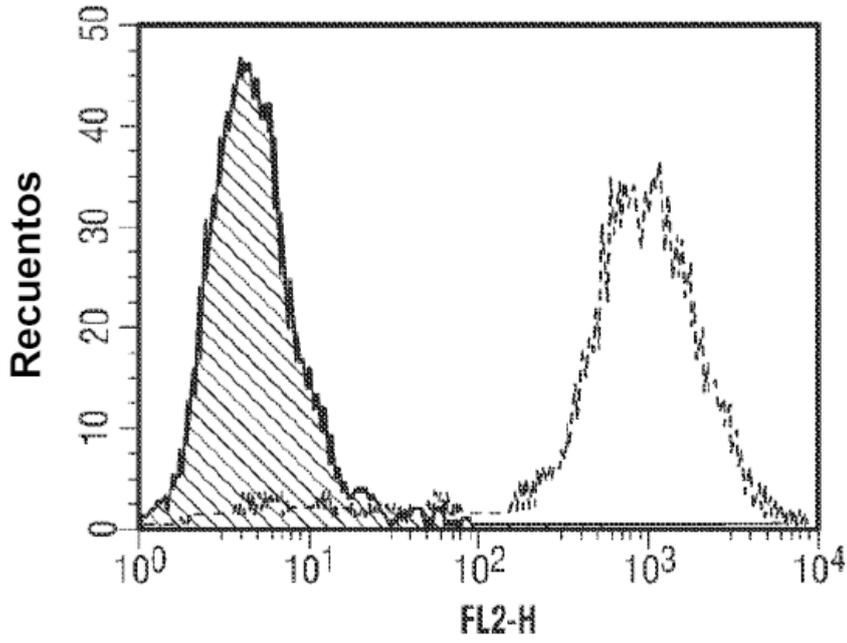


Figura 26B

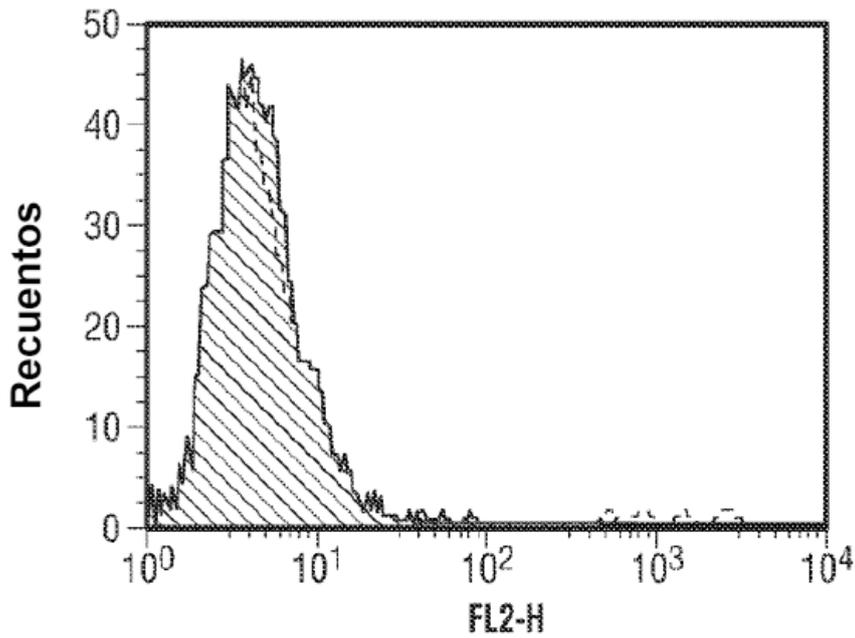


Figura 26C