

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 327**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/06** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

**C07K 7/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2004 E 16184693 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 3120861**

54 Título: **Compuesto intermedio para la preparación de conjugados que comprenden derivados de auristatina y un enlazador**

30 Prioridad:

**06.11.2003 US 518534 P**

**26.03.2004 US 557116 P**

**04.08.2004 US 598899 P**

**27.10.2004 US 622455 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.01.2019**

73 Titular/es:

**SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)**

**21823 30th Drive, S.E.**

**Bothell, WA 98021, US**

72 Inventor/es:

**DORONINA, SVETLANA O.;**

**SENER, PETER D.;**

**TOKI, BRIAN E.;**

**EBENS, ALLEN J.;**

**KLINE, TONI BETH;**

**POLAKIS, PAUL;**

**SLIWKOWSKI, MARK X. y**

**SPENCER, SUSAN D**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 697 327 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

Compuesto intermedio para la preparación de conjugados que comprenden derivados de auristatina y un enlazador.

5 **1. Campo de la invención**

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

15 **2. Antecedentes de la invención**

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

La mayoría de los agentes actualmente administrados a un paciente por vía parenteral no están dirigidos, dando como resultado una administración sistémica del agente a células y tejidos del cuerpo donde no es necesario, y frecuentemente es indeseable. Esto puede dar como resultado efectos secundarios adversos del fármaco, y que frecuentemente limitan la dosis de fármaco (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos (antineoplásicos), citotóxicos, agentes inhibidores de enzimas y fármacos antivíricos o antimicrobianos) que se puede administrar. En comparación, aunque la administración oral de fármacos se considera una forma cómoda y económica de administración, comparte los mismos problemas de toxicidad no específica a células no afectadas una vez que el fármaco se ha absorbido en la circulación sistémica. Otras complicaciones implican problemas de biodisponibilidad oral y de residencia del fármaco en el intestino, lo que produce una exposición adicional del intestino al fármaco y, por tanto, un riesgo de toxicidad intestinal. En consecuencia, una meta importante ha sido desarrollar métodos para dirigir específicamente agentes a células y tejidos. Los beneficios de dicho tratamiento incluyen evitar los efectos fisiológicos generales de la administración inadecuada de dichos agentes a otras células y tejidos, tales como células no infectadas. El direccionamiento intracelular se puede conseguir con métodos, compuestos y formulaciones que permiten la acumulación o la retención de agentes biológicamente activos, i.e. metabolitos activos, dentro de las células.

La terapia con anticuerpo monoclonal se ha establecido para el tratamiento dirigido de pacientes con cáncer, trastornos inmunitarios y angiogénicos.

El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, por ejemplo, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26: 151-172; patente de Estados Unidos n.º 4.975.278) permite teóricamente la administración dirigida de restos de fármaco a tumores, y la acumulación intracelular de los mismos, mientras que la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados pueden dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para las células normales, así como para las células que se desea eliminar (Baldwin et 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. (ed.s), págs. 475-506). De esta forma se busca la máxima eficacia con la mínima toxicidad. Para estas estrategias, se han notificado como útiles tanto anticuerpos policlonales como anticuerpos monoclonales (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, anteriormente citados). Las toxinas utilizadas en los conjugados de anticuerpo-fármaco incluyen toxinas bacterianas tales como la toxina diftérica, toxinas vegetales tales como ricino, toxinas de molécula pequeña tales como geldanamicina (Kerr et al., 1997, *Bioconjugate Chem.* 8(6):781-784; Mandler et al. (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581; Mandler et al. (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), y caliqueamicina (Lode et al. (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al. (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Las toxinas pueden alterar sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen la unión a tubulina, unión al ADN, o inhibición de la topoisomerasa (Meyer, D.L. y Senter, P.D. "Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy" in *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Vol 38 (2003) Capítulo 23, 229-237). Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grades o ligandos de receptores de proteínas.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal de IgG1 kappa de murino dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra en la superficie

de linfocitos B normales y malignos y un radioisótopo de  $^{111}\text{In}$  o  $^{90}\text{Y}$  unido mediante un quelante enlazador 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). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra el linfoma no de Hodgkin (LNH) de linfocitos B, la administración da como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto de un anticuerpo de CD33 humano unido a la caliqueamicina, fue autorizado en 2000 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; patentes de Estados Unidos n.º 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo de huC242 unido mediante enlazador de disulfuro SPP con el resto de fármaco maitansinoide, DM1, ha pasado a los ensayos clínicos en Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como de colon, pancreático, gástrico, y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologies, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo y fármaco compuesto del anticuerpo monoclonal contra el antígeno específico de la membrana de la próstata (PSMA) unido al resto de fármaco maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el tratamiento potencial de tumores de próstata. El mismo resto de fármaco maitansinoide, DM1, se enlazó mediante un enlazador no de disulfuro, SMCC, a un anticuerpo monoclonal de murino, TA.1 (Chari et al. (1992) Cancer Research 52:127-131). Se ha informado de que este conjugado es 200 veces menos potente que el correspondiente conjugado con el enlazador de disulfuro. El enlazador SMCC se consideró en dicho documento como "no escindible".

Varios compuestos peptídicos cortos se han aislado a partir del molusco marino *Dolabella auricularia* y se ha descubierto que tiene actividad biológica (Pettit et al. (1993) Tetrahedron 49:9151; Nakamura et al. (1995) Tetrahedron Letters 36:5059-5062; Sone et al. (1995) Jour. Org Chem. 60:4474). También se han preparado análogos de estos compuestos, y se ha descubierto que algunos tienen actividad biológica (para una revisión, véase Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277). Por ejemplo, auristatina E (patente de Estados Unidos n.º 5635483) es un análogo sintético del producto marino natural Dolastatina 10, un agente que inhibe la polimerización de la tubulina mediante la unión al mismo dominio de la tubulina que el fármaco anticanceroso vincristina (G. R. Pettit, (1997) Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 70:1-79). Dolastatina 10, auristatina PE, y auristatina E son péptidos lineales que tienen cuatro aminoácidos, tres de los cuales son únicos para la clase de dolastatina de los compuestos, y una amida en el extremo C.

Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron con: (i) anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos de los carcinomas de Lewis Y); (ii) cAC10 que es específico de CD30 en neoplasias malignas hematológicas (Klussman, et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773; Doronina et al. (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"; Francisco et al. (2003) Blood 102(4):1458-1465; publicación de Estados Unidos 2004/0018194; (iii) anticuerpos dirigidos contra CD20 tales como RITUXAN® (documento WO 04/032828) para el tratamiento de cánceres y trastornos inmunitarios que expresan CD20; (iv) anticuerpos 2H9 dirigidos contra EphB2 y contra IL-8 para el tratamiento del cáncer colorrectal (Mao, et al. (2004) Cancer Research 64(3):781-788); (v) anticuerpo de E-selectina (Bhaskar et al. (2003) Cancer Res. 63:6387-6394); y (vi) otros anticuerpos dirigidos contra CD30 (documento WO 03/043583).

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

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

La familia ErbB de receptores de tirosina quinasas son mediadores importantes del crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular. La familia de receptores incluye cuatro miembros diferentes, incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1, HER1), HER2 (ErbB2 o p185<sup>neu</sup>), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tyro2). Se ha caracterizado un panel de anticuerpos dirigidos contra ErbB2 usando la línea de células del tumor de mama humano SKBR3 (Hudziak et al., (1989) Mol. Cell. Biol. 9(3): 1165-1172. Se obtuvo la inhibición máxima con el anticuerpo llamado 4D5 que inhibía la proliferación celular en un 56 %. Otros anticuerpos del panel reducían la proliferación celular en menor extensión en este ensayo. Se ha descubierto además que el anticuerpo 4D5 sensibilizaba las líneas celulares de tumor de mama que expresaban en exceso ErbB2 a los efectos citotóxicos del TNF- $\alpha$ . (patente de Estados Unidos n.º 5677171). Los anticuerpos dirigidos contra ErbB2 estudiados en Hudziak *et al.* se caracterizaron adicionalmente en Fendly et al. (1990) Cancer Research 50:1550-1558; Kotts et al. (1990) *In vitro* 26(3):59A; Sarup et al. (1991) Growth Regulation 1:72-82; Shepard et al. J. (1991) Clin. Immunol. 11(3):117-127; Kumar et al. (1991) Mol. Cell. Biol. 11(2):979-986; Lewis et al. (1993) Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263; Pietras et al. (1994) Oncogene 9:1829-1838; Vitetta et al. (1994) Cancer Research 54:5301-5309; Sliwkowski et al. (1994) J. Biol. Chem. 269(20):14661-14665; Scott et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:14300-5; D'souza et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:7202-7206; Lewis et al. (1996) Cancer Research 56:1457-1465; y Schaefer et al. (1997)

Oncogene 15:1385-1394.

Se han descrito otros anticuerpos dirigidos contra ErbB2 con diferentes propiedades en Tagliabue et al. *Int. J. Cancer* 47:933-937 (1991); McKenzie y col. *Oncogene* 4:543-548 (1989); Maier y col. *Cancer Res.* 51:5361-5369 (1991); Bacus y col. *Molecular Carcinogenesis* 3:350-362 (1990); Stancovski et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8691-8695 (1991); Bacus y col. *Cancer Research* 52:2580-2589 (1992); Xu y col. *Int. J. Cancer* 53:401-408 (1993); documento WO94/00136; Kasprzyk et al. *Cancer Research* 52:2771-2776 (1992); Hancock et al. (1991) *Cancer Res.* 51:4575-4580; Shawver et al. (1994) *Cancer Res.* 54:1367-1373; Arteaga et al. (1994) *Cancer Res.* 54:3758-3765; Harwerth et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:15160-15167; patente de Estados Unidos n.º 5783186; y Klapper et al. (1997) *Oncogene* 14:2099-2109.

El cribado por homología ha dado como resultado la identificación de otros dos miembros de la familia de receptores ErbB; ErbB3 (patente de los Estados Unidos n.º 5,183,884; patente de Estados Unidos n.º 5.480.968; KraU.S. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9193-9197) y ErbB4 (documento EP 599274; Plowman et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1746-1750; y Plowman et al. (1993) *Nature* 366:473-475). Ambos receptores presentan una mayor expresión en al menos algunas líneas celulares de cáncer de mama.

HERCEPTIN® (Trastuzumab) es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente con alta afinidad en un ensayo de cultivo celular ( $K_d = 5 \text{ nM}$ ) al dominio extracelular de la proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, HER2 (ErbB2) (patente de los Estados Unidos n.º 5821337; patente de Estados Unidos n.º 6054297; patente de Estados Unidos n.º 6407213; patente de Estados Unidos n.º 6639055; Coussens L, et al. (1985) *Science* 230:1132-9; Slamon DJ, et al. (1989) *Science* 244:707-12). Trastuzumab es un anticuerpo de IgG1 kappa que contiene regiones marco humanas con las regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo murino (4D5) que se une a HER2. Trastuzumab se une al antígeno HER2 y, de esta forma, inhibe el crecimiento de las células cancerosas. Como Trastuzumab es un anticuerpo humanizado, minimiza las posibles respuestas HAMA en pacientes. El anticuerpo humanizado dirigido contra HER2 se produce mediante un cultivo en suspensión de células de mamífero (ovario de hámster chino, CHO). El proto-oncogén HER2 (o c-erbB2) codifica una proteína de un receptor transmembrana de 185 kDa, que está estructuralmente relacionada con el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Se ha observado la expresión en exceso de la proteína HER2 en 25 %-30 % de los cánceres de mama primarios, y se puede determinar usando una evaluación inmunohistoquímica de bloques de tumores fijados (Press MF, et al. (1993) *Cancer Res* 53:4960-70). Trastuzumab ha demostrado, tanto en ensayos realizados *in vitro* como en animales, que inhibe la proliferación de células tumorales humanas que expresan HER2 en exceso (Hudziak RM, et al. (1989) *Mol Cell Biol* 9:1165-72; Lewis GD, et al. (1993) *Cancer Immunol Immunother*; 37:255-63; Baselga J, et al. (1998) *Cancer Res.* 58:2825-2831). Trastuzumab es un mediador de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, ADCC (Hotaling TE, et al. (1996) [resumen]. *Proc. Annual Meeting Am Assoc Cancer Res*; 37:471; Pegram MD, et al. (1997) [resumen]. *Proc Am Assoc Cancer Res*; 38:602). *In vitro*, la ADCC mediada por Trastuzumab ha mostrado ejercerse principalmente sobre las células cancerosas que expresan HER2 en exceso, en comparación con las células cancerosas que no expresan HER2 en exceso. HERCEPTIN® como monoagente está indicado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores expresan en exceso la proteína HER2, y que han recibido uno o más regímenes de quimioterapia contra su enfermedad metastásica. HERCEPTIN® en combinación con paclitaxel está indicado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores expresan en exceso la proteína HER2, y que no han recibido uno o más regímenes de quimioterapia contra su enfermedad metastásica. HERCEPTIN® es clínicamente activa en pacientes con cáncer de mama metastásico que expresan ErbB2 en exceso que ya han recibido una amplia terapia contra el cáncer anterior (Baselga et al, (1996) *J. Clin. Oncol.* 14:737-744).

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

Aunque HERCEPTIN es un paso adelante para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama que expresan ErbB2 que ya han recibido una amplia terapia contra el cáncer anterior, algunos pacientes de esta población no responden o responden muy poco al tratamiento con HERCEPTIN.

Por lo tanto, existe una necesidad clínica significativa para desarrollar otras terapias contra el cáncer dirigidas contra HER2 para aquellos pacientes con tumores que expresan HER2 en exceso o para otras enfermedades asociadas con la expresión de HER2 que no responden, o responden poco, al tratamiento con HERCEPTIN.

La cita de cualquier referencia en esta solicitud no es una admisión de que la referencia es el estado de la técnica de esta solicitud.



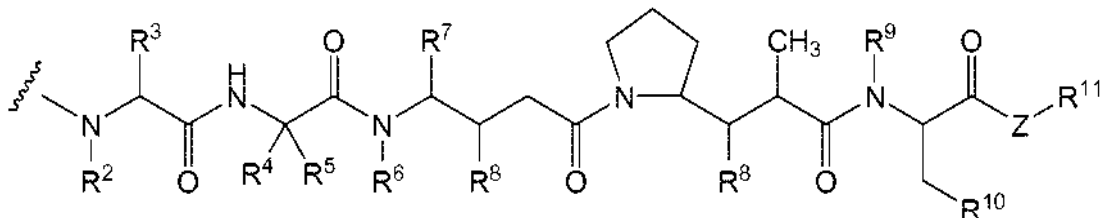
### 3. Sumario de la invención

La presente invención proporciona un conjugado que tiene la fórmula:

5 LU-D<sub>F</sub>

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

10 LU- es una Unidad enlazadora que comprende un grupo funcional capaz de unirse a un ligando o a un anticuerpo, y  
D<sub>F</sub> es un grupo que tiene la siguiente fórmula:



15 en la que:  
independientemente en cada localización:

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

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

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

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

25 o:

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

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

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

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

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

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

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

R<sup>11</sup> se selecciona de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup>, y -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>;

m es un número entero comprendido de 1 a 1000;

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

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

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

cada aparición de R<sup>16</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH; y n es un número entero de 0 a 6.

45 También se describe en el presente documento una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco que se ha definido anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un diluyente, transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 También se describe en el presente documento un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco como se ha definido anteriormente para su uso en el tratamiento de un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de estómago, cáncer de endometrio, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer de próstata y cáncer de vejiga.

55 También se describe en el presente documento un compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco como se ha definido anteriormente para su uso junto con una cantidad eficaz de un agente adicional seleccionado entre el grupo que consiste de un agente contra el cáncer, un agente inmunosupresor, y un agente antiinfeccioso para su uso en el tratamiento de un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer

de estómago, cáncer de endometrio, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer de próstata y cáncer de vejiga.

### Breve descripción de los dibujos

- 5 La Figura 1 muestra un ensayo de eficacia *in vivo* de una sola dosis de cAC10-mcMMAF en xenoinjertos subcutáneos de Karpas-299 ALCL.
- La Figura 2 muestra un ensayo de eficacia *in vivo* de una sola dosis de cAC10-mcMMAF en L540cy subcutáneo. Para este estudio, se usaron 4 ratones en el grupo no tratado y 10 en cada grupo de tratamiento.
- 10 Las Figuras 3a y 3b muestran la eficacia *in vivo* de cBR96-mcMMAF en L2987 subcutáneo. Los triángulos rellenos de la Figura 3a y las flechas de la Figura 3b indican los días de la terapia.
- Las Figuras 4a y 4b muestran la actividad *in vitro* de conjugados de anticuerpo-fármaco cAC10 contra líneas de células CD30<sup>+</sup>.
- 15 Las Figuras 5a y 5b muestran la actividad *in vitro* de conjugados de anticuerpo-fármaco cBR96 contra líneas de células Le<sup>y</sup><sup>+</sup>.
- Las Figuras 6a y 6b muestran la actividad *in vitro* de conjugados de anticuerpo-fármaco c1F6 contra líneas de células de carcinoma de células renales CD70<sup>+</sup>.
- La Figura 7 muestra un ensayo de proliferación celular *in vitro*, con células SK-BR-3 tratadas con conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC): -●- Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab, -o- Trastuzumab-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab, y -Δ- Trastuzumab-MC-MMAF, 4,8 MMAF/Ab, medido en unidades relativas de fluorescencia (URF) versus la concentración de ADC en µg/ml. H = Trastuzumab donde H está unido mediante una cisteína [cys].
- 20 La Figura 8 muestra un ensayos de proliferación celular *in vitro* con células BT-474 tratadas con ADC: -●- Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab, -o- Trastuzumab-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab, y -Δ- Trastuzumab-MC-MMAF, 4,8 MMAF/Ab.
- 25 La Figura 9 muestra un ensayos de proliferación celular *in vitro* con células MCF-7 tratadas con ADC: -●- Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab, -o- Trastuzumab-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3,9 MMAF/Ab, y -Δ- Trastuzumab-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab.
- La Figura 10 muestra un ensayos de proliferación celular *in vitro* con células MDA-MB-468 tratadas con ADC: -●- Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 4,1 MMAE/Ab, -o- Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 3,3 MMAE/Ab, y -Δ- Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3,7 MMAF/Ab.
- 30 La Figura 11 muestra un estudio de aclaramiento de la concentración en plasma después de la administración de H-MC-vc-PAB-MMAF-TEG y H-MC-vc-PAB-MMAF a ratas Sprague Dawley: La dosis administrada fue de 2 mg de ADC por kg de rata. Las concentraciones de anticuerpo total y ADC se midieron con el tiempo. (H = Trastuzumab).
- 35 La Figura 12 muestra un estudio de aclaramiento de la concentración en plasma después de la administración de H-MC-vc-MMAE a macacos a diferentes dosis: 0,5, 1,5, 2,5, y 3,0 mg/kg administrado el día 1 y el día 21. Las concentraciones de anticuerpo total y ADC se midieron con el tiempo. (H = Trastuzumab).
- La Figura 13 muestra el cambio promedio de volumen tumoral con el tiempo en ratones lampiños atímicos con aloinjertos del tumor mamario MMTV-HER2 Fo5 que recibieron dosis el Día 0 con: Vehículo, Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE (1250 µg/m<sup>2</sup>) y Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF (555 µg/m<sup>2</sup>), (H = Trastuzumab).
- 40 La Figura 14 muestra el cambio promedio de volumen tumoral con el tiempo en ratones lampiños atímicos con aloinjertos del tumor mamario MMTV-HER2 Fo5 que recibieron dosis el Día 0 con 10 mg/kg de (660 µg/m<sup>2</sup>) de Trastuzumab-MC-MMAE y 1250 µg/m<sup>2</sup> de Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE.
- La Figura 15 muestra el cambio promedio de volumen tumoral con el tiempo en ratones lampiños atímicos con aloinjertos del tumor mamario MMTV-HER2 Fo5 que recibieron dosis el Día 0 con Vehículo y 650 µg/m<sup>2</sup> de trastuzumab-MC-MMAF.
- 45 La Figura 16 muestra el cambio promedio de volumen tumoral con el tiempo en ratones lampiños atímicos con aloinjertos del tumor mamario MMTV-HER2 Fo5 que recibieron dosis el Día 0 con Vehículo y 350 µg/m<sup>2</sup> de cuatro conjugados de trastuzumab-MC-MMAF donde la relación de MMAF/trastuzumab (H) es 2, 4, 5,9 y 6.
- 50 La Figura 17 muestra el cambio promedio del grupo, con barras de error, en los pesos corporales del animal (rata) (promedio ± SD) tras la administración de Vehículo, trastuzumab-MC-val-cit-MMAF, trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF, trastuzumab-MC-MMAF y trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF.
- La Figura 18 muestra el cambio promedio del grupo en los pesos corporales del animal (rata) (promedio ± SD) tras la administración de 9,94 mg/kg de H-MC-vc-MMAF, 24,90 mg/kg de H-MC-vc-MMAF, 10,69 mg/kg de H-MC(Me)-vc-PAB-MMAF, 26,78 mg/kg de H-MC(Me)-vc-PAB-MMAF, 10,17 mg/kg de H-MC-MMAF, 25,50 mg/kg de H-MC-MMAF, y 21,85 mg/kg de H-MC-vc-PAB-MMAF. H = trastuzumab. El enlazador MC está unido mediante una cisteína del trastuzumab a cada conjugado.
- 55 La Figura 19 muestra el cambio promedio del grupo, con barras de error, en los pesos corporales de ratas Sprague Dawley (promedio ± SD) después de la administración de trastuzumab (H)-MC-MMAF a dosis de 2105, 3158, y 4210 µg/m<sup>2</sup>. El enlazador MC está unido mediante una cisteína del trastuzumab a cada conjugado.
- 60

## 4. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

### 4.1 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- 65 A menos que se indique otra cosa, los siguientes términos y frases se usan en el presente documento están

destinados a tener los siguientes significados:

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

5 El término "anticuerpo" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio y específicamente abarca anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos  
 10 biespecíficos) formados por al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo, siempre que muestren la actividad biológica deseada. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunitario que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico. Descrito en términos de su estructura, un anticuerpo tiene normalmente una proteína en forma de Y que consiste en cuatro cadenas de aminoácidos, dos pesadas y dos ligeras. Cada anticuerpo tiene principalmente dos regiones: una región variable y una región constante. La región variable, situada en los extremos de los brazos de la Y, se unen e interactúan con el antígeno diana. Esta región variable incluye una  
 15 región determinante de la complementariedad (CDR) que reconoce y se une a un sitio de unión específico de un antígeno concreto. La región constante, situada en la cola de la Y, se reconoce por e interactúa con el sistema inmunitario (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5ª edición, Garland Publishing, Nueva York). Un antígeno diana tiene generalmente numerosos sitios de unión, también denominados epítopos, reconocidos por las CDR en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítipo diferente tiene una estructura diferente. Por tanto, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente.

25 El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, también se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunitariamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de una diana de interés o parte de la misma, incluyendo dichas dianas, aunque no de forma limitativa, una célula o células cancerosas que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados con una enfermedad autoinmunitaria. La inmunoglobulina divulgada en el presente documento puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden derivarse de cualquier especie. En un aspecto, sin embargo, la inmunoglobulina es de origen humano, de murino, o conejo. En otro aspecto, los anticuerpos son anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, Fv, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos producidos mediante una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), CDR, y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores que se unen inmuno-específicamente a antígenos de células cancerosas, antígenos víricos, o antígenos microbianos.

40 La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades poco importantes. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Asimismo, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin estar contaminados por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método del hibridoma descrito por primera vez en Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495, o se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante (véase, la patente de Estados Unidos n.º. 4816567). Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar a partir de fagotecas de anticuerpos usando las técnicas descritas en Clackson et al. (1991) *Nature*, 352:624-628 y Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597, por ejemplo.

55 Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que la cadena (o las cadenas) restante es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos mp/4816567; y Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855).

65 Se han utilizado varios métodos para producir anticuerpos monoclonales (MAb). La tecnología del hibridoma, que se refiere a una línea de células clonada que produce un único tipo de anticuerpo, usa las células de varias especies, incluidos ratones (murino), hámsteres, ratas y seres humanos. Otro método para preparar los Mab usa ingeniería genética que incluye técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales fabricados mediante estas técnicas incluyen, entre otros, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanos. Un anticuerpo quimérico combina

regiones que codifican ADN procedentes de más de un tipo de especie. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede derivar la región variable de un ratón y la región constante de un ser humano. Un anticuerpo humanizado procede predominantemente de un ser humano, aunque contenga partes no humanas. Como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado puede contener una región constante completamente humana. Pero a diferencia de un anticuerpo quimérico, la región variable puede estar parcialmente derivada de un ser humano. Las porciones sintéticas no humanas de un anticuerpo humanizado proceden frecuentemente de las CDR de anticuerpos murinos. En cualquier caso, estas regiones son fundamentales para permitir que el anticuerpo reconozca y se una a un antígeno específico.

Como se ha indicado, se pueden usar anticuerpos murinos. Aunque útiles para el diagnóstico y terapias a corto plazo, los anticuerpos murinos no se pueden administrar a las personas durante mucho tiempo sin aumentar el riesgo de una respuesta inmunogénica perjudicial. Esta respuesta, denominada anticuerpo de ratón contra ser humano (HAMA), se produce cuando un sistema inmunitario humano reconoce el anticuerpo murino como extraño y lo ataca. Una respuesta HAMA puede producir choque tóxico o incluso la muerte.

Los anticuerpos quiméricos y humanizados reducen la posibilidad de una respuesta HAMA al minimizar las porciones no humanas de los anticuerpos administrados. Asimismo, los anticuerpos quiméricos y humanizados tienen el beneficio adicional de activar las respuestas inmunitarias humanas secundarias, tal como la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

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

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

Un anticuerpo intacto puede tener una o más "funciones efectoras" que se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de la secuencia natural o una región Fc de la secuencia variante) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen unión con C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por defecto de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B; BCR), etc.

En función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos se pueden asignar a diferentes "clases". Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de éstas pueden además dividirse en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

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

Los anticuerpos contra los receptores de ErbB están comercialmente disponibles de numerosas fuentes, incluyendo, por ejemplo, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, EE.UU.

Por "ligando de ErbB" se entiende un polipéptido que se une a y/o activa un receptor ErbB. El ligando de ErbB puede ser un ligando ErbB humano de secuencia natural tal como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Savage et al. (1972) J. Biol. Chem., 247:7612-7621); factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) (Marquardt et al. (1984) Science 223:1079-1082); anfiregulina también conocida como factor de crecimiento autocrino de queratinocitos o schwannoma (Shoyab et al. (1989) Science 243:1074-1076; Kimura et al., Nature, 348:257-260 (1990); y Cook et al., Mol. Cell. Biol., 11:2547-2557 (1991)); betacelulina (Shing et al., Science, 259:1604-1607 (1993); y Sasada et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 190:1173 (1993)); factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) (Higashiyama et al., Science, 251:936-939 (1991)); epiregulina (Toyoda y col., J. Biol. Chem., 270:7495-7500 (1995); y Komurasaki et al., Oncogene, 15:2841-2848 (1997)); una heregulina (véase posteriormente); neurregulina-2 (NRG-2) (Carraway et al., Nature, 387:512-516 (1997)); neurregulina-3 (NRG-3) (Zhang y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 94:9562-9567 (1997)); neurregulina-4 (NRG-4) (Harari et al., Oncogene, 18:2681-89 (1999)) o cripto (CR-1) (Kannan et al., J. Biol. Chem., 272(6):3330-3335 (1997)). Los ligandos de ErbB que se unen a EGFR incluyen EGF, TGF- $\alpha$ , anfiregulina, betacelulina, HB-EGF y epiregulina. Los ligandos de ErbB que se unen a ErbB3 incluyen

herregulinas. Los ligandos de ErbB capaces de unirse a ErbB4 incluyen betacelulina, epiregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 y herregulinas. El ligando de ErbB también puede ser un ligando de ErbB sintético. El ligando sintético puede ser específico de un receptor ErbB concreto, o puede reconocer complejos del receptor ErbB concretos. Un ejemplo de un ligando sintético es la quimera sintética herregulina/EGF, birregulina (véase, por ejemplo, Jones et al., (1999) FEBS Letters, 447: 227-231, que se ha incorporado por referencia).

"Herregulina" (HRG) se refiere a un polipéptido codificado por el producto génico de herregulina que se divulga en la patente de Estados Unidos n.º 5641869) o en Marchionni y col., *Nature*, 362:312-318 (1993). Los ejemplos de herregulinas incluyen herregulina- $\alpha$ , herregulina- $\beta$ 1, herregulina- $\beta$ 2 y herregulina- $\beta$ 3 (Holmes et al., *Science*, 256:1205-1210 (1992); y la patente de Estados Unidos n.º 5641869); factor de diferenciación neu (NDF) (Peles et al. *Cell* 69: 205-216 (1992)); actividad inductora de receptor de acetilcolina (ARIA) (Falls et al. (1993) *Cell* 72:801-815); factores de crecimiento gliales (GGF) (Marchionni y col., *Nature*, 362:312-318 (1993)); factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF) (Ho et al. *J. Biol. Chem.*, 270:14523-14532 (1995));  $\gamma$ -herregulina (Schaefer et al., *Oncogene*, 15:1385-1394 (1997)). El término incluye fragmentos biológicamente activos y/o variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido de HRG de secuencia natural, tal como un fragmento de dominio de tipo EGF del mismo (por ejemplo, HRG $\beta$ 1177-244).

Un "heterooligómero de HER" es un oligómero asociado de forma no covalente que comprende al menos dos receptores ErbB diferentes. Un "dímero de ErbB" es un oligómero asociado de forma no covalente que comprende dos receptores de ErbB diferentes. Dichos complejos se pueden formar cuando una célula que expresa dos o más receptores de ErbB se expone a un ligando de ErbB. Los oligómeros de ErbB, tales como los dímeros de ErbB, se pueden aislar mediante inmunoprecipitación y analizarse por SDS-PAGE como se describe en Sliwkowski et al., *J. Biol. Chem.*, 269(20): 14661-14665 (1994), por ejemplo. Los ejemplos de dichos heterooligómeros de ErbB incluyen los complejos EGFR-ErbB2 (también denominado como HER1/HER2), ErbB2-ErbB3 (HER2/HER3) y ErbB3-ErbB4 (HER3/HER4). Por otra parte, el heterooligómero de ErbB puede comprender dos o más receptores de ErbB2 combinados con un receptor de ErbB diferente, tales como ErbB3, ErbB4 o EGFR (ErbB 1). Otras proteínas, tales como una subunidad del receptor de citoquinas (por ejemplo, gp130) pueden asociarse con el heterooligómero.

Un polipéptido de "secuencia natural" es aquel que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido, por ejemplo, receptor de antígeno asociado a tumor, derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos de secuencia natural se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir por medios recombinantes o sintéticos. Por tanto, un polipéptido de secuencia natural puede tener la secuencia de aminoácidos de un polipéptido humano, polipéptido murino o polipéptido procedente de cualquier otra especie de mamífero que se produce naturalmente.

La expresión "variante de secuencia de aminoácido" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian en cierto grado de un polipéptido de secuencia natural. Generalmente, las variantes de secuencia de aminoácidos tendrán al menos un 70 % de homología con al menos un dominio de unión a receptor de un ligando natural, o con al menos un dominio de unión a ligando de un receptor natural, tal como un antígeno asociado a un tumor y, preferentemente, será de al menos aproximadamente un 80 %, más preferentemente, al menos aproximadamente un 90 % de homología con dicho receptor o dominios de unión a ligando. Las variantes de secuencia de aminoácidos tienen sustituciones, deleciones y/o inserciones en determinadas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos natural.

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

"Citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpos unidos a una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. Las células principales para mediar la ADCC, los linfocitos NK, expresan solamente Fc $\gamma$ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, (1991) *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92. Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede llevar a cabo un ensayo ADCC *in vitro*, tal como se describe en las patentes de Estados Unidos números 5500362 o 5821337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa o adicional, la actividad ADCC de la molécula de interés puede determinarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes et al., *Prco. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:652-656 (1998).

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une con la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia natural. Por otra parte, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, y Fc $\gamma$ RIII,

incluyendo las variantes alélicas y las formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores de FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activante") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático. (Véase revisión M. en Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); y de Haas y col., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto. (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117:587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

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

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo concreto a su antígeno concreto. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente en todos los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados regiones hipervariables en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se denominan "regiones estructurales" (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración en lámina β, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β. La regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo con un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

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

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

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

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

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos

claramente distintos, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

5 Los fragmentos de anticuerpos "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite al scFv para formar la estructura deseada para la unión del antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

10 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Utilizando un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen los diacuerpos más  
15 completamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos  
20 humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los correspondientes residuos no humanos. Asimismo, los anticuerpos humanizados pueden  
25 comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana o todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo  
30 humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una parte de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al. (1986) *Nature*, 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-329; y Presta, (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596.

35 Los anticuerpos humanizados dirigidos contra ErbB2 incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) como se describe en la Tabla 3 de la patente de Estados Unidos Nº 5821337 que se ha incorporado por referencia en el presente documento de forma expresa; los anticuerpos 520C9 humanizados (documento WO 93/21319) y 2C4 humanizados como se describe más adelante en el presente documento.

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

Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de interés es uno capaz de unirse al antígeno con afinidad suficiente de tal manera que el anticuerpo es útil al dirigirse a una célula que expresa el antígeno.

55 Un anticuerpo que "induce apoptosis" es uno que induce la muerte celular programada como se determina por la unión de anexina V, fragmentación de ADN, encogimiento celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominados cuerpos apoptóticos). La célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas o vejiga. Están disponibles diversos métodos para evaluar los acontecimientos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de fosfatidil serina (PS) puede medirse por unión de anexina; la fragmentación de ADN puede evaluarse mediante comparación con marcadores de ADN; y la condensación nuclear/de cromatina junto con fragmentación a lo largo del ADN puede evaluarse por cualquier aumento en células hipodiploides.

65 Un "trastorno" es cualquier dolencia que se beneficiaría del tratamiento de la presente invención. Esto incluye

trastornos crónicos y agudos o enfermedades que incluyen dichas patologías que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitativos de trastornos que se van a tratar en el presente documento incluyen tumores benignos y malignos; leucemia y neoplasias malignas, en particular cáncer de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas, próstata o vejiga; trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrofágicos, estromales y blastocélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunitarios.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida que el fármaco puede evitar el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, este puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia contra el cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (RR).

La expresión "cantidad sustancial" se refiere a una mayoría, es decir >50 % de una población, de una recogida o una muestra.

La expresión "metabolito intracelular" se refiere a un compuesto resultante de un proceso o reacción metabólica en el interior de una célula en un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC). El proceso o reacción metabólica puede ser un proceso enzimático tal como una escisión proteolítica de un enlazador peptídico del ADC, o la hidrólisis de un grupo funcional tal como una hidrazona, éster o amida. Los metabolitos intracelulares incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos y fármacos libres que han experimentado escisión intracelular después de la entrada, difusión, captación o transporte al interior de una célula.

Las expresiones "escindido intracelularmente" y "escisión intracelular" se refieren a un proceso o reacción metabólica en el interior de una célula sobre un conjugado fármaco-ligando, conjugado fármaco-enlazador-ligando, un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) o similar en donde la unión covalente, por ejemplo, el enlazador, entre el resto de fármaco (D) y el anticuerpo (Ab) se rompe, dando como resultado el fármaco libre disociado del anticuerpo en el interior de la célula. Los restos escindidos del conjugado fármaco-ligando, un conjugado fármaco-enlazador-ligando o ADC son por tanto metabolitos intracelulares.

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

El término "actividad citotóxica" se refiere la destrucción de células, efecto citostático o antiproliferativo de un conjugado de anticuerpo y fármaco o de un metabolito intracelular de un compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco. La actividad citotóxica se puede expresar como el valor de la  $CI_{50}$ , que es la concentración (molar o másica) por unidad de volumen a la que sobrevive la mitad de las células.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Un "tumor" comprende una o más células cancerosas. Los ejemplos de cáncer incluyen, aunque no de forma limitativa, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico ("CPNM"), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma del pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

Un "cáncer que expresa ErbB2" es uno que produce niveles suficientes de ErbB2 en la superficie de las células del mismo, de tal forma que un anticuerpo dirigido contra ErbB2 se puede unir a las mismas y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer.

Un cáncer "caracterizado por la activación excesiva" de un receptor de ErbB2 es uno en el que el grado de activación del receptor de ErbB2 en las células cancerosas supera significativamente el nivel de activación de dicho receptor en las células no cancerosas del mismo tipo de tejido. Dicha activación excesiva puede ser el resultado de una expresión en exceso del receptor de ErbB2 y/o de niveles superiores a los normales de un ligando de ErbB2 disponible para activar el receptor de ErbB2 en las células cancerosas. Dicha activación excesiva puede producir y/o estar causada por el estado maligno de una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el cáncer se someterá a un



ensayo de diagnóstico o pronóstico para determinar si la amplificación y/o la expresión en exceso de un receptor de ErbB2 se está produciendo y da como resultado dicha activación excesiva del receptor de ErbB2. De forma alternativa o adicional, el cáncer se puede someter a un ensayo de diagnóstico o pronóstico para determinar si la amplificación y/o la expresión en exceso de un ligando de ErbB2 se está produciendo en el cáncer, lo que se atribuye a una activación excesiva del receptor. En un subconjunto de dichos cánceres, una activación excesiva del receptor puede ser el resultado de una ruta de estimulación autocrina.

Un cáncer que "expresa en exceso" un receptor de ErbB2 es uno que tiene niveles significativamente más elevados de un receptor de ErbB2 en la superficial celular de la misma, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo tisular. Dicha expresión en exceso puede estar provocada por la amplificación génica o por transcripción o traducción aumentadas. La expresión en exceso del receptor de ErbB2 se puede determinar en un ensayo de diagnóstico o pronóstico mediante la evaluación de los niveles aumentados de la proteína ErbB2 presente en la superficie de una célula (por ejemplo, mediante un ensayo de inmunohistoquímica; IHC). De forma alternativa, o adicional, se pueden medir los niveles del ácido nucleico que codifica ErbB2 en la célula, por ejemplo, mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH; véase el documento WO 98/45479), transferencia Southern o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). La expresión en exceso del ligando de ErbB2, puede determinarse de forma diagnóstica evaluando los niveles del ligando (o ácido nucleico que lo codifica) en el paciente, por ejemplo, en una biopsia tumoral o por diversos ensayos de diagnóstico tales como los ensayos IHC, FISH, transferencia Southern, PCR o los ensayos *in vivo* descritos anteriormente. También se puede estudiar la expresión en exceso de receptor de ErbB2 midiendo el antígeno desprendido (por ejemplo, dominio extracelular de ErbB2) en un fluido biológico tal como suero (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 4933294; WO 91/05264; patente de Estados Unidos n.º 5401638; y Sias et al., (1990) J. Immunol Methods, 132: 73-80). Además de los anteriores ensayos, están disponibles otros ensayos *in vivo* para el especialista experto. Por ejemplo, se pueden exponer células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está marcado opcionalmente con un marcador detectable, por ejemplo, por ejemplo un isótopo radioactivo, y puede evaluarse la unión del anticuerpo con células en el paciente, por ejemplo, mediante barrido externo de la radioactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente anteriormente expuesto al anticuerpo.

Los tumores que expresan HER2 en exceso reciben puntuaciones inmunohistoquímicas correspondientes al número de copias de moléculas HER2 expresadas por célula, y se puede determinar por vía bioquímica: 0 = 0-10.000 copias/célula, 1+ = al menos aproximadamente 200.000 copias/célula, 2+ = al menos aproximadamente 500.000 copias/célula, 3+ = aproximadamente 1-2 x 10<sup>6</sup> copias/célula. La expresión de BER2 en exceso en el nivel 3+, que conduce a la activación independiente del ligando de la tirosina quinasa (Hudziak et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7159-7163), se produce en aproximadamente un 30 % de los cánceres de mama y, en estas pacientes, la supervivencia sin recidiva y la supervivencia global está disminuida (Slamon et al., (1989) Science, 244:707-712; Slamon y col., (1987) Science, 235:177-182).

Por el contrario, un cáncer que "no está caracterizado por la expresión en exceso del receptor de ErbB2" es uno en el que, en un ensayo diagnóstico, no expresa niveles del receptor de ErbB2 superiores a los normales, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo tisular.

La expresión "agente citotóxico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o produce la destrucción de las células. Se pretende que el término incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, <sup>211</sup>At, <sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>90</sup>Y, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>153</sup>Sm, <sup>212</sup>Bi, <sup>32</sup>P, <sup>60</sup>C, e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluidos los análogos sintéticos y sus derivados. En un aspecto, el término no pretende incluir isótopos radiactivos.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN® ciclofosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbociona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina; TLK 286 (TELCYTA™); acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina incluyendo el análogo sintético de topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatrina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; bisfosfonatos, tal como clodronato; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente calicamicina gamma 11 y calicamicina omega 11 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)) y antracilinas tales como annamicina, AD 32, alcarrubicina, daunorubicina, dextrazoxano, DX-52-1, epirubicina, GPX-100, idarubicina, KRN5500, menogaril, dinemicina, incluyendo dinemicina A, una

esperamicina, cromóforos de neocarzinostatina y cromóforos del antibiótico enediina de la cromoproteína relacionada, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, doxorubicina liposómica, y desoxidoxorrubicina), esorrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, y zorrubicina; análogos del ácido fólico tales como denopterina, pteropterina, y trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, y tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, y floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestana, y testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, y trilostano; relleno de ácido fólico tal como ácido fólico (leucovorina); aceglatona; agentes antineoplásicos dirigidos contra folato tales como ALIMTA®, LY231514 pemetrexed, inhibidores de la dihidrofolato reductasa tales como metotrexato, antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo (5-FU) y sus profármacos tales como UFT, S-1 y capecitabina, e inhibidores de la timidilato sintasa e inhibidores de la glicinamida ribonucleótido formiltransferasa tales como raltitrexed (TOMUDEX<sup>RM</sup>, TDX); inhibidores de la dihidropirimidina deshidrogenasa tal como eniluracilo; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epitolona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2''-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides y taxanos, por ejemplo, TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE<sup>TM</sup> exento de cremóforo, formulación de nanopartículas de paclitaxel diseñadas con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y TAXOTERE® doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; platino; análogos de platino o análogos basados en platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); alcaloide de la vinca; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatraxato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxiplatino (ELOXATIN<sup>TM</sup>) combinado con 5-FU y leucovorina.

Incluidos también en esta definición están los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre los tumores tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® toremifeno; inhibidores de la aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® megestrol acetato, AROMASIN® exemestano, Pfizer), formestano, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol, y ARIMIDEX® anastrozol; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo nucleosídico de 1,3-dioxolano citosina; oligonucleótidos de sentido contrario, especialquier aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacunas para terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; el inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Como se usa en el presente documento, "fármaco dirigido a EGFR" se refiere a un agente terapéutico que se une con EGFR y, opcionalmente, inhibe la activación de EGFR. Los ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Los ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase, patente de EE.UU. n.º 4943533, Mendelsohn *et al.*) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBITUX®) y 225 humano remodelado (H225) (véase, documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); anticuerpos que se unen con EGFR mutante de tipo II (patente de Estados Unidos n.º 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR como se describen en la patente de Estados Unidos n.º 5891996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales como ABX-EGF (véase el documento WO 98/50433, Abgenix). El anticuerpo dirigido contra EGFR puede conjugarse con un agente citotóxico, generando de este modo un inmunoconjugado (véase, por ejemplo, el documento EP 659.439A2), Merck Patent GmbH). Los ejemplos de moléculas pequeñas que se unen a EGFR incluyen ZD1839 o Gefitinib (IRESSA<sup>TM</sup>; Astra Zeneca), Erlotinib HCl (CP-358774, TARCEVA<sup>TM</sup>; Genentech/OSI) y AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen).

Un "inhibidor de tirosina quinasa" es una molécula que inhibe en cierta medida la actividad tirosina quinasa de una tirosina quinasa tal como un receptor de ErbB. Los ejemplos de dichos inhibidores incluyen los fármacos dirigidos a EGFR indicados en los párrafos anteriores, así como las quinazolininas tales como PD 153035, 4-(3-cloroanilino)quinazolina, piridopirimidinas, pirimidopirimidinas, pirrolpirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706, y pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d] pirimidinas, curcumina (diferuloil metano, 4,5-bis (4-fluoroanilino)ftalimida), tirfostinas que contienen restos de nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas de sentido contrario (por ejemplo las que se unen con ácido nucleico que codifica ErbB); quinoxalinas (patente de Estados Unidos n.º 5,804,396); trifostinas (patente de Estados Unidos n.º 5804396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); pan-inhibidores de ErbB tales como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/lilly); Imatinib mesilato (Gleevac; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxanib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); o como se ha descrito en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: patente de Estados Unidos n.º 5804396; WO 99/09016 (American Cyanamid); WO 98/43960 (American Cyanamid); WO 97/38983 (Warner Lambert); WO 99/06378 (Warner Lambert); WO 99/06396 (Warner Lambert); WO 96/30347 (Pfizer, Inc); WO 96/33978 (Zeneca); WO 96/3397 (Zeneca); y WO 96/33980 (Zeneca).

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

El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan en otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citoquinas son linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas del crecimiento, tal como hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento humana con N-metionilo y la hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glucoproteicas, tales como la hormona foliculo estimulante (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factores  $\alpha$  y  $\beta$  de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento neural, tal como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento derivado de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF), tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; factor de crecimiento similar a la insulina-I y -II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón- $\alpha$ , - $\beta$  y - $\gamma$ ; factores estimulantes de colonias (CSF), tales como CSF de macrófagos (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (IL) tales como IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ ; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando de kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

El término "profármaco", tal como se usa en esta solicitud se refiere a una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco progenitor y es capaz de activarse enzima o hidrolíticamente o convertirse en una forma progenitora más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), págs. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados por D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen  $\beta$ -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco exento de citotoxicidad más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivatizar en una forma de profármaco para el uso en la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, dichos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para la administración de un fármaco (tal como para la inclusión de anticuerpos dirigidos contra CD30, CD40, CD70 o Lewis Y, y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico) a un mamífero. Los componentes del liposoma habitualmente están dispuestos en una formación de bicapa, similar a la disposición lipídica de las membranas biológicas. El término "prospecto" se usa para referirse a instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosificación, administración, las contraindicaciones y/o las advertencias en referencia al uso de tales productos terapéuticos.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que normalmente está asociada en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislado es diferente en la forma o configuración de la que se

encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan normalmente el anticuerpo donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se encuentra en una localización cromosómica distinta de la de las células naturales.

5 La expresión "secuencias de control" se refieren a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación unida de manera operativa a un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

15 Un ácido nucleico está "unido de manera operativa" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder de secreción está operativamente unido al ADN de un polipéptido si se expresa en forma de una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operablemente unido a una secuencia de codificación si altera la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia de codificación si está colocado de manera que facilite la traducción. En general, "unido de manera operativa" significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas, y, en el caso de un líder de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La unión se puede llevar a cabo mediante ligadura en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se pueden utilizar adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

25 Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea de células," y "cultivo celular" pueden usarse de forma indistinta y todas estas denominaciones incluyen la descendencia. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas", incluyen la célula primaria sujeto y los cultivos derivados de los anteriores sin tener en cuenta el número de transferencias. Se entiende también que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada para la célula originalmente transformada. Cuando se propongan designaciones distintas, esto será evidente según el contexto.

30 En el presente documento, una "enfermedad autoinmunitaria" es una enfermedad o trastorno que procede y se dirige contra los propios tejidos de un individuo o un segregado simultáneo o manifestación del mismo o dolencia resultante del anterior. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, aunque no de forma limitativa, artritis (artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artrosis, artritis psoriásica y espondilitis anquilosante), psoriasis, dermatitis incluida la dermatitis atópica; urticaria idiopática crónica, incluida la urticaria crónica autoinmunitaria, polimiositis/dermatomiositis, necrolisis epidérmica tóxica, escleroderma sistémico y esclerosis, respuestas asociadas con la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), y enfermedad inflamatoria del intestino (EII) con cosegregados de pioderma gangrenoso, eritema nudoso, colangitis esclerosante primaria, y/o episcleritis), síndrome de dificultad respiratoria, incluido síndrome de dificultad respiratoria en el adulto (SDRA), meningitis, enfermedades mediadas por IgE tales como la anafilaxia y rinitis alérgica, encefalitis tales como la encefalitis de Rasmussen, uveítis, colitis tales como colitis microscópica y colitis colagenosa, glomerulonefritis (GN) tales como GN membranosa, GN membranosa idiopática, GN membranosa proliferativa (MPGN), incluidos el Tipo I y el Tipo II, y la GN rápidamente progresiva, dolencias alérgicas, eccema, asma, dolencias que implican la infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas, aterosclerosis, miocarditis autoinmunitaria, deficiencia de adhesión de leucocitos, lupus sistémico eritematoso (LSE) tal como LSE cutáneo, lupus (que incluye nefritis, cerebritis, pediátrico, no renal, discoide, alopecia), diabetes de inicio juvenil, esclerosis múltiple (EM) tal como la EM espinodorsal, encefalomielitis alérgica, respuestas inmunitarias asociadas con una hipersensibilidad aguda y retrasada mediada por las citoquinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis, incluida la granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitis (incluida vasculitis de vasos grandes (incluida la polimialgia reumática y la arteritis de células gigantes (de Takayasu)), vasculitis de vasos intermedios (incluyendo la enfermedad de Kawasaki y la poliarteritis nodosa), vasculitis del SNC, y vasculitis asociadas con ANCA, tal como la vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS)), anemia aplásica, anemia positiva de Coombs, eritroblastopenia congénita de Blackfan-Diamond, anemia hemolítica inmunitaria que incluye la anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA), anemia perniciosa, aplasia pura de glóbulos rojos (PRCA), deficiencia en factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmunitaria, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican la diapedesis leucocitaria, trastornos inflamatorios del SNC, síndrome de lesión multiorgánica, miastenia grave, enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, neuritis alérgica, enfermedad de Bechet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjorgen, síndrome de Stevens-Johnson, rechazo al trasplante de órgano sólido (incluido el pretratamiento de los títulos elevados de anticuerpos reactivos del panel, depósitos de IgA en tejidos, y rechazo que procede del trasplante renal, trasplante de hígado, trasplante intestinal, trasplante cardíaco, etc.), enfermedad de injerto contra hospedador (EICH), penfigoide ampolloso, pénfigo (incluidos pénfigo vulgar, foliáceo, y pénfigo mucoso-penfigoide de la membrana), poliendocrinopatías autoinmunitarias, enfermedad de Reiter, síndrome del hombre rígido, nefritis del complejo inmunitario, polineuropatías por IgM o polineuropatías mediadas por IgM, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia (tal como la desarrollada por pacientes con infarto de

miocardio, por ejemplo), incluida la trombocitopenia autoinmunitarias, enfermedad autoinmunitaria del testículo y ovario incluidas la orquitis autoinmunitaria y la ooforitis, hipotiroidismo primario; enfermedades endocrinas autoinmunitarias incluida la tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes poliglandulares endocrinopáticos), diabetes Tipo I, también denominada como diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), incluida la IDDM pediátrica y el síndrome de Sheehan; hepatitis autoinmunitaria, neumonitis intersticial linfóide (VIH), bronquiolitis obliterante (sin trasplante) frente a NSIP, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), cirrosis biliar primaria, celiaquía (enteropatía por gluten), esprúe resistente al tratamiento con un cosegregado de dermatitis herpetiforme, crioglobulinemia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA; enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad del oído interno autoinmunitaria (AIED), pérdida de la audición autoinmunitaria, síndrome de opsoclonía-mioclónia (OMS), policondritis tal policondritis resistente al tratamiento, proteinosis pulmonar alveolar, amiloidosis, hepatitis de células gigantes, escleritis, gammopatía monoclonal de significación indeterminada/desconocida (MGUS), neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, canelopatías tales como epilepsia, migraña, arritmias, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica, y canalopatías del SNC; autismo, miopatía inflamatoria, y glomeruloesclerosis focal segmental (FSGS).

"Alquilo" es un hidrocarburo  $C_1-C_{18}$  que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos. Los ejemplos son, metilo (Me,  $-CH_3$ ), etilo (Et,  $-CH_2CH_3$ ), 1-propilo (n-Pr, n-propilo,  $-CH_2CH_2CH_3$ ), 2-propilo (i-Pr, *i*-propilo,  $-CH(CH_3)_2$ ), 1-butilo (n-Bu, n-butilo,  $-CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 2-metil-1-propilo (i-Bu, *i*-butilo,  $-CH_2CH(CH_3)_2$ ), 2-butilo (s-Bu, *s*-butilo,  $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 2-metil-2-propilo (t-Bu, *t*-butilo,  $-C(CH_3)_3$ ), 1-pentilo (n-pentilo,  $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 2-pentilo ( $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$ ), 3-pentilo ( $-CH(CH_2CH_3)_2$ ), 2-metil-2-butilo ( $-C(CH_3)_2CH_2CH_3$ ), 3-metil-2-butilo ( $-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$ ), 3-metil-1-butilo ( $-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$ ), 2-metil-1-butil( $-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 1-hexilo ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 2-hexilo ( $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 3-hexilo ( $-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$ ), 2-metil-2-pentilo ( $-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$ ), 3-metil-2-pentilo ( $-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 4-metil-2-pentilo ( $-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$ ), 3-metil-3-pentilo ( $-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$ ), 2-metil-3-pentilo ( $-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$ ), 2,3-dimetil-2-butilo ( $-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$ ), 3,3-dimetil-2-butilo ( $-CH(CH_3)C(CH_3)_3$ ).

"Alqueno" es un hidrocarburo  $C_2-C_{18}$  que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos, con al menos un sitio de insaturación, es decir un doble enlace carbono-carbono,  $sp^2$ . Los ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa: etileno o vinilo ( $-CH=CH_2$ ), alilo ( $-CH_2CH=CH_2$ ), ciclopentenilo ( $-C_5H_7$ ) y 5-hexenilo ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH=CH_2$ ).

"Alquino" es un hidrocarburo  $C_2-C_{18}$  que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos, con al menos un sitio de insaturación, es decir un triple enlace carbono-carbono  $sp$ . Los ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa: acetilénico ( $-C\equiv CH$ ) y propargilo ( $-CH_2C\equiv CH$ ).

Alquileo se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada o cíclico de 1-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes derivado mediante la retirada de dos átomos de hidrógeno de los mismos o dos átomos de carbono diferentes de un alcano precursor. Los radicales alquileo típicos incluyen, aunque no de forma limitativa: metileno ( $-CH_2-$ ), 1,2-etilo ( $-CH_2CH_2-$ ), 1,3-propilo ( $-CH_2CH_2CH_2-$ ), 1,4-butilo ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ) y similares.

"Alqueno" se refiere a un radical hidrocarburo insaturado, de cadena lineal o ramificada o cíclico de 2-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes derivado mediante la retirada de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alqueno precursor. Los radicales alqueno típicos incluyen, aunque no de forma limitativa: 1,2-etileno ( $-CH=CH-$ ).

"Alquino" se refiere a un radical hidrocarburo insaturado, de cadena lineal o ramificada o cíclico de 2-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes derivado mediante la retirada de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alquino precursor. Los radicales alquino típicos incluyen, aunque no de forma limitativa: acetileno ( $-C=C-$ ), propargilo ( $-CH_2C=C-$ ), y 4-pentinilo ( $-CH_2CH_2CH_2C=CH-$ ).

"Ariilo" se refiere a un radical hidrocarburo aromático monovalente de 6-20 átomos de carbono obtenido por la retirada de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillo aromático precursor. Algunos grupos ariilo se representan en las estructuras a modo de ejemplo como "Ar". Los grupos ariilo típicos incluyen, aunque no de forma limitativa, los radicales se derivan a partir de benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares.

"Ariilalquilo" se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno enlazados a un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono terminal o  $sp^3$ , está sustituido por un radical ariilo. Los grupos ariilalquilo típicos incluyen, aunque no de forma limitativa, bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-ilo y similares. El grupo ariilalquilo comprende 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, el resto alquilo, incluyendo los grupos alcanilo, alqueno o alquino, del resto ariilalquilo tiene de 1 a 6 átomos de carbono y el resto ariilo tiene de 5 a 14 átomos de carbono.

"Heteroarilalquilo" se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno enlazados a un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono terminal o  $sp^3$ , está sustituido por un radical heteroarilo. Los grupos heteroarilalquilo típicos incluyen, aunque no de forma limitativa, 2-bencimidazolimetilo, 2-furiletilo, y similares. El grupo heteroarilalquilo comprende 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, el resto alquilo, incluyendo los grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del grupo heteroarilalquilo tiene 1 a 6 átomos de carbono, y el resto heteroarilo tiene 5 a 14 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P, y S. El resto heteroarilo del grupo heteroarilalquilo puede ser un monociclo que tiene de 3 a 7 miembros del anillo (2 a 6 átomos de carbono) o un biciclo que tiene 7 a 10 miembros del anillo (4 a 9 átomos de carbono) y 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6].

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

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

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

Los ejemplos de heterociclos incluyen a modo de ejemplo y no de limitación piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo oxidado con azufre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzimidazolilo, 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, cinolinilo, pteridinilo, 4aH-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, benzoisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo, e isatinoílo.

A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos unidos a carbono están unidos en la posición 2, 3, 4, 5, o 6 de una aziridina, posición 3, 4, 5, o 6 de una piridazina, posición 2, 4, 5, o 6 de una pirimidina, posición 2, 3, 5, o 6 de una pirazina, posición 2, 3, 4, o 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, posición 2, 4, o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, posición 3, 4, o 5 de un isooxazol, pirazol, o isotiazol, posición 2 o 3 de una aziridina, posición 2, 3, o 4 de una acetidina, 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. De forma aún más típica, 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.

A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos unidos a nitrógeno están unidos en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, posición 2 de un isoindol o isoindolina, posición 4 de una morfolina, y posición 9 de un carbazol o β-carbolina. De forma aún más típica, los heterociclos unidos a nitrógeno incluyen 1-aziridilo, 1-azetidilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo y 1-piperidinilo.

"Carbociclo" significa un anillo saturado o insaturado que tiene 3 a 7 átomos de carbono como un monociclo o 7 a 12 átomos de carbono como un biciclo. Los carbociclos monocíclicos tienen de 3 a 6 átomos de anillo, aún más normalmente 5 o 6 átomos de anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen de 7 a 12 átomos de anillo, por ejemplo, dispuestos como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], o 9 o 10 átomos del anillo dispuestos como un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. Los ejemplos de carbociclos 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 y ciclooctilo.

"Enlazador", "Unidad enlazadora", o "engarce" significa un resto químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que unen covalentemente un anticuerpo a un resto de fármaco. En diversas realizaciones, un enlazador se especifica como LU. Los enlazadores incluyen una radical divalente tal como un alquildilo, un arildilo, un heteroarildilo, restos tales como:  $-(CR_2)_nO(CR_2)_m-$ , unidades de repetición de alquiloxi (por ejemplo, polietiloxi, PEG, polimetilenoxi) y alquilamino (por ejemplo, polietilenoamino, Jeffamine™); y éster diácido y amidas que incluyen succinato, succinamida, diglicolato, malonato, y caproamida.

El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superposición del compañero de imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que pueden superponerse sobre sus compañeros de imagen especular.

El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen una constitución química idéntica, pero se diferencian con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

"Diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen propiedades físicas diferentes, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros pueden separarse mediante procedimientos analíticos de alta resolución, tales como electroforesis y cromatografía.

"Enantiómeros" se refiere a estereoisómeros de un compuesto que no son imágenes especulares superponibles entre sí.

Las convenciones y definiciones estereoquímicas usadas en el presente documento siguen generalmente a S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel, E. y Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Muchos de los compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de luz polarizada. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L o R y S, se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula en torno a su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el sentido de rotación del plano de luz polarizada por el compuesto, significando (-) o l que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos salvo por que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico puede denominarse también enantiómero y una mezcla de dichos isómeros se denomina a menudo una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o racemato, que puede aparecer cuando no ha habido estereoselección ni estereoespecificidad en un proceso o reacción química. Las expresiones "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovista de actividad óptica.

Los ejemplos de un "paciente" incluyen, aunque no de forma limitativa, un ser humano, rata, ratón, cobaya, mono, cerdo, cabra, vaca, caballo, perro, gato, pájaros y aves. En una realización ilustrativa, el paciente es un ser humano.

"Ariilo" se refiere a un grupo aromático carbocíclico. Los ejemplos de grupos ariilo incluyen, aunque no de forma limitativa, fenilo, naftilo y antraceno. Un grupo carbocíclico aromático o un grupo heterocíclico aromático puede estar no sustituido o sustituido con uno o más grupos entre los que se incluyen, aunque no de forma limitativa, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; en el que cada R' se selecciona de forma independiente entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y ariilo.

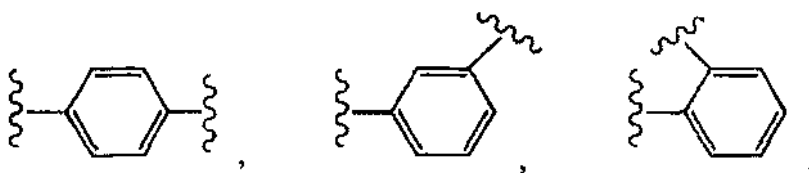
El término "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, que tiene de 1 a 8 átomos de carbono. Los grupos "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>" representativos incluyen, aunque no de forma limitativa, -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo, -n-octilo, -n-nonilo y -n-decilo; mientras que los alquilos C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> ramificados incluyen, aunque no de forma limitativa, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -*tert*-butilo, -isopentilo, 2-metilbutilo], los alquilos C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> insaturados incluyen, aunque no de forma limitativa, -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, -acetilenilo, -propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo, -3-metil-1 butinil metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *tert*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo, neopentilo, *n*-hexilo, isohexilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetil-butilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 2,3,4-trimetilpentilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilhexilo, 2,4-dimetilhexilo, 2,5-dimetilhexilo, 3,5-dimetilhexilo, 2,4-dimetilpentilo, 2-metilheptilo, 3-metilheptilo, *n*-heptilo, isoheptilo, *n*-octilo, e isooctilo. Un grupo "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>" puede estar sustituido o no sustituido con uno o más grupos que incluyen, aunque no de forma limitativa, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; donde cada R' se selecciona de forma independiente entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y ariilo.

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

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

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

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



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

Un "heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>" se refiere a un carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> aromático o no aromático en el que uno a cuatro de los átomos de carbono del anillo están sustituidos de forma independiente con un heteroátomo del grupo que consiste en O, S y N. Los ejemplos representativos de un heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> incluyen, aunque no de forma limitativa, benzofuranilo, benzotiofeno, indolilo, benzopirazolilo, cumarinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo. Un heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> puede estar sustituido o no sustituido con hasta siete grupos que incluyen, aunque no de forma limitativa, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; en el que cada R' se selecciona de forma independiente entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo.

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

Un "Compuesto ilustrativo" es un Compuesto de fármaco o un Compuesto de fármaco-enlazador.

Un "Conjugado ilustrativo" es un Conjugado fármaco-ligando que tiene una unidad de fármaco escindible del Conjugado fármaco-ligando o un Conjugado fármaco-enlazador-ligando.

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

Los ejemplos de "grupo protector de hidroxilo" incluyen, aunque no de forma limitativa, éter de metoximetilo, éter de 2-metoxietoximetilo, éteres de tetrahidropiranilo, éter de bencilo, éter de p-metoxibencilo, éter de trimetilsililo, éter de trietilsililo, éter de triisopropilsililo, éter de t-butildimetilsililo, éter de trifenilmetilsililo, éster de acetato, ésteres de acetato sustituidos, pivaloato, benzoato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato.

"Grupo saliente" se refiere a un grupo funcional que puede estar sustituido por otro grupo funcional. Dichos grupos



salientes son bien conocidos en la técnica y los ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa, un haluro (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), metanosulfonilo (mesilo), p-toluensulfonilo (tosilo), trifluorometilsulfonilo (triflato), y trifluorometilsulfonato.

- 5 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un Compuesto ilustrativo o Conjugado ilustrativo. Los Compuestos ilustrativo y Conjugados ilustrativos pueden contener al menos un grupo amino, y, de acuerdo con ello, se pueden formar sales de adición de ácidos con este grupo amino. Las sales ilustrativas incluyen, aunque no de forma limitativa, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato de ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato de ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraion. El contraion puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que establezca la carga del compuesto precursor. Asimismo, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/ uno o más contraiones.
- 10
- 15
- 20 "Solvato farmacéuticamente aceptable" o "solvato" se refiere a una asociación de una o más moléculas de disolvente y un compuesto de la invención, por ejemplo, un Compuesto ilustrativo o Conjugado ilustrativo. Los ejemplos de disolventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque no de forma limitativa, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.
- 25 Las siguientes abreviaturas se usan en el presente documento y tienen las definiciones indicadas: AE es auristatina E, Boc es *N*-(*t*-butoxicarbonilo), cit es citrulina, dap es dolaproina, DCC es 1,3-diciclohexilcarbodiimida, DCM es diclorometano, DEA es dietilamina, DEAD es dietilazodicarboxilato, DEPC es dietilfosforilcianidato, DIAD es diisopropilazodicarboxilato, DIEA es *N,N*-diisopropiletilamina, dil es dolaisoleuina, DMAP es 4-dimetilaminopiridina, DME es etilenglicol dimetil éter (o 1,2-dimetoxietano), DMF es *N,N*-metilformamida, DMSO es dimetilsulfóxido, doe es dolafenina, dov es *N,N*-dimetilvalina, DTNB es 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), DTPA es ácido dietilentriaminopentaacético, DTT es ditiotreitolo, EDCI es clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, EEDQ es 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, ES-MS es espectrometría de masas con electropulverización, EtOAc es acetato de etilo, Fmoc es *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonilo), gly es glicina, HATU es hexafluorofosfato de 0-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio, HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, HPLC es cromatografía líquida de alta presión, ile es isoleucina, lys es lisina, MeCN (CH<sub>3</sub>CN) es acetonitrilo, MeOH es metanol, *tris* 4-anisildifenilmetilo (o 4-metoxitriilo), no es (1*S*, 2*R*)-(+)-norefedrina, PAB es *p*-aminobencilo, PBS es solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4), PEG es polietilenglicol, Ph es fenilo, Pnp es *p*-nitrofenilo, MC es 6-maleimidocaproilo, phe es L-fenilalanina, PyBrop es hexafluorofosfato de bromo *tris*-pirrolidinfosfonio, SEC es cromatografía de exclusión molecular, Su es succinimida, TBTU es tetrafluoroborato de *O*-benzotriazol-1-il-*N,N,N,N*-tetrametiluronio, TFA es ácido trifluoroacético, TLC es cromatografía en capa fina, UV es ultravioleta, y val es valina.
- 30
- 35
- 40

Las siguientes abreviaturas de enlazadores se usan en el presente documento y tienen las definiciones indicadas: Val Cit es un sitio dipéptido de valina-citrulina en el enlazador de la proteasa escindible; PAB es *p*-aminobencilcarbamoilo; (Me)vc es *N*-metil-valina citrulina, donde el enlace peptídico del enlazador se ha modificado para evitar su escisión por la catépsina B; MC(PEG)6-OH es maleimidocaproilpolietilenglicol; SPP es 4-(2-piridilditio)pentanoato de *N*-succinimidilo; y SMCC es 4-(*N*-maleimidornetil) ciclohexano-1-carboxilato de *N*-succinimidilo.

45

- Los términos "tratar" o "tratamiento", a no ser que el contexto indique otra cosa, se refieren tanto a un tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas, cuyo objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico indeseado, como el desarrollo o proliferación del cáncer. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, aunque no de forma limitativa, alivio de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, patología estabilizada (es decir, sin empeoramiento), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la afección o trastorno así como aquellos propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que se quiera prevenir la afección o trastorno.
- 50
- 55

- En el contexto del cáncer, el término "tratamiento" incluye cualquiera o todos de: evitar el crecimiento de células tumorales, células cancerosas, o de un tumor; evitar la replicación de las células tumorales o las células cancerosas, disminuir la carga tumoral total o disminuir el número de células cancerosas, y mejorar uno o más de los síntomas asociados con la enfermedad.
- 60

- En el contexto de una enfermedad autoinmunitaria, el término "tratamiento" incluye cualquiera o todos de: evitar la replicación de las células asociadas con una patología autoinmunitaria incluyendo, aunque no de forma limitativa, las
- 65

células que producen un anticuerpo autoinmunitario, disminuir la carga de anticuerpo autoinmunitario y mejorar uno o más síntomas de una enfermedad autoinmunitaria.

5 En el contexto de una enfermedad infecciosa, el término "tratamiento" incluye cualquiera o todos de: evitar el crecimiento, la multiplicación o la replicación del patógeno que produce la enfermedad infecciosa y mejorar uno o más síntomas de una enfermedad infecciosa.

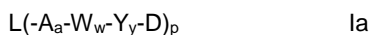
10 Las siguientes abreviaturas de fármacos citotóxicos se usan en el presente documento y tienen las definiciones indicadas: MMAE es monometil auristatina E (PM 718); MMAF es N-metilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproína-fenilalanina (PM 731,5); MMAF-DMAEA es MMAF con DMAEA (dimetilaminoetilamina) en un enlace amida con la fenilalanina del extremo C (PM 801,5); MMAF-TEG es MMAF con tetraetilenglicol esterificado con fenilalanina; MMAF-NtBu es N-t-butilo, unido como amida al extremo C de MMAF; AEVB es auristatina E valeril bencilhidrazona, un enlazador lábil a ácido a través del extremo C de AE (PM 732); y AFP es Monoamida de p-fenilendiamina con fenilalanina en el extremo C de Auristatina F (MW 732).

15

## 4.2 COMPUESTOS

### 4.2.1 LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA (Ia)

20 Se describen en el presente documento Conjugados de fármaco-enlazador-ligando que tienen la Fórmula Ia:



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

L- es una Unidad de ligando;

-A<sub>a</sub>-W<sub>w</sub>-Y<sub>y</sub>- es una Unidad de enlazador (LU), en la que la Unidad de enlazador incluye:

-A- es una Unidad ensanchadora,

30

a es 0 o 1,

cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido, w es un número entero comprendido entre 0 y 12,

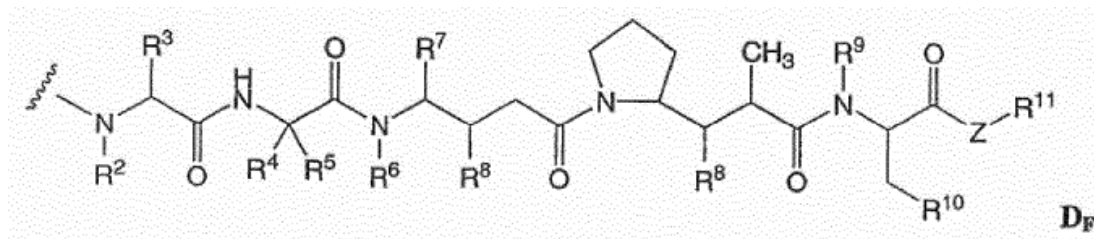
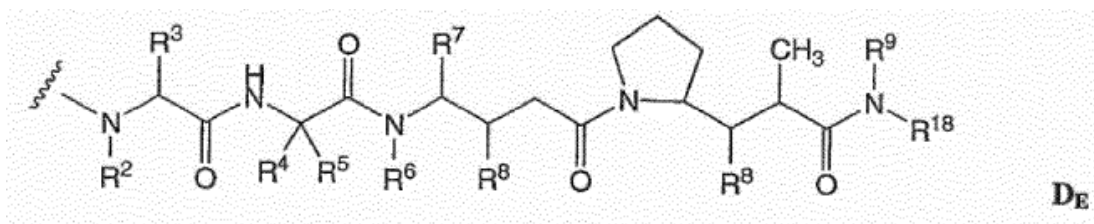
-Y- es una Unidad separadora, y

y es 0, 1 o 2;

p está comprendido de 1 a aproximadamente 20; y

35

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



40

en la que, independientemente en cada localización:

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

45

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

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

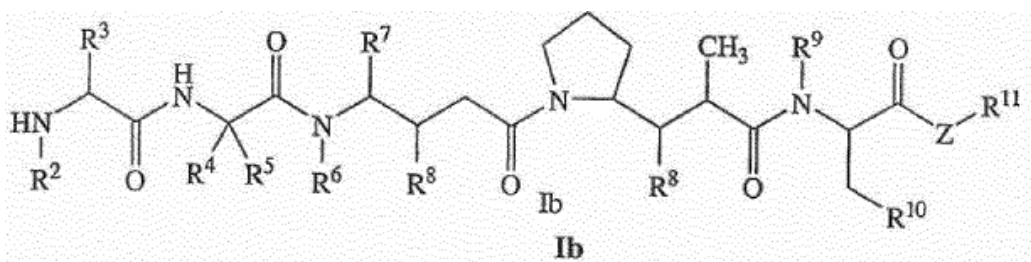
R<sup>5</sup> se selecciona entre H y metilo;

50

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

$R^6$  se selecciona entre H y alquilo  $C_1-C_8$ ;  
 $R^7$  se selecciona de H, alquilo  $C_1-C_8$ , carbociclo  $C_3-C_8$ , arilo, alquilarilo  $C_1-C_8$ , alquil  $C_1-C_8$ -(carbociclo  $C_3-C_8$ ), heterociclo  $C_3-C_8$  y alquil  $C_1-C_8$ -(heterociclo  $C_3-C_8$ );  
 cada  $R^8$  se selecciona independientemente entre H, OH, alquilo  $C_1-C_8$ , carbociclo  $C_3-C_8$  y -O-(alquilo  $C_1-C_8$ );  
 $R^9$  se selecciona entre H y alquilo  $C_1-C_8$ ;  
 $R^{10}$  se selecciona entre arilo o heterociclo  $C_3-C_8$ ;  
 Z es O, S, NH, o  $NR^{12}$ , en la que  $R^{12}$  es alquilo  $C_1-C_8$ ;  
 $R^{11}$  se selecciona de H, alquilo  $C_1-C_{20}$ , arilo, heterociclo  $C_3-C_8$ ,  $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ , o  $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ ;  
 m es un número entero comprendido de 1-1000;  
 $R^{13}$  es alquilo  $C_2-C_8$ ;  
 $R^{14}$  es H o alquilo  $C_1-C_8$ ;  
 cada aparición de  $R^{15}$  es independientemente H,  $COOH$ ,  $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ ,  $-(CH_2)_n-SO_3H$ , o  $-(CH_2)_n-SO_3$ -alquilo  $C_1-C_8$ ;  
 cada aparición de  $R^{16}$  es independientemente H, alquilo  $C_1-C_8$ , o  $-(CH_2)_n-COOH$ ;  
 $R^{18}$  se selecciona entre  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -arilo,  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(heterociclo  $C_3-C_8$ ), y  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(carbociclo  $C_3-C_8$ ); y  
 n es un número entero comprendido entre 0 y 6.

También se describen en el presente documento Compuestos de fármaco que tienen la Fórmula **Ib**:



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

$R^2$  se selecciona entre hidrógeno y alquilo  $-C_1-C_8$ ;  
 $R^3$  se selecciona entre hidrógeno, -alquilo  $C_1-C_8$ , carbociclo  $C_3-C_8$ , arilo, alquilarilo  $C_1-C_8$ , -alquil  $C_1-C_8$ -(carbociclo  $C_3-C_8$ ), - heterociclo  $C_3-C_8$  y -alquil  $C_1-C_8$ -(heterociclo  $C_3-C_8$ );  
 $R^4$  se selecciona entre hidrógeno, -alquilo  $C_1-C_8$ , carbociclo  $C_3-C_8$ , -arilo, alquilarilo  $C_1-C_8$ , -alquil  $C_1-C_8$ -(carbociclo  $C_3-C_8$ ), -heterociclo  $C_3-C_8$  y alquil  $-C_1-C_8$ -(heterociclo  $C_3-C_8$ ) en la que  $R^5$  se selecciona entre H y metilo; o  $R^4$  y  $R^5$  conjuntamente, tienen la fórmula  $-(CR^aR^b)_n-$  en la que  $R^a$  y  $R^b$  se selecciona independientemente entre -H, -alquilo  $C_1-C_8$  y carbociclo  $-C_3-C_8$  y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6 y forman un anillo con el átomo de carbono al que están unidos;  
 $R^6$  se selecciona entre H y -alquilo  $C_1-C_8$ ;  
 $R^7$  se selecciona de H, -alquilo  $C_1-C_8$ , carbociclo  $C_3-C_8$ , arilo, alquilarilo  $C_1-C_8$ , -alquil  $C_1-C_8$ -(carbociclo  $C_3-C_8$ ), - heterociclo  $C_3-C_8$  y -alquilo  $C_1-C_8$ -(heterociclo  $C_1-C_8$ );  
 cada  $R^8$  se selecciona independientemente entre H, -OH, -alquilo  $C_1-C_8$ , -carbociclo  $C_3-C_8$  y -O-(alquilo  $C_1-C_8$ );  
 $R^9$  se selecciona entre H y -alquilo  $C_1-C_8$ ;  
 $R^{10}$  se selecciona entre grupos arilo o heterociclo- $C_3-C_8$ ;  
 Z es -O-, -S-, -NH-, o  $-NR^{12}$ -, en la que  $R^{12}$  es alquilo  $C_1-C_8$ ;  
 $R^{11}$  se selecciona de H, alquilo  $C_1-C_{20}$ , arilo, heterociclo  $C_3-C_8$ ,  $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ , o  $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ ;  
 m es un número entero comprendido de 1-1000;  
 $R^{13}$  es -alquilo  $C_2-C_8$ ;  
 $R^{14}$  es H o -alquilo  $C_1-C_8$ ;  
 cada aparición de  $R^{15}$  es independientemente H,  $-COOH$ ,  $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ ,  $-(CH_2)_n-SO_3H$ , o  $-(CH_2)_n-SO_3$ -alquilo  $C_1-C_8$ ;  
 cada aparición de  $R^{16}$  es independientemente H, -alquilo  $C_1-C_8$ , o  $-(CH_2)_n-COOH$ ; y  
 n es un número entero comprendido entre 0 y 6.

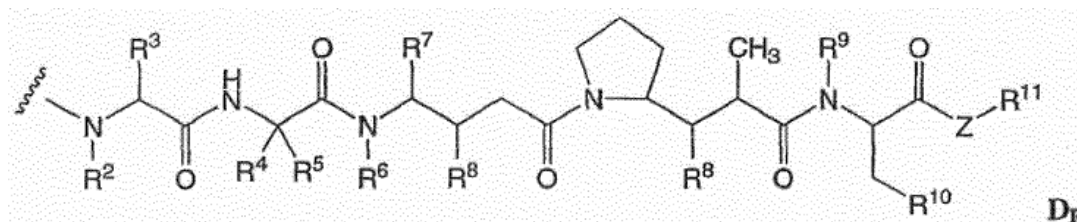
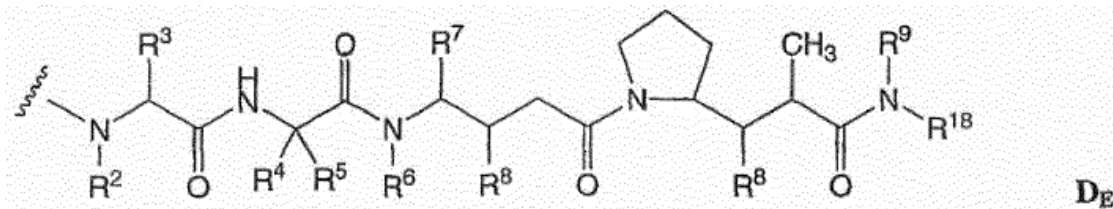
También se describen Conjugados de fármaco-enlazador-ligando que tienen la Fórmula **Ia'**:



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

Ab es un anticuerpo,

A es una unidad ensanchadora,  
 a es 0 o 1,  
 cada W es independientemente una unidad de aminoácido,  
 w es un número entero comprendido entre 0 y 12,  
 Y es una Unidad separadora, e y es 0, 1 o 2,  
 p está comprendido de 1 a aproximadamente 20, y  
 D es un Resto de fármaco seleccionado entre las Fórmulas D<sub>E</sub> y D<sub>F</sub>:



en la que, independientemente en cada localización:

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

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

- 45 (1)-(35);  
 (1) BMPR1B (receptor de la proteína morfogenética ósea - tipo IB, n.º de registro GenBank NM\_001203);  
 (2) E16 (LAT1, SLC7A5, n.º de registro GenBank NM\_003486);  
 (3) STEAP1 (antígeno epitelial seis transmembrana de la próstata, n.º de registro GenBank NM\_012449);  
 50 (4) 0772P (CA125, MUC16, n.º de registro GenBank AF361486);  
 (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina, n.º de registro GenBank  
 NM\_005823);

- (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIb, SLC34A2, familia 34 del transportador de soluto (fosfato de sodio), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente del sodio de tipo II, n.º de registro GenBank NM\_006424);
- (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de tromboespondina (tipo 1 y análogo al tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto, (semaforina) 5B, n.º de registro GenBank AB040878);
- 5 (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN ADNc 2700050C12, RIKEN ADNc 2700050C12 gen, n.º de registro GenBank AY358628);
- (9) ETBR (Receptores de tipo B de la endotelina, n.º de registro GenBank AY275463);
- (10) MSG783 (RNF124, proteína teórica FLJ20315, n.º de registro GenBank NM\_017763);
- 10 (11) STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial seis transmembrana de la próstata 2, proteína seis transmembrana de la próstata, n.º de registro GenBank AF455138);
- (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, receptor potencial transitorio del canal de cationes, subfamilia M, miembro 4, n.º de registro GenBank NM\_017636);
- 15 (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, n.º de registro GenBank NP\_003203 o NK\_003212);
- (14) CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus de Epstein-Barr) o Hs.73792, n.º de registro GenBank M26004);
- (15) CD79b (IGb (inmunoglobulina beta-asociada), B29, n.º de registro GenBank NM\_000626);
- 20 (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (dominio SH2 que contiene la proteína de anclaje a fosfatasa 1a), SPAP1B, SPAP1C, n.º de registro GenBank NM\_030764);
- (17) HER2 (n.º de registro GenBank M11730);
- (18) NCA (n.º de registro GenBank M18728);
- (19) MDP (n.º de registro GenBank BC017023);
- 25 (20) IL20R $\alpha$  (n.º de registro GenBank AF184971);
- (21) Brevican (n.º de registro GenBank AF229053);
- (22) Ephb2R (n.º de registro GenBank NM\_004442);
- (23) ASLG659 (n.º de registro GenBank AX092328);
- (24) PSCA (n.º de registro GenBank AJ297436);
- 30 (25) GEDA (n.º de registro GenBank AY260763);
- (26) BAFF-R (n.º de registro GenBank NP\_443177.1);
- (27) CD22 (n.º de registro GenBank NP-001762.1);
- (28) CD79a (CD79A, CD79 $\alpha$ , inmunoglobulina alfa-asociada, una proteína específica de linfocitos B que interactúa covalentemente con la Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie con moléculas de
- 35 Ig M, transduce una señal implicada en la diferenciación de linfocitos B, n.º de registro GenBank NP\_001774.1);
- (29) CXCR5 (receptor 1 del linfoma de Burkitt, un receptor acoplados a la proteína G que se activa mediante la quimioquina CXCL13, actúa en la migración de linfocitos y en la defensa humoral, tiene un papel en la infección por VIH-2 y quizás en el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma, y leucemia, n.º de registro GenBank NP\_001707.1);
- 40 (30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula de clase II de MHC (antígeno Ia) que se une a péptidos y los presenta a linfocitos T CD4+, n.º de registro GenBank NP\_002111.1);
- (31) P2X5 (Receptor purinérgico P2X del canal de iones controlado por ligando 5, un canal de iones controlado por el ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión sináptica y en la neurogénesis, la deficiencia puede contribuir a la patofisiología de la inestabilidad idiopática del detrusor, n.º de registro GenBank
- 45 NP\_002552.2);
- (32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de linfocitos B, Lyb-2, n.º de registro GenBank NP\_001773.1);
- (33) LY64 (Antígeno linfocitario 64 (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repeticiones ricas en leucina (LRR), regula la activación de linfocitos B y la apoptosis, la pérdida de función está asociada con un aumento en la actividad de la enfermedad en pacientes con lupus sistémico eritematoso, n.º de registro GenBank
- 50 NP\_005573.1);
- (34) FCRH1 (proteína 1 análoga al receptor Fc, un receptor posible del dominio Fc de inmunoglobulinas que contiene los dominio de tipo C2 e ITAM análogo a Ig, puede tener un papel en la diferenciación de linfocitos B, n.º de registro GenBank NP\_443170.1); y/o
- 55 (35) IRTA2 (superfamilia del receptor de translocación 2 asociado a inmunoglobulina, un inmunorreceptor posible con teóricos papeles en el desarrollo de linfocitos B y en la linfomagénesis; la desregulación del gen por translocación se produce en algunas neoplasias malignas de linfocitos B, n.º de registro GenBank NP\_112571.1).

En una realización -Ww- es -Val-Cit-.

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

En otro ejemplo más, cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCR<sub>3</sub>.

- 65 En un ejemplo, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno metilo, R<sup>5</sup> es -H, R<sup>7</sup> es sec-butilo, cada

aparición de  $R^8$  es  $-OCH_3$ , y  $R^9$  es  $-H$ .

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

5 En un ejemplo,  $R^{10}$  es arilo.

En un ejemplo particular,  $R^{10}$  es fenilo.

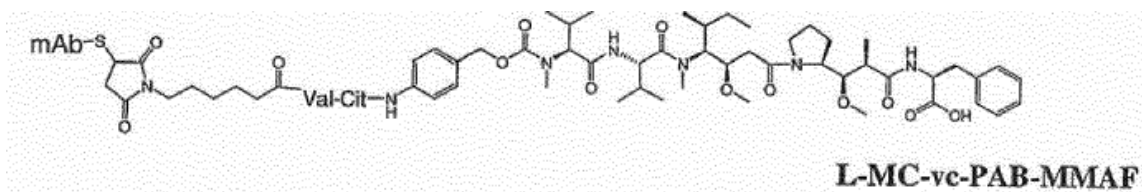
En un ejemplo particular, cuando Z es  $-O-$ ,  $R^{11}$  es  $-H$ , metilo o t-butilo.

10 En un ejemplo, cuando Z es  $-NH$ ,  $R^{11}$  es  $-CH(R^{15})_2$ , en la que  $R^{15}$  es  $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ , y  $R^{16}$  es  $-alquilo C_1-C_8$  o  $-(CH_2)_n-COOH$ .

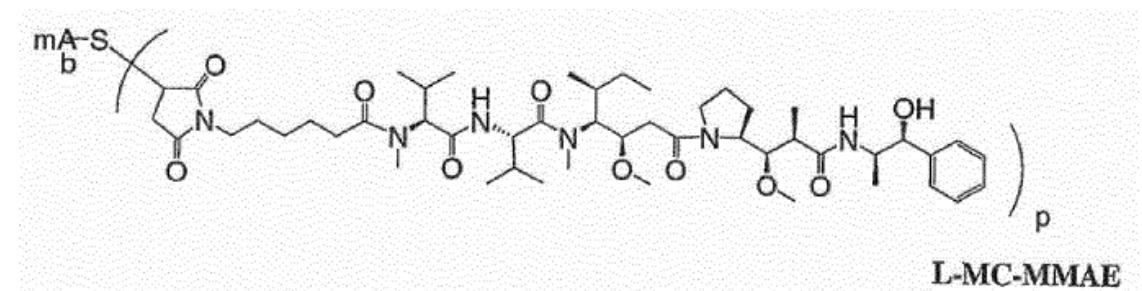
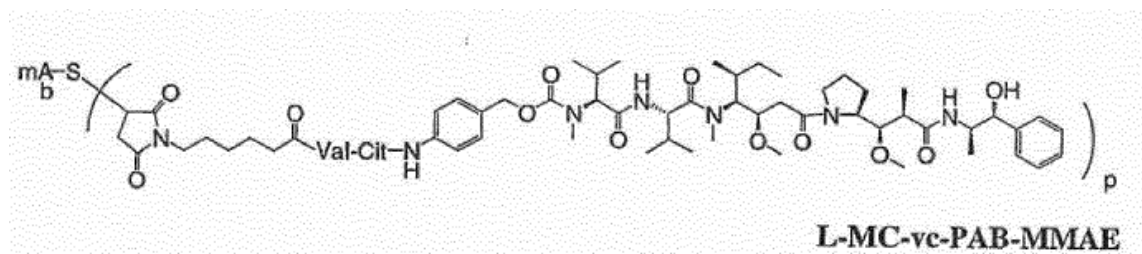
En otro ejemplo, cuando Z es  $-NH$ ,  $R^{11}$  es  $-CH(R^{15})_2$ , en la que  $R^{15}$  es  $-(CH_2)_n-SO_3H$ .

15 Ab puede ser cAC10, cBR96, cS2C6, c1F6, c2F2, hAC10, hBR96, hS2C6, h1F6 e h2F2.

Los conjugados ilustrativos de Fórmula la tienen las siguientes estructuras:

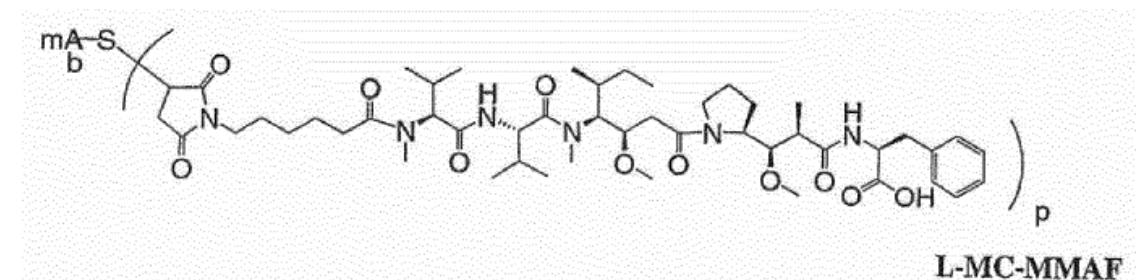


20



25

o



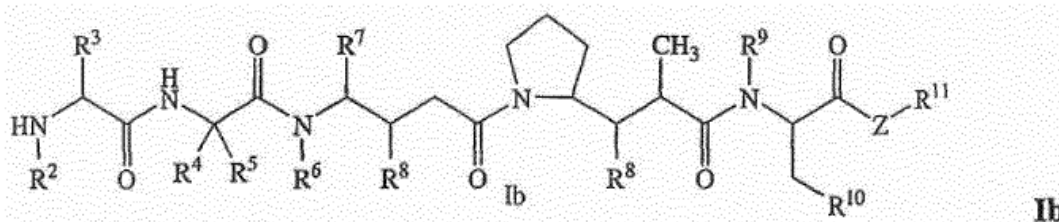
30 cuando L es un anticuerpo, Val es valina, y Cit es citrulina.

La carga del fármaco está representada por p, el número promedio de moléculas de fármacos por anticuerpo en una molécula (por ejemplo, de Fórmula la, la' y lc). La carga del fármaco puede estar comprendida de 1 a 20 fármacos

(D) por Ligando (por ejemplo Ab o mAb). Las composiciones de Fórmula la y Fórmula la' incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con una gama de fármacos, de 1 a 20. El número promedio de fármacos por anticuerpo en preparación de reacciones de conjugación se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayo ELISA y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de los Conjugados Ligando-Fármaco en términos de p. En algunos casos, la separación, purificación, y caracterización de los Conjugados Ligando-Fármaco homogéneos donde p es un valor determinado de Conjugados Ligando-Fármaco con otras cargas de fármaco se puede conseguir por medios tales como HPLC en fase invertida o electroforesis.

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

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



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

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

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

R<sup>4</sup> se selecciona entre hidrógeno, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -arilo, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>l- (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>) en la que R<sup>5</sup> se selecciona entre H y metilo; o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> conjuntamente, tienen la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>- en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6 y forman un anillo con el átomo de carbono al que están unidos;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

n es un número entero comprendido entre 0 y 6.

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

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

En otro ejemplo más, cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCR<sub>3</sub>.

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

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

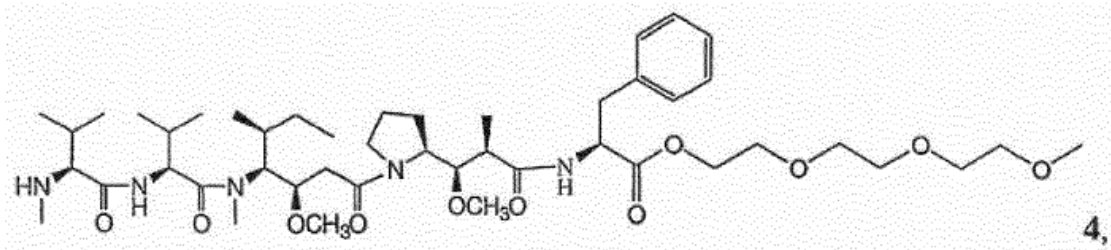
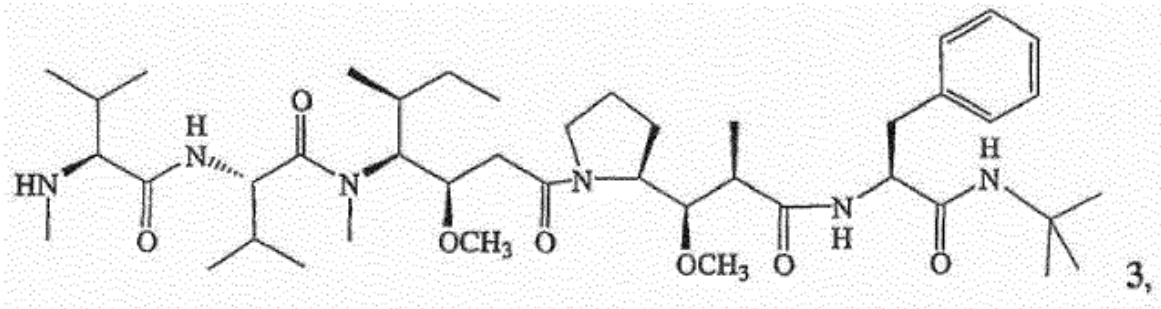
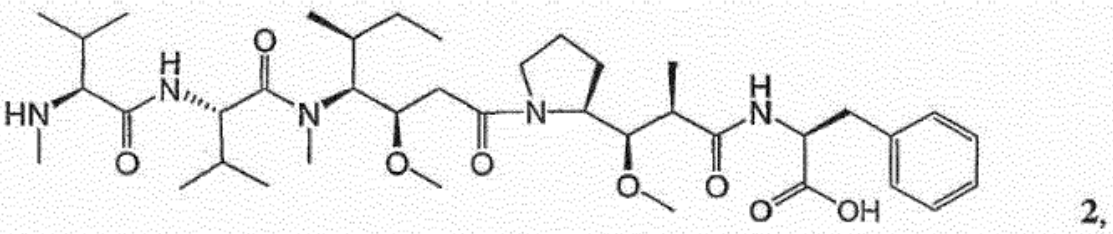
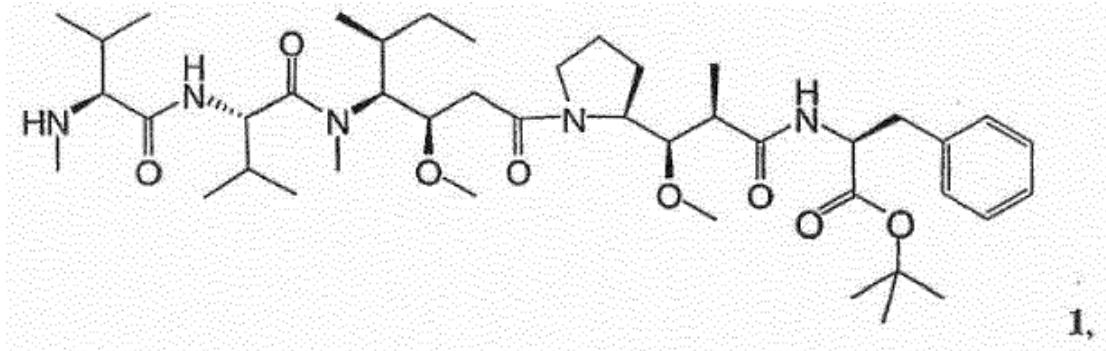
En un ejemplo, R<sup>10</sup> es arilo.

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

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

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

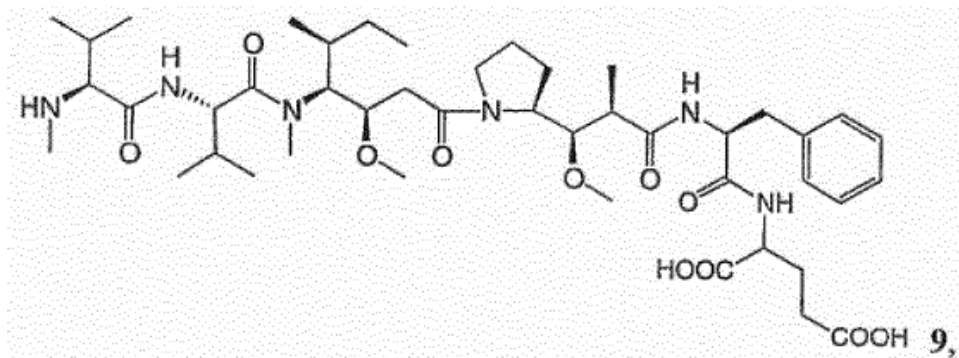
5 En otro ejemplo, cuando Z es -NH, R<sup>11</sup> es -CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>, en la que R<sup>15</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H.  
 10 Los Compuestos ilustrativos de Fórmula (Ib), cada uno de los cuales se puede usar como restos de fármaco (D) en el ADC, incluye compuestos que tienen las siguientes estructuras:



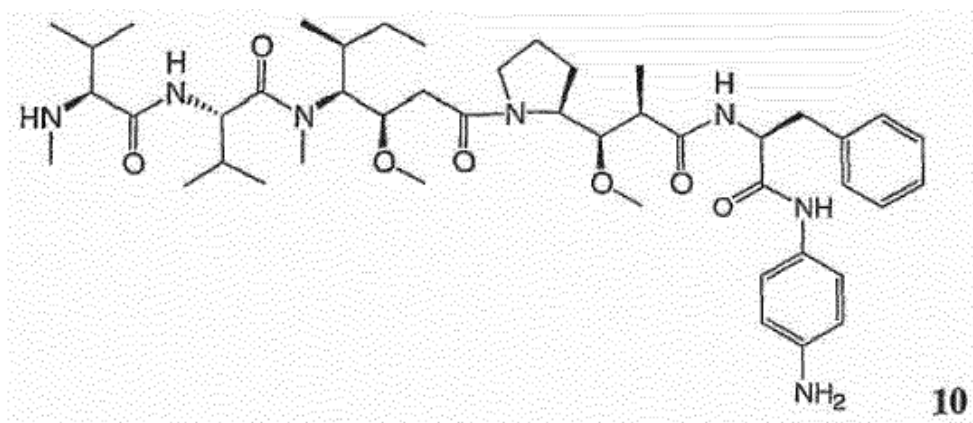
15







y



5

una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

#### LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA (Ic)

10

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

**Ic**

15

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

Se definen compuestos de Fórmula Ic en los que:

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

(1) BMPR1B (receptor de la proteína morfogenética ósea - tipo IB, n.º de registro GenBank NM\_001203);

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, n.º de registro GenBank NM\_003486);

(3) STEAP1 (antígeno epitelial seis transmembrana de la próstata, n.º de registro GenBank NM\_012449);

25 (4) 0772P (CA125, MUC16, n.º de registro GenBank AF361486);

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina, n.º de registro GenBank NM\_005823);

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIb, SLC34A2, familia 34 del transportador de soluto (fosfato de sodio), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente del sodio de tipo II, n.º de registro GenBank NM\_006424);

30 (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de tromboespondina (tipo 1 y análogo al tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto, (semaforina) 5B, n.º de registro GenBank AB040878);

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN ADNc 2700050C12, RIKEN ADNc 2700050C12 gen, n.º de registro GenBank AY358628);

35 (9) ETBR (Receptores de tipo B de la endotelina, n.º de registro GenBank AY275463);

(10) MSG783 (RNF124, proteína teórica FLJ20315, n.º de registro GenBank NM\_017763);

(11) STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial seis transmembrana de la próstata 2, proteína seis transmembrana de la próstata, n.º de registro GenBank AF455138);

- (12) TipM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, receptor potencial transitorio del canal de cationes, subfamilia M, miembro 4, n.º de registro GenBank NM\_017636);  
 (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGP1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, n.º de registro GenBank NP\_003203 o NM\_003212);  
 5 (14) CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus de Epstein-Barr) o Hs.73792 n.º de registro GenBank M26004);  
 (15) CD79b (CD79B, CD79β, Igb (inmunoglobulina beta-asociada), B29, n.º de registro GenBank NM\_000626);  
 (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (dominio SH2 que contiene la proteína de anclaje a fosfatasa 1a), SPAP1B, SPAP1C, n.º de registro GenBank NM\_030764);  
 10 (17) HER2 (n.º de registro GenBank M11730);  
 (18) NCA (n.º de registro GenBank M18728);  
 (19) MDP (n.º de registro GenBank BC017023);  
 (20) IL20Rα (n.º de registro GenBank AF184971);  
 (21) Brevican (n.º de registro GenBank AF229053);  
 15 (22) Ephb2R (n.º de registro GenBank NM\_004442);  
 (23) ASLG659 (n.º de registro GenBank AX092328);  
 (24) PSCA (n.º de registro GenBank AJ297436);  
 (25) GEDA (n.º de registro GenBank AY260763);  
 (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, BLyS receptor 3, BR3, NP\_443177.1);  
 20 (27) CD22 (isoforma CD22-B del receptor de linfocitos B, NP-001762.1);  
 (28) CD79a (CD79A, CD79α, inmunoglobulina alfa-asociada, una proteína específica de linfocitos B que interactúa covalentemente con la Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie con moléculas de Ig M, transduce una señal implicada en la diferenciación de linfocitos B, n.º de registro GenBank NP\_001774.1);  
 (29) CXCR5 (receptor 1 del linfoma de Burkitt, un receptor acoplados a la proteína G que se activa mediante la quimioquina CXCL13, actúa en la migración de linfocitos y en la defensa humoral, tiene un papel en la infección por VIH-2 y quizás en el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma, y leucemia, n.º de registro GenBank NP\_001707.1);  
 25 (30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula de clase II de MHC (antígeno Ia) que se une a péptidos y los presenta a linfocitos T CD4+, n.º de registro GenBank NP\_002111.1);  
 (31) P2X5 (Receptor purinérgico P2X del canal de iones controlado por ligando 5, un canal de iones controlado por el ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión sináptica y en la neurogénesis, la deficiencia puede contribuir a la patofisiología de la inestabilidad idiopática del detrusor, n.º de registro GenBank NP\_002552.2);  
 30 (32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de linfocitos B, Lyb-2, n.º de registro GenBank NP\_001773.1);  
 (33) LY64 (Antígeno linfocitario 64 (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repeticiones ricas en leucina (LRR), regula la activación de linfocitos B y la apoptosis, la pérdida de función está asociada con un aumento en la actividad de la enfermedad en pacientes con lupus sistémico eritematoso, n.º de registro GenBank NP\_005573.1);  
 35 (34) FCRH1 (proteína 1 análoga al receptor Fc, un receptor posible del dominio Fc de inmunoglobulinas que contiene los dominio de tipo C2 e ITAM análogo a Ig, puede tener un papel en la diferenciación de linfocitos B, n.º de registro GenBank NP\_443170.1); y  
 (35) IRTA2 (superfamilia del receptor de translocación 2 asociado a inmunoglobulina, un inmunorreceptor posible con teóricos papeles en el desarrollo de linfocitos B y en la linfomagénesis; la desregulación del gen por translocación se produce en algunas neoplasias malignas de linfocitos B, n.º de registro GenBank NP\_112571.1).

A es una unidad ensanchadora,

a es 0 o 1,

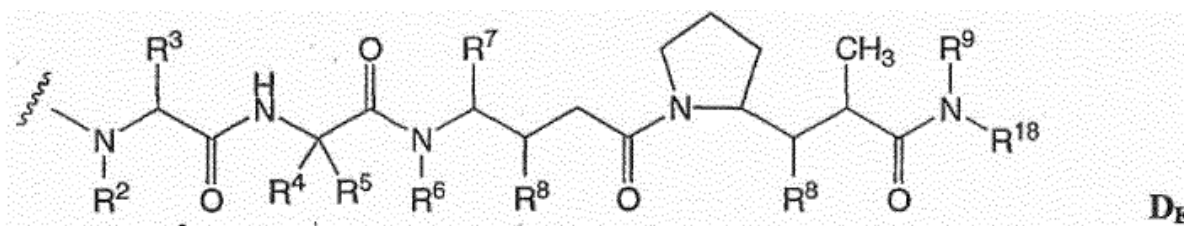
cada W es independientemente una unidad de aminoácido,

50 w es un número entero comprendido entre 0 y 12,

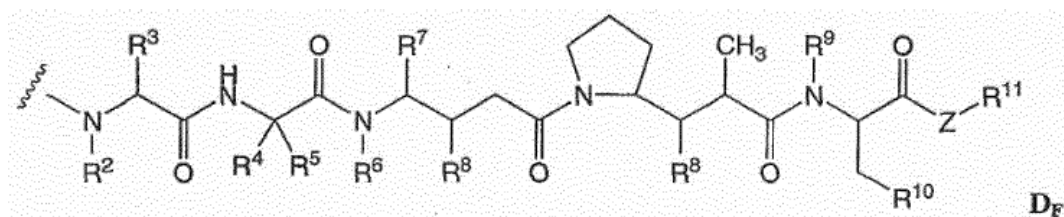
Y es una Unidad separadora, e y es 0, 1 o 2,

p está comprendido de 1 a aproximadamente 8, y

D es un Resto de fármaco seleccionado entre las Fórmulas D<sub>E</sub> y D<sub>F</sub>:



55



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

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

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

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

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

- 40 En otro ejemplo más, cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCR<sub>3</sub>.

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

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

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

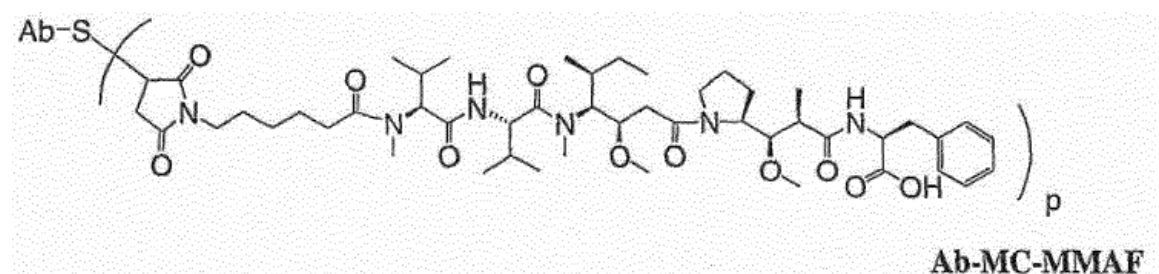
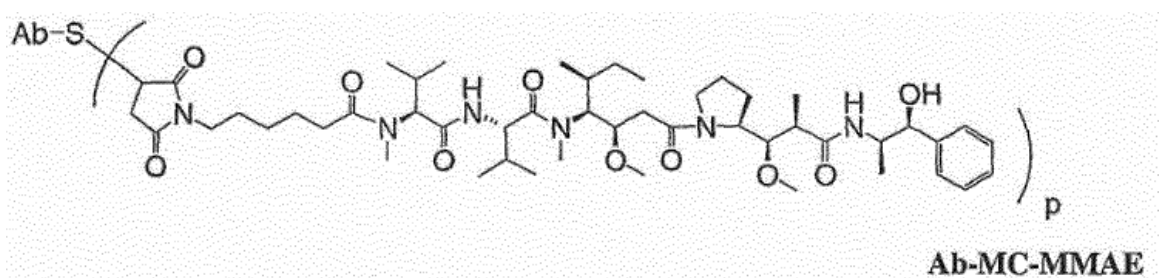
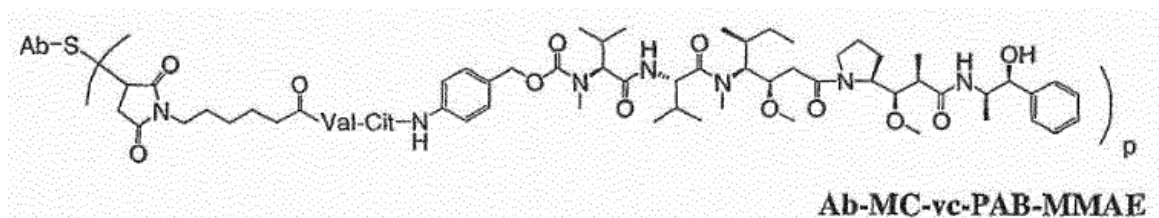
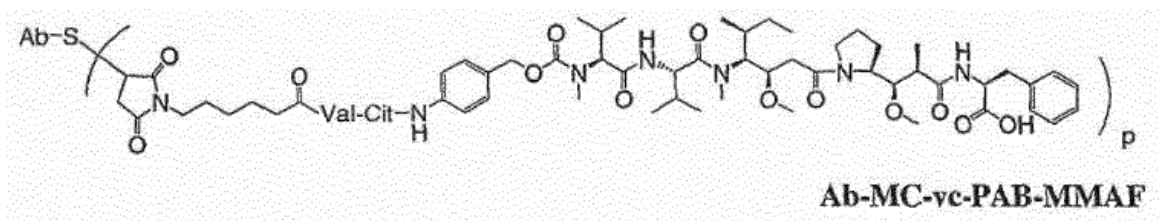
En un ejemplo particular, R<sup>10</sup> es fenilo.

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

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

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

Los conjugados ilustrativos de Fórmula la ADC tienen las siguientes estructuras:



5

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

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

20 Para algunos conjugados de fármaco-anticuerpo, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión se realiza en un tiol de la cisteína, como en las realizaciones ilustrativas anteriores, un anticuerpo puede tener solo uno o algunos grupos tiol de la cisteína, o puede tener solo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales se puede unir un enlazador.

30 Normalmente, se conjugan menos que el máximo teórico de restos de fármaco con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, muchos restos lisina que no reaccionan con el intermedio fármaco-enlazador o el reactivo enlazador. Solo los grupos lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador que reacciona con aminas. En general, los anticuerpos no contienen muchos, en su caso, grupos tioles de cisteína libres y reactivos que se puedan unir al resto de fármaco. La mayoría de restos tiol de la cisteína en los anticuerpos de los compuestos de la invención se encuentran como puentes disulfuro y deben reducirse con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT). Adicionalmente, el anticuerpo debe someterse a condiciones de desnaturación para revelar grupos nucleófilos reactivos tales como lisina o cisteína. La carga (relación

fármaco/anticuerpo) de un ADC puede controlarse de varias maneras diferentes, incluyendo: (i) limitar el exceso molar del intermedio fármaco-enlazador o reactivo enlazador con respecto al anticuerpo, (ii) limitar el tiempo de la reacción de conjugación o la temperatura, y (iii) limitar de forma parcial o limitar las condiciones reductoras para la modificación del tiol de la cisteína.

5 Se deberá entender que cuando más de un grupo nucleófilo reacciona con un intermedio de fármaco-enlazador, o reactivo enlazador seguido por el reactivo del resto de fármaco, a continuación el producto resultante es una mezcla de compuestos ADC con una distribución de uno o más restos de fármaco unidos a un anticuerpo. El número promedio de fármacos por anticuerpo se puede calcular a partir de la mezcla mediante un ensayo de anticuerpos  
 10 ELISA doble, específico para anticuerpos y específico para el fármaco. Las moléculas ADC individuales pueden identificarse en la mezcla mediante espectroscopía de masas, y separarse mediante HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrófoba ("Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", Hamblett, K.J., et al, Resumen N.º 624, American Association for Cancer Research; Reunión Anual de 2004, 27-31 de marzo de 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, marzo de  
 15 2004; "Controlling the Location of Drug Attachment in Antibody-Drug Conjugates", Alley, S.C., et al, Resumen N.º 627, American Association for Cancer Research; Reunión Anual de 2004, 27-31 de marzo de 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, marzo de 2004). Por tanto, se puede aislar un ADC homogéneo con un único valor de carga de la mezcla de conjugación mediante electroforesis o cromatografía.

#### 20 4.3 LA UNIDAD ENLAZADORA

Una "Unidad enlazadora" (LU) es un compuesto bifuncional que se puede usar para unir una Unidad de fármaco y una Unidad de ligando para formar Conjugados de fármaco-enlazador-ligando, o que es útil en la formación de  
 25 inmunconjugados dirigidos contra antígenos asociados a tumores. Dichos inmunconjugados permiten la administración selectiva de fármacos tóxicos a las células tumorales.

En algunos ejemplos, la Unidad enlazadora del Compuesto fármaco-enlazador y el Conjugado de fármaco-enlazador-ligando tiene la fórmula:

30  $-A_a-W_w-Y_y-$

en la que:

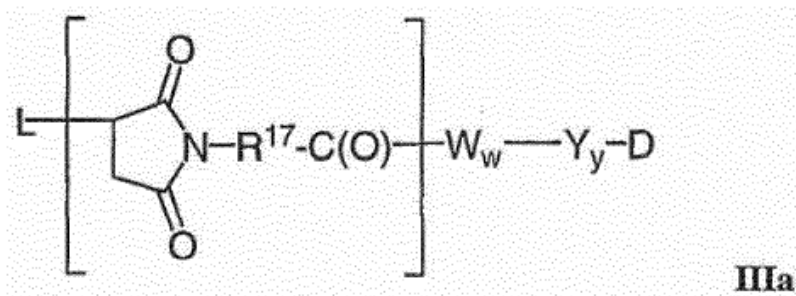
-A- es una Unidad ensanchadora;  
 35 a es 0 o 1;  
 cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido;  
 w es un número entero comprendido entre 0 y 12;  
 -Y- es una Unidad separadora; y  
 y es 0, 1 o 2.

40 En el Conjugado de fármaco-enlazador-ligando, el Enlazador puede unir el Resto de fármaco y la Unidad de ligando.

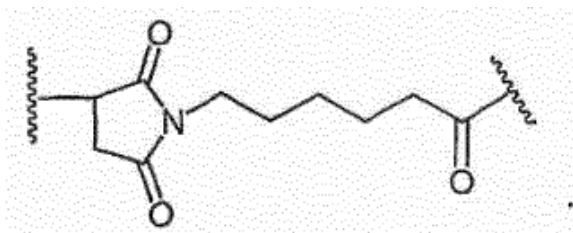
##### **4.3.1 LA UNIDAD ENSANCHADORA**

45 La unidad ensanchadora (-A-), cuando está presente, puede unir una Unidad de ligando con una unidad un aminoácido (-W-). A este respecto, una Unidad de ligando (L) tiene un grupo funcional que puede formar un enlace con un grupo funcional de una Ensanchadora. Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un ligando, tanto naturalmente como mediante manipulación química incluyen, aunque no de forma limitativa, sulfhidrilo (-SH), amino, hidroxilo, carboxi, el grupo hidroxilo anómero e de un hidrato de carbono, y carboxilo. Los grupos  
 50 funcionales del ligando pueden ser sulfhidrilo y amino. Se pueden generar grupos sulfhidrilo mediante reducción de un enlace disulfuro intramolecular de un ligando. Como alternativa, se pueden generar grupos sulfhidrilo mediante la reacción de un grupo amino de un resto de lisina de un ligando utilizando 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otro reactivo generador de sulfhidrilos.

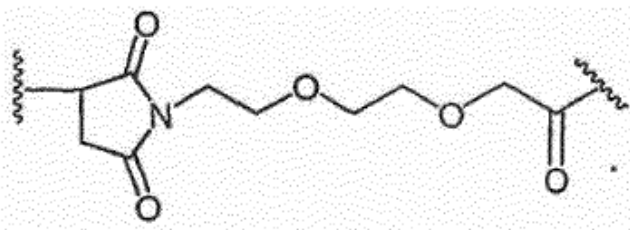
55 La Unidad ensanchadora puede formar un enlace con un átomo de azufre de la Unidad de ligando. Se puede derivar el átomo de azufre de un grupo sulfhidrilo de un ligando. Las Unidades ensanchadoras representativas de esta realización se representan gráficamente en los corchetes de las fórmulas **IIIa** y **IIIb**, en las que L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se ha definido anteriormente, y R<sup>17</sup> se selecciona de alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arileno-, alquileo-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-arileno-, -arileno-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquileo-, -alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-, y -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-; y r es un entero comprendido de 1-10. Debe entenderse a partir de todas  
 60 los conjugados ilustrativos de Fórmula **Ia**, tales como **III-VI**, que incluso no se han denotado de forma expresa, que de 1 a 20 restos de fármacos se unen a una unidad de ligando (p = 1-20).



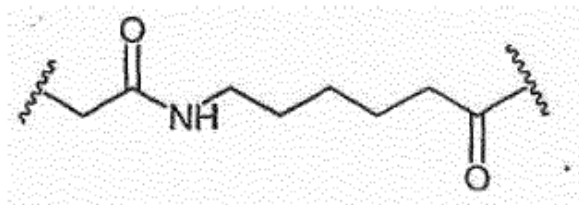
5 Una unidad ensanchadora ilustrativa es la de la Fórmula **IIIa** en la que  $R^{17}$  es  $-(CH_2)_5-$ :



10 Otra unidad ensanchadora ilustrativa es la de la Fórmula **IIIa** en la que  $R^{17}$  es  $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ ; y r es 2:



Otra unidad ensanchadora adicional en la de la Fórmula **IIIb** en la que  $R^{17}$  es  $-(CH_2)_5-$ :

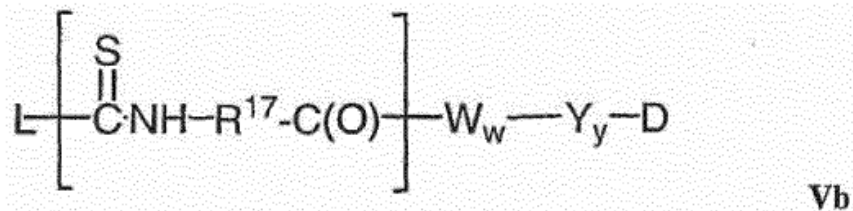
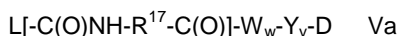


15 En otro ejemplo, La unidad ensanchadora está unida al ligando mediante un enlace disulfuro entre un átomo de azufre de la unidad de ligando y un átomo de azufre de la unidad ensanchadora. Una unidad ensanchadora representativa de esta realización se representa entre los corchetes de la Fórmula IV, en la que  $R^{17}$ , L-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal como se ha definido anteriormente.

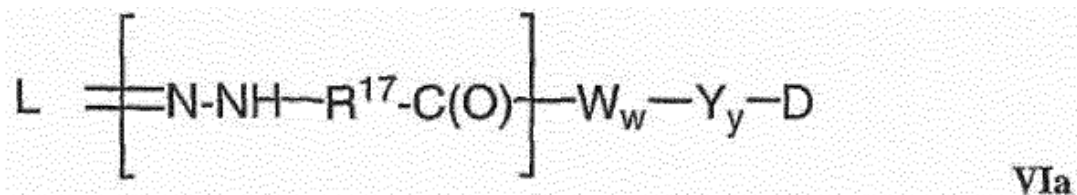


25 En otro ejemplo más, el grupo reactivo de la unidad ensanchadora contiene un sitio reactivo que puede formar un enlace con un grupo amino primario o secundario de un ligando. Los ejemplos de estos sitios reactivos incluyen, aunque no de forma limitativa, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros ácidos, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Las Unidades ensanchadoras representativas se representan gráficamente entre los corchetes de las fórmulas **Va** y **Vb**, en la que  $-R^{17}$ -, L-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal como se ha definido anteriormente;

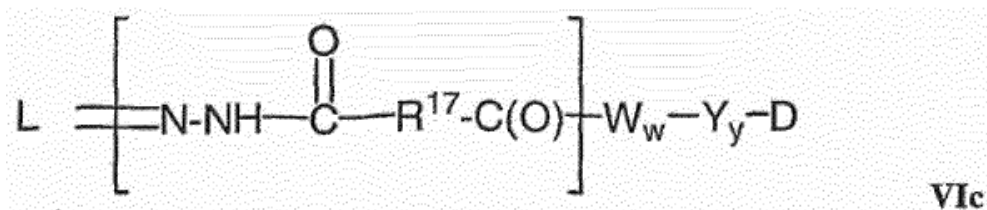
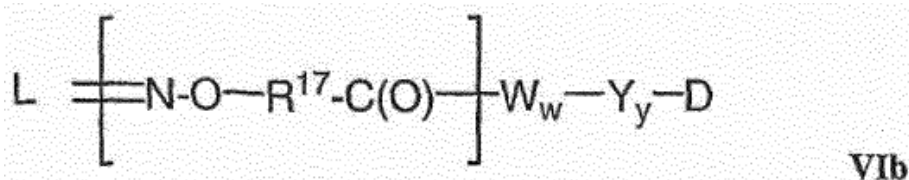
30



- 5 El grupo reactivo de la Unidad ensanchadora puede contener un sitio reactivo que es reactivo con un grupo de hidratos de carbono modificado (-CHO) que puede estar presente en un ligando. Por ejemplo, un hidrato de carbono se puede oxidar suavemente utilizando un reactivo como peryodato de sodio y la unidad (-CHO) resultante del hidrato de carbono oxidado se puede condensar con una unidad ensanchadora de forma que contenga una funcionalidad como una hidrazida, una oxima, una amina primaria o secundaria, una hidrazina, una tiosemicarbazona, un carboxilato de hidrazina, y una arilhidrazida tal como las descritas por Kaneko, T. et al. (1991) Bioconjugate Chem 2:133-41. Las Unidades ensanchadoras representativas se representan gráficamente entre los corchetes de las fórmulas **VIa**, **VIb**, y **VIc**, en la que -R<sup>17</sup>-, L-, -W<sub>w</sub>-, -Y<sub>y</sub>-, -D, w e y son tal como se ha definido anteriormente.



15



20

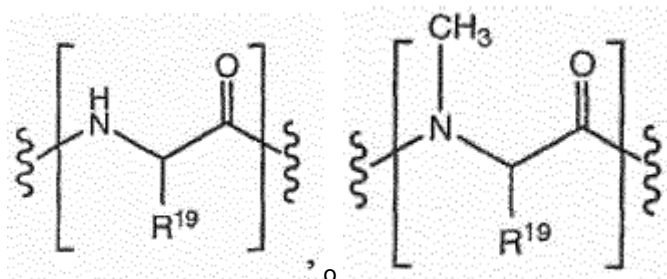
#### 4.3.2 LA UNIDAD DE AMINOÁCIDO

- La unidad de aminoácido (-W-), cuando está presente, une la Unidad ensanchadora con la Unidad separadora si la Unidad separadora está presente, enlaza la Unidad ensanchadora con el Resto del fármaco si está ausente la Unidad separadora, y enlaza la Unidad del ligando con la Unidad del fármaco si están ausentes las Unidades ensanchadora y separadora.

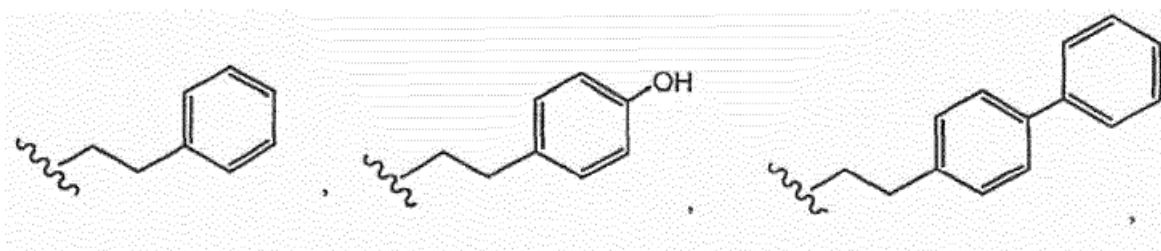
- W<sub>w</sub>- es un dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido. Cada unidad -W- independientemente tiene la fórmula denotada a continuación en los corchetes, y w es un número entero comprendido entre 0 y 12:

30

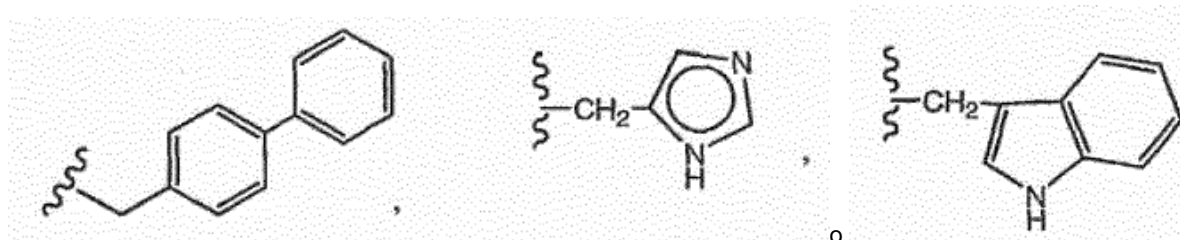
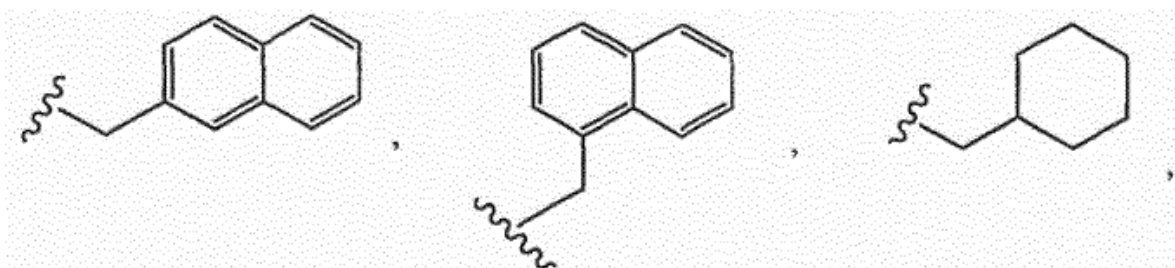




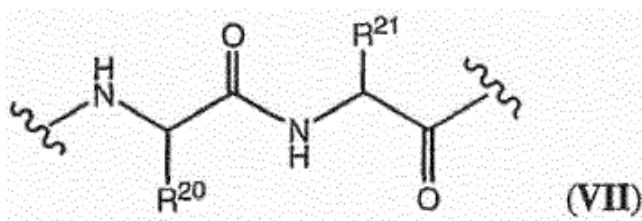
- 5 en la que R<sup>19</sup> es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, *p*-hidroxibencilo, -CH<sub>2</sub>OH, -CH(OH)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>COOH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(-NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 2-piridilmetilo-, 3-piridilmetilo-, 4-piridilmetilo-, fenilo, ciclohexilo,



10



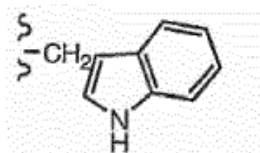
- 15 La Unidad de aminoácido se puede escindir enzimáticamente mediante una o más enzimas, incluida una proteasa asociada a tumor, para liberar la Unidad de fármaco (-D), que en una realización se protona *in vivo* tras la liberación para proporcionar un fármaco (D). Las unidades W<sub>w</sub> ilustrativas se representan mediante las fórmulas (VII)-(IX):



20

en las que R<sup>20</sup> y R<sup>21</sup> son los siguientes:

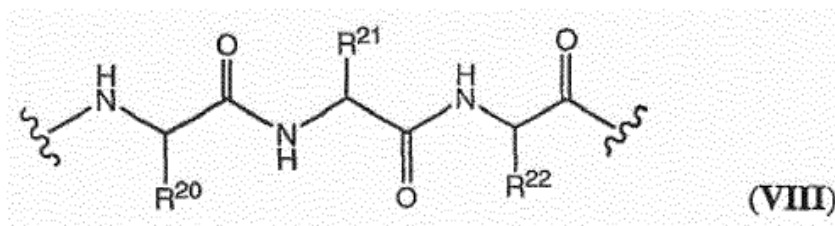
R <sup>20</sup>	R <sup>21</sup>
bencilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;
metilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;
isopropilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;
isopropilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;
bencilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;
isobutilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;
sec-butilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;



bencilo  
bencilo

(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>;

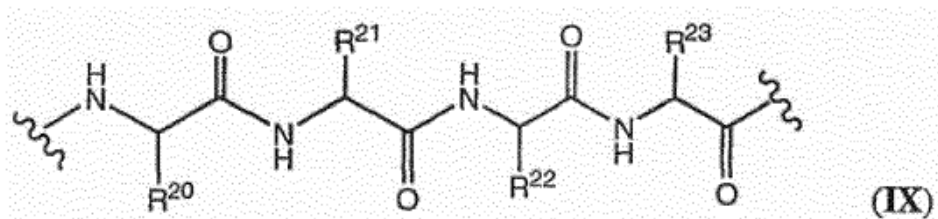
metilo; y  
(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>;



(VIII)

5 en la que R<sup>20</sup>, R<sup>21</sup> y R<sup>22</sup> son los siguientes:

R <sup>20</sup>	R <sup>21</sup>	R <sup>22</sup>
bencilo	bencilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;
isopropilo	bencilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ; y
H	bencilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;



(IX)

10 en la que R<sup>20</sup>, R<sup>21</sup>, R<sup>22</sup> y R<sup>23</sup> son los siguientes:

R <sup>20</sup>	R <sup>21</sup>	R <sup>22</sup>	R <sup>23</sup>
H	bencilo	isobutilo	H; y
metilo	isobutilo	metilo	isobutilo.

Las unidades de aminoácido ilustrativas incluyen, aunque no de forma limitativa, unidades de fórmula (VII) donde:  
 15 R<sup>20</sup> es bencilo y R<sup>21</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>; R<sup>20</sup> es isopropilo y R<sup>21</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>; R<sup>20</sup> es isopropilo y R<sup>21</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>. Otra Unidad de aminoácido ilustrativa es una unidad de fórmula (VIII) en la que R<sup>20</sup> es bencilo, R<sup>21</sup> es bencilo, y R<sup>22</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>.

Las unidades -W<sub>w</sub>- útiles se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para la escisión enzimática mediante  
 20 enzimas concretas, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor. En un ejemplo, una unidad -W<sub>w</sub>- es aquella cuya escisión está catalizada por la catepsina B, C y D, o una proteasa de plasmina.

En un ejemplo, -W<sub>w</sub>- es un dipéptido, tripéptido, tetrapéptido o pentapéptido.

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

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

En un ejemplo de la Unidad de aminoácido, la Unidad de aminoácido es valina-citrulina. En otro aspecto, la Unidad de aminoácido es fenilalanina-lisina (es decir, fk). En otro ejemplo adicional de la Unidad de aminoácido, la Unidad de aminoácido es N-metilvalina-citrulina. En otro aspecto más, la Unidad de aminoácido es ácido 5-aminovalérico, homofenilalanina-lisina, tetraisoquinolinecarboxilato-lisina, ciclohexilalanina-lisina, ácido isonepecótico-lisina, beta-alanina lisina, glicina serina valina glutamina y ácido isonepecótico.

En determinados casos, la Unidad de aminoácido puede comprender aminoácidos naturales. En otros casos, la Unidad de aminoácido puede comprender aminoácidos no naturales.

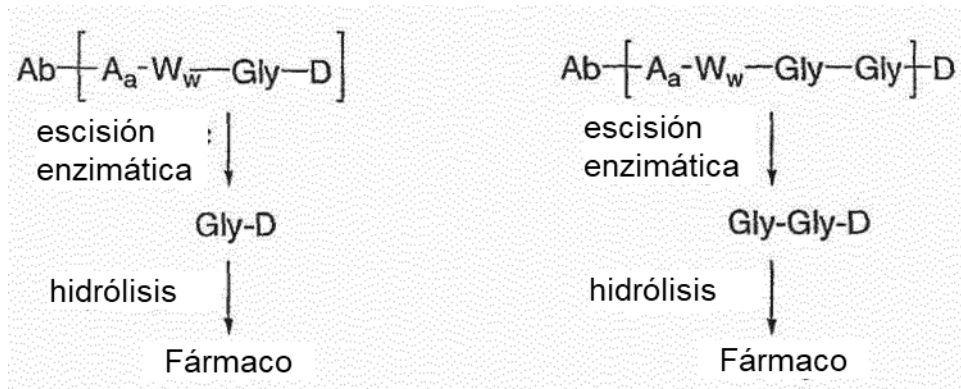
#### 4.3.3 LA UNIDAD SEPARADORA

La Unidad separadora (-Y-), cuando está presente, une una unidad de Aminoácido con el Resto de fármaco cuando está presente una Unidad de aminoácido. Como alternativa, la Unidad separadora une la Unidad ensanchadora con el Resto de fármaco cuando la Unidad de aminoácido está ausente. La Unidad separadora también une el Resto de fármaco con la Unidad de ligando cuando están ausentes tanto la Unidad de aminoácido como la Unidad ensanchadora.

Las unidades separadoras son de dos tipos generales: autoinmolables y no autoinmolables. Una Unidad separadora no autoinmolable es una en la que todo o parte de la Unidad separadora permanece unida al Resto de fármaco tras la escisión, especialmente enzimática, de una Unidad de aminoácido desde el Conjugado de fármaco-enlazador-ligando o el Compuesto fármaco-enlazador. Los ejemplos de una Unidad separadora no autoinmolable incluyen, aunque no de forma limitativa, una Unidad separadora (glicina-glicina) y una Unidad separadora de glicina (ambas representadas gráficamente en el Esquema 1) (*infra*). Cuando un Compuesto ilustrativo que contiene una Unidad separadora de glicina-glicina o una Unidad separadora de glicina experimenta escisión enzimática mediante una proteasa asociada a una célula tumoral, una proteasa asociada a una célula cancerosa o una proteasa asociada a un linfocito, un glicina-glicina-Resto de fármaco o un glicina-Resto de fármaco se escinden de  $L-A_a-W_w$ . En una realización, tiene lugar una reacción de hidrólisis independiente dentro de la célula diana, escindiendo el glicina-Resto de fármaco unido y liberando el Fármaco,

En otro ejemplo, -Y- es una unidad de un alcohol p-aminobencilo (PAB) (véanse los Esquemas 2 y 3) cuya porción de fenileno se ha sustituido con  $Q_m$  en la que Q es alquilo  $-C_1-C_8$ ,  $-O$ -(alquilo  $C_1-C_8$ ), halógeno, nitro o ciano; y m es un número entero que varía entre 0-4.

Esquema 1



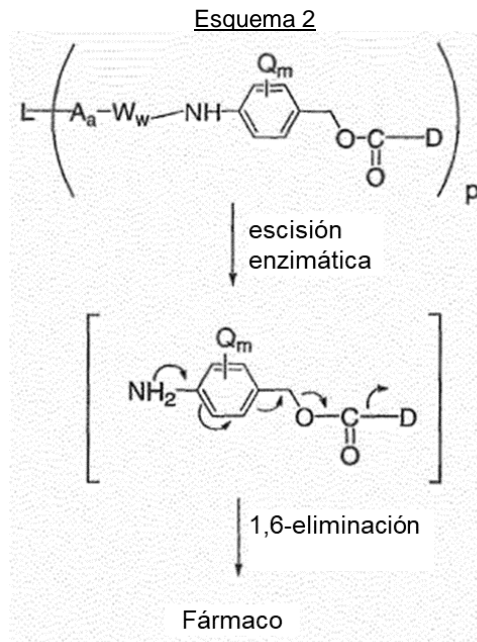
En un ejemplo, una Unidad separadora no autoinmolable (-Y-) es -Gly-Gly-. En otro ejemplo, una Unidad separadora no autoinmolable (-Y-) es -Gly-.

En un ejemplo, un Compuesto fármaco-enlazador o un Conjugado de fármaco-enlazador-ligando se proporciona en el que la Unidad separadora está ausente ( $y=0$ ), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Como alternativa, un Compuesto ilustrativo que contiene una Unidad separadora autoinmolable puede liberar -D sin necesidad de una etapa de hidrólisis independiente. En esta realización, -Y- es un grupo PAB que está unido a  $-W_w$  mediante el átomo de nitrógeno del amino del grupo PAB, y conectado directamente a -D mediante un carbonato, carbamato o éter. Sin pretender quedar vinculado a teoría o mecanismo alguno, el Esquema 2 representa

gráficamente un posible mecanismo para la liberación del Fármaco desde un grupo PAB que está unido directamente a -D mediante un grupo carbamato o carbonato, según establecieron Toki et al. (2002) *J Org. Chem.* 67:1866-1872.

5

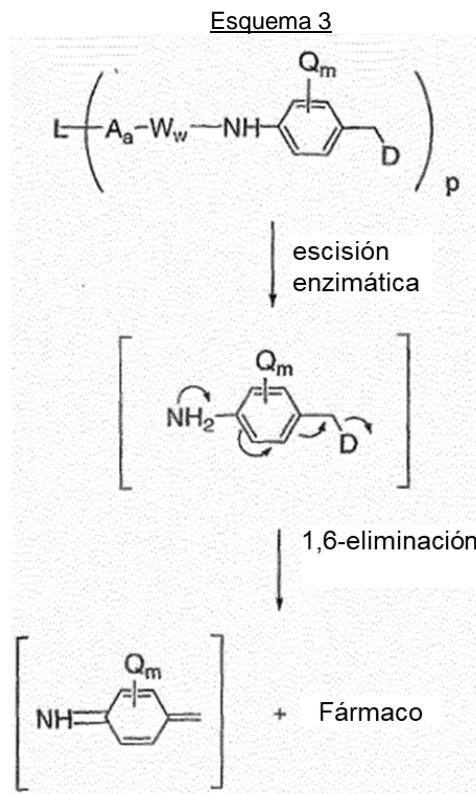


en la que Q es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero comprendido de 0-4; y p está comprendido de 1 a aproximadamente 20.

10

Sin pretender quedar vinculado a teoría o mecanismo alguno, el Esquema 3 representa gráficamente un posible mecanismo para la liberación del Fármaco desde un grupo PAB que está unido directamente a -D mediante un enlace éter o amina.

15

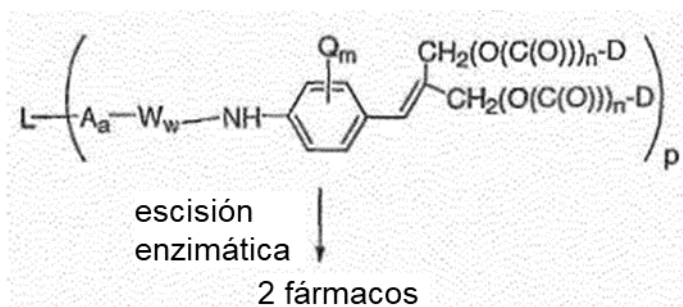


en la que Q es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), halógeno, nitro o ciano; m es un número entero comprendido de 0-4; y p está comprendido de 1 a aproximadamente 20.

5 Otros ejemplos de separadores autoinmolables incluyen, aunque no de forma limitativa, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB, tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) y orto o para-aminobencilacetales. Pueden usarse separadores que experimentan ciclación tras la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2, 223), sistemas de anillos biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] adecuadamente sustituidos (Storm, et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972,94,5815) y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990,55,5867). La eliminación de fármacos que contienen amina que están sustituidos en la posición a de la glicina (Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447) son también ejemplos de un separador autoinmolable de utilidad en los Compuestos ilustrativos.

15 En un ejemplo, la unidad separadora es una unidad de bis(hidroximetil)estireno ramificada (BHMS) ecomo se representa en el Esquema 4, que se puede usar para incorporar y liberar múltiples fármacos.

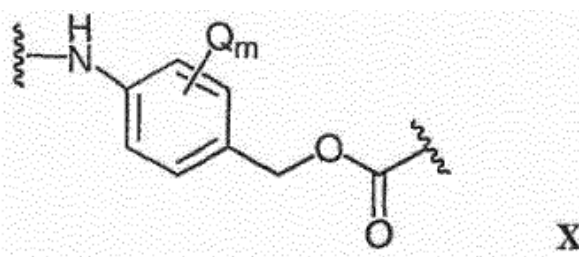
Esquema 4



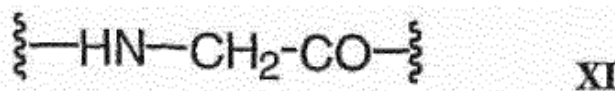
20 en la que Q es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero comprendido de 0-4; n es 0 o 1; y p varía entre 1 y a aproximadamente 20.

25 En un ejemplo los restos D son iguales. En otra realización más, los restos D son diferentes.

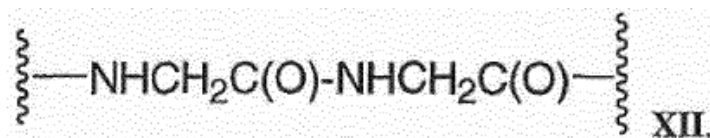
En un ejemplo, las Unidades separadoras (-Y<sub>y</sub>-) están representadas por las Fórmulas (X)-(XII):



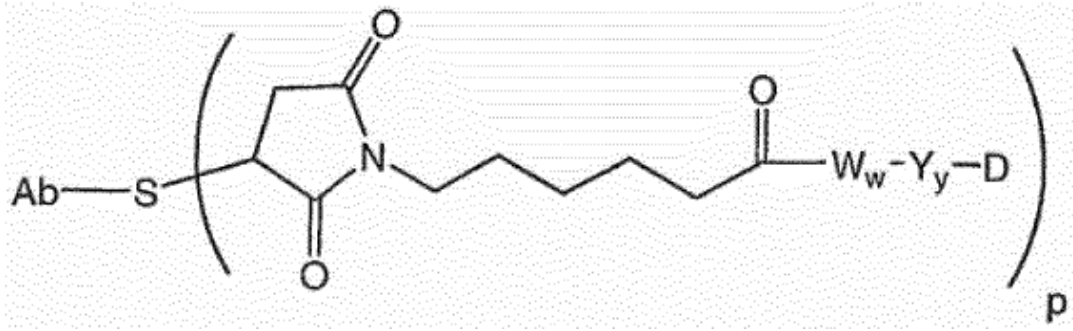
30 en la que Q es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero comprendido de 0-4;



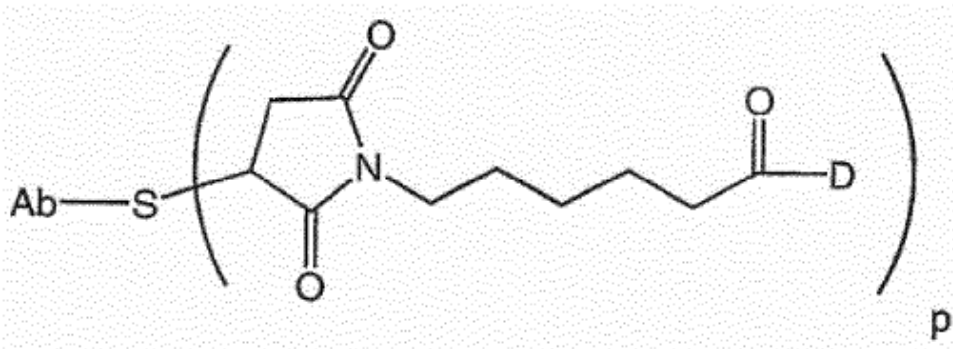
35 y



40 los ejemplos de compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco de Fórmula Ia' y Ic incluyen:

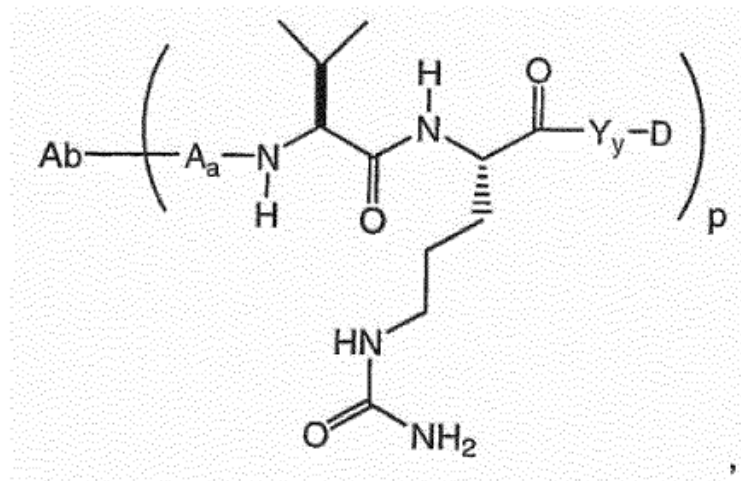


y,

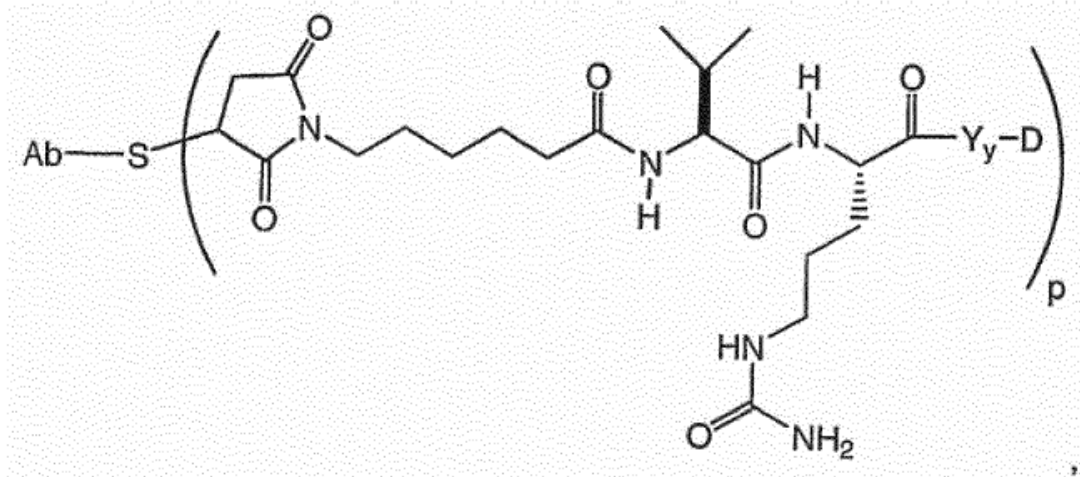


5

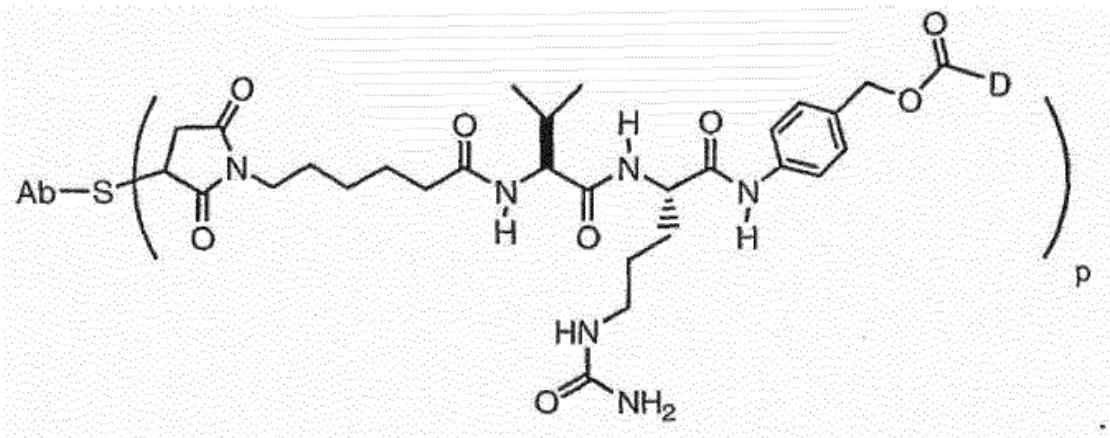
en la que cada uno de w e y son 0,



10



y



5

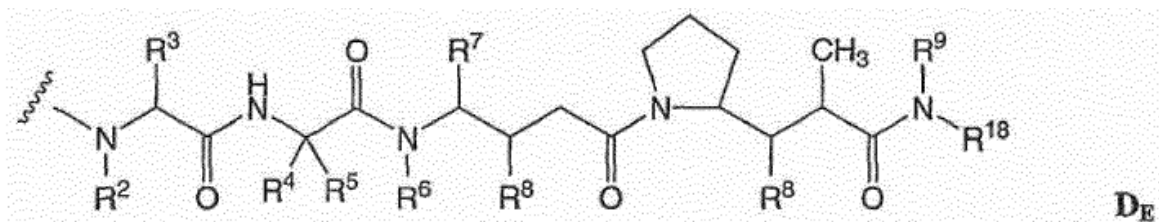
**4.4 -LA UNIDAD DE FÁRMACO (RESTO)**

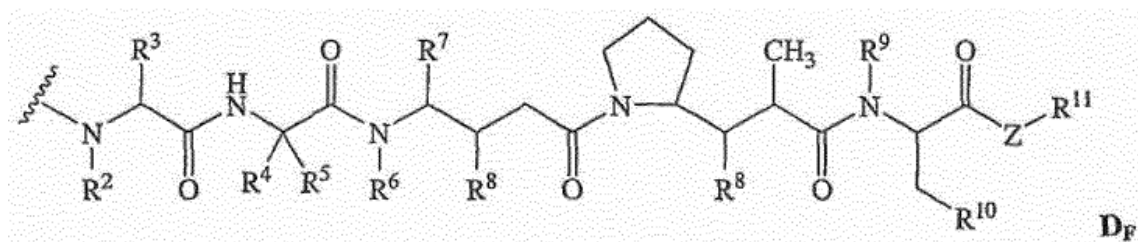
10 El resto de fármaco (D) de los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) son del tipo auristatina/dolastatina (patentes de Estados Unidos con números 5635483; 5780588) que han mostrado interferir con la dinámica de microtúbulos, hidrólisis de GTP, y la división nuclear y celular (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad antineoplásica (patente de Estados Unidos n.º 5663149) y antifúngica (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965).

15 D es una Unidad de fármaco (resto) que tiene un átomo que puede formar un enlace con la Unidad separadora cuando  $y = 1$  o  $2$ , con el grupo carboxilo del extremo C de un aminoácido cuando  $y = 0$ , con el grupo carboxilo de una Unidad ensanchadora cuando  $w$  e  $y = 0$ , y con el grupo carboxilo de una Unidad de fármaco cuando  $a$ ,  $w$ , e  $y = 0$ . Debe entenderse que las expresiones "unidad de fármaco" y "resto de fármaco" son sinónimas y se usan de forma indistinta en el presente documento.

20

En un ejemplo, -D es cualquier fórmula  $D_E$  o  $D_F$ :





en la que, independientemente en cada localización:

- 5  $R^2$  se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 $R^3$  se selecciona de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);  
 $R^4$  se selecciona de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);  
10  $R^5$  se selecciona entre H y metilo;  
o  $R^4$  y  $R^5$  forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula  $-(CR^aR^b)_n-$  en la que  $R^a$  y  $R^b$  se seleccionan de forma independiente entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6;  
 $R^6$  se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
15  $R^7$  se selecciona de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);  
cada  $R^8$  se selecciona independientemente entre H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);  
 $R^9$  se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 $R^{10}$  se selecciona entre arilo o heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>;  
20 Z es O, S, NH, o NR<sup>12</sup>, en la que R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
 $R^{11}$  se selecciona de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, arilo, heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>,  $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ , o  $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ ;  
m es un número entero comprendido de 1-1000;  
 $R^{13}$  es alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>;  
 $R^{14}$  es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
25 cada aparición de  $R^{15}$  es independientemente H, COOH,  $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ ,  $-(CH_2)_n-SO_3H$ , o  $-(CH_2)_n-SO_3$ -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
cada aparición de  $R^{16}$  es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, o  $-(CH_2)_n-COOH$ ;  
 $R^{18}$  se selecciona entre  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -arilo,  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), y  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); y  
30 n es un número entero comprendido entre 0 y 6.

En un ejemplo,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^7$  son, de forma independiente, isopropilo o sec-butilo y  $R^5$  es -H. En un ejemplo particular,  $R^3$  y  $R^4$  son cada uno isopropilo,  $R^5$  es H, y  $R^7$  es sec-butilo.

- 35 En otro ejemplo,  $R^2$  y  $R^6$  son cada uno metilo, y  $R^9$  es H.

En otro ejemplo más, cada aparición de  $R^8$  es -OCR<sub>3</sub>.

- 40 En un ejemplo particular,  $R^3$  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 -OCH<sub>3</sub>, y  $R^9$  es H.

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

- 45 En un ejemplo,  $R^{10}$  es arilo.

En un ejemplo particular,  $R^{10}$  es fenilo.

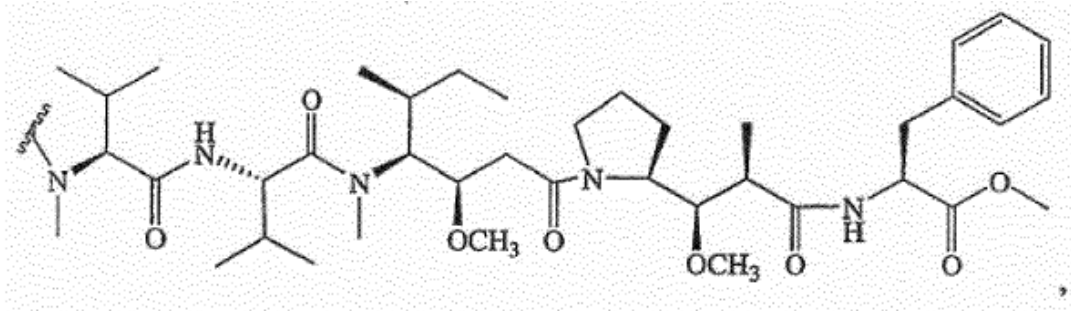
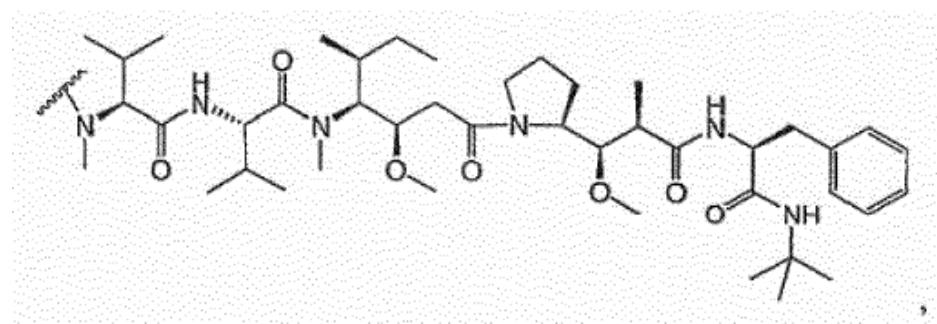
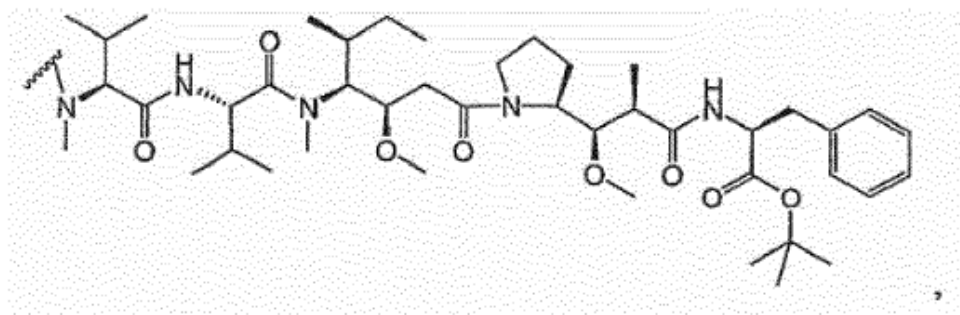
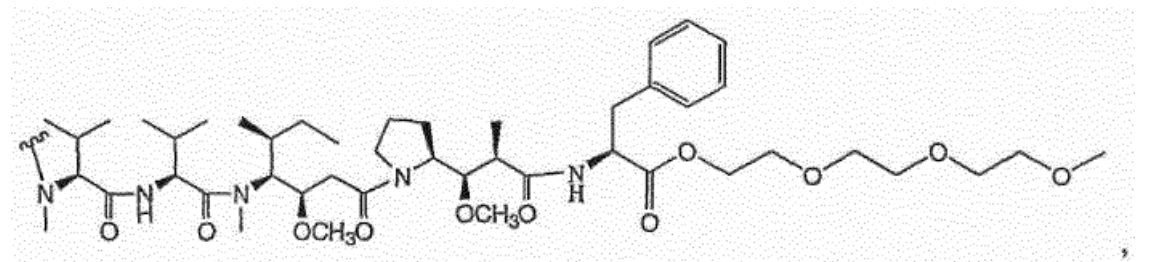
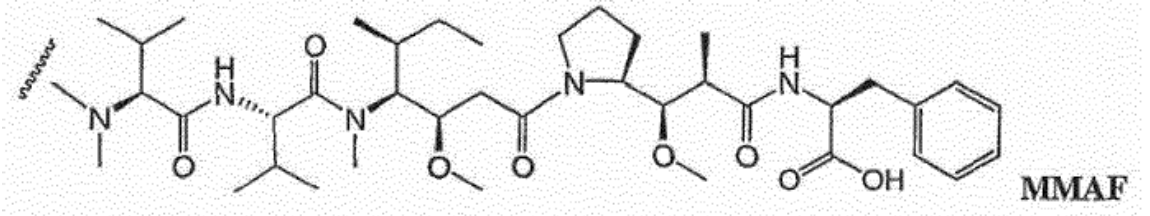
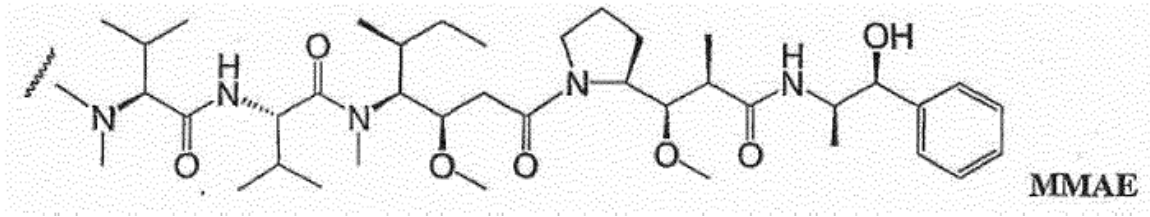
En un ejemplo particular, cuando Z es -O-,  $R^{11}$  es H, metilo o t-butilo.

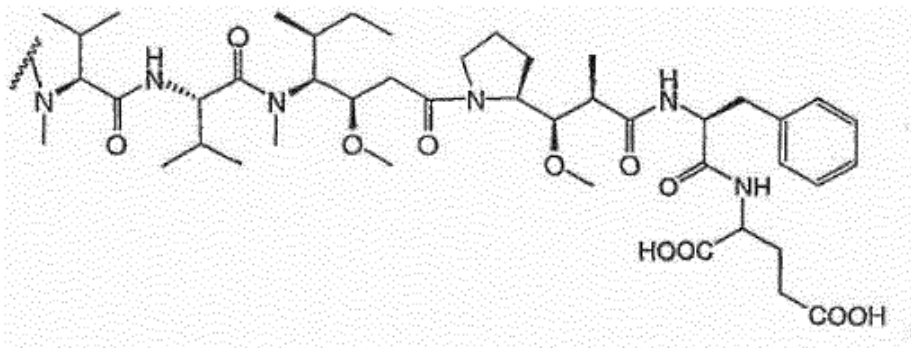
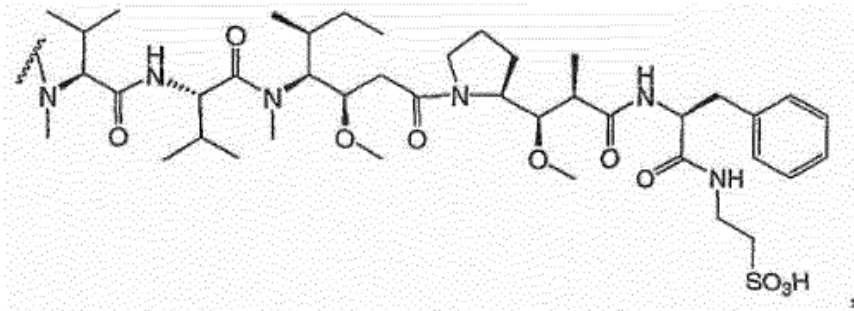
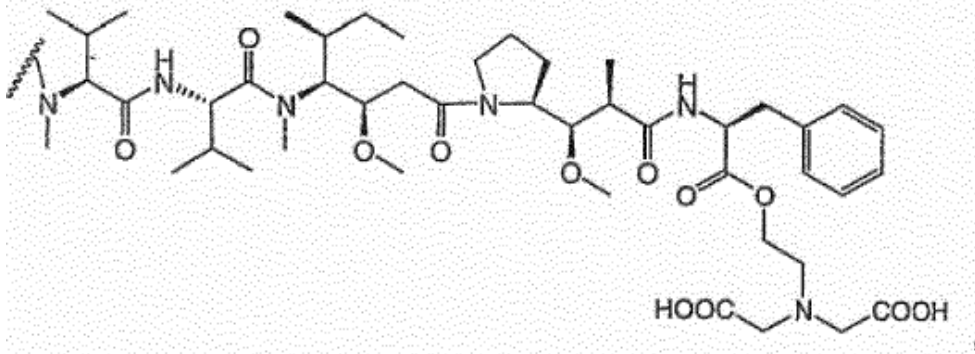
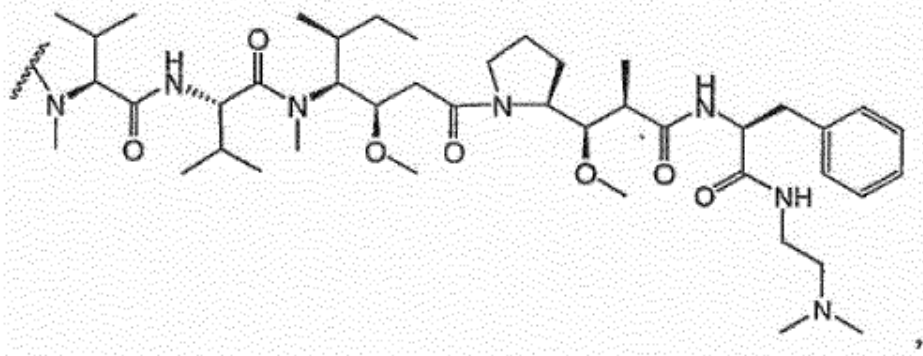
- 50 En un ejemplo, cuando Z es -NH,  $R^{11}$  es  $-CH(R^{15})_2$ , en la que  $R^{15}$  es  $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ , y  $R^{16}$  es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> o  $-(CH_2)_n-COOH$ .

En otro ejemplo, cuando Z es -NH,  $R^{11}$  es  $-CH(R^{15})_2$ , en la que  $R^{15}$  es  $-(CH_2)_n-SO_3H$ .

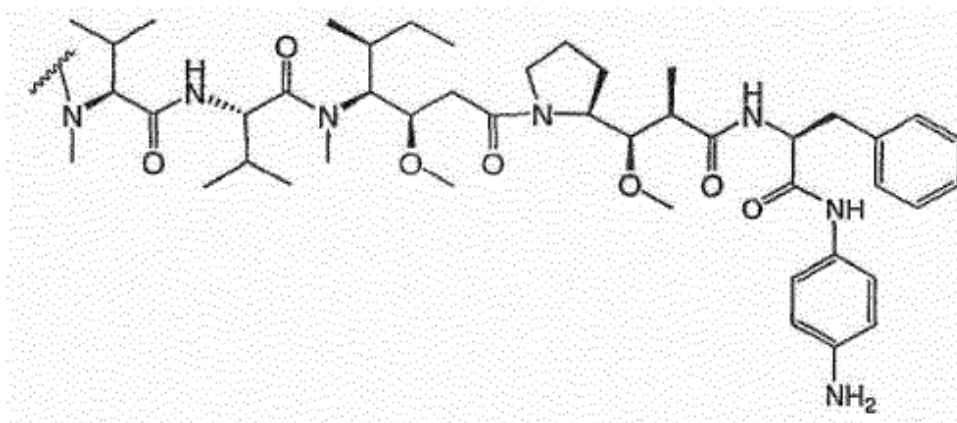
- 55 Las unidades de fármaco ilustrativas (-D) incluyen las unidades de fármaco que tienen las siguientes estructuras:







y



una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

- 5 Los grupos hidrófilos, tales como, aunque no de forma limitativa, los ésteres de trietilenglicol (TEG), como se muestra anteriormente, pueden unirse a la Unidad de fármaco en R<sup>11</sup>. Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, los grupos hidrófilos ayudan a la internalización y a la no aglomeración de la unidad de fármaco.

#### **4.5 LA UNIDAD DE LIGANDO**

- 10 La unidad de ligando (L-) incluye en su alcance cualquier unidad de un ligando (L) que se une o se asocia o compleja de forma reactiva con un receptor, antígeno u otro resto receptor asociado con una población de células diana dada. Un Ligando es una molécula que se une, forma complejo con o reacciona con una fracción de una población de células que se busca modificar terapéuticamente o, por otro lado, biológicamente. En un aspecto, la
- 15 unidad de ligando actúa para administrar la unidad de fármaco a la población de células diana concreta con la cual la unidad de ligando reacciona. Dichos Ligandos incluyen, aunque no de forma limitativa, proteínas de peso molecular grande tales como, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos, proteínas, polipéptidos o péptidos de bajo peso molecular, lectinas, glucoproteínas, no péptidos, vitaminas, moléculas transportadoras de nutrientes (tales como, aunque no de forma limitativa, transferrina) o cualquier otra molécula o
- 20 sustancia de unión a célula.

- Una Unidad de ligando puede formar un enlace con una Unidad ensanchadora, una Unidad de aminoácido, una Unidad separadora o una Unidad de fármaco. Una Unidad de ligando puede formar un enlace con una Unidad
- 25 enlazadora mediante un heteroátomo del ligando. Los heteroátomos que pueden estar presentes en una unidad de ligando incluyen azufre (en una realización, desde un grupo sulfhidrilo de un ligando), oxígeno (en una realización, desde un grupo carbonilo, carboxilo o hidroxilo de un ligando) y nitrógeno (en una realización, desde un grupo amino primario o secundario de un ligando). Estos heteroátomos pueden estar presentes en el ligando en el estado natural del ligando, por ejemplo un anticuerpo de origen natural, o pueden introducirse en el ligando mediante una
- 30 modificación química.

- En un ejemplo, un Ligando tiene un grupo sulfhidrilo y la unidad ligando se une a la unidad enlazadora mediante el
- átomo de azufre del grupo sulfhidrilo.

- En otro ejemplo más, el ligando tiene uno o más restos lisina que pueden estar modificados químicamente para
- 35 introducir uno o más grupos sulfhidrilo. La unidad de ligando se une a la unidad enlazadora mediante el átomo de azufre del grupo sulfhidrilo. Los reactivos que se pueden usar para modificar las lisinas incluyen, aunque no de forma limitativa, S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA) y clorhidrato de 2-iminotiolano (Reactivo de Traut).

- En otro ejemplo, el ligando puede tener uno o más grupos de hidratos de carbono que pueden estar modificados
- 40 químicamente para tener uno o más grupos sulfhidrilo. La Unidad de ligando se une a la Unidad enlazadora, tal como la Unidad ensanchadora, mediante el átomo de azufre del grupo sulfhidrilo.

- En otro ejemplo más, el ligando puede tener uno o más grupos hidrato de carbono que se pueden oxidar para
- 45 proporcionar un grupo aldehído (-CHO) (véase, por ejemplo, Laguzza, et al., J. Med. Chem. 1989, 32(3), 548-55). El correspondiente aldehído puede formar un enlace con un Sitio reactivo de una Unidad ensanchadora. Los sitios reactivos de una Unidad ensanchadora que pueden reaccionar con un grupo carbonilo de un Ligando incluyen, aunque no de forma limitativa, hidrazina e hidroxilamina. Otros protocolos para la modificación de proteínas para la unión o asociación de las unidades del fármaco en Coligan et al., Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John
- 50 Wiley & Sons (2002), incorporado en el presente documento por referencia.

La proteína, polipéptido, y o ligandos peptídicos no inmunorreactivos útiles incluyen, aunque no de forma limitativa,

transferrina, factores de crecimiento epidérmico ("EGF"), bombesina, gastrina, péptido liberador de gastrina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, IL-2, IL-6, factores de crecimiento transformantes ("TGF"), tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , factor de crecimiento de vaccinia ("VGF"), insulina y factores de crecimiento I y II de tipo insulina, lectinas y apoproteína procedente de una lipoproteína de baja densidad.

5 Los anticuerpos policlonales útiles son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivadas de los sueros de animales inmunizados. Para la producción de anticuerpos policlonales contra un antígeno de interés pueden utilizarse diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, para la producción de anticuerpos policlonales, se pueden inmunizar diversos hospedadores animales mediante inyección con un antígeno de interés o uno de sus derivados, incluyendo, aunque no de forma limitativa, conejos, ratones, ratas, y cobayas. Se pueden utilizar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedadora, e incluyen, aunque no de forma limitativa adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Son bien conocidos también en la materia dichos adyuvantes.

20 Los anticuerpos monoclonales útiles son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un determinante antigénico concreto (por ejemplo, un antígeno de células cancerosas, un antígeno vírico, un antígeno microbiano, una proteína, un péptido, un hidrato de carbono, un producto químico, ácido nucleico, o fragmentos de los mismos). Se puede preparar un anticuerpo monoclonal (mAb) para un antígeno de interés utilizando cualquier técnica conocida en la materia que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en el cultivo. Estos incluyen, aunque no de forma limitativa, la técnica del hibridoma descrita originalmente por Köhler y Milstein (1975, *Nature* 256, 495-497), la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72), y la técnica del hibridoma del VEB (Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, e IgD y cualquiera de sus subclases. el hibridoma que produce los mAb de uso en la presente invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*.

30 Los anticuerpos monoclonales útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados, fragmentos de anticuerpos, o anticuerpos monoclonales quiméricos de ser humano-ratón (u otras especies). Se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos mediante cualquiera de numerosas técnicas conocidas en la materia (por ejemplo, Teng y col., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80,7308-7312; Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4,72-79; y Olsson et al., 1982, *Meth. Enzymol.* 92, 3-16).

35 El anticuerpo puede ser también un anticuerpo biespecífico. Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión simultánea de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein co., 1983, *Nature* 305:537-539). Debido a la mezcla aleatoria de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpos, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. Se divulgan procedimientos similares en la publicación internacional n.º WO 93/08829 y en Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991).

45 De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos una parte de las regiones bisagra, C<sub>H2</sub>, y C<sub>H3</sub>. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (C<sub>H1</sub>) que contiene el sitio necesario para la unión con la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ácidos nucleicos con secuencias que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se transfectan simultáneamente en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones no son de significancia particular.

60 En un ejemplo de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos tienen una cadena pesada de la inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación (publicación internacional n.º WO 94/04690) que se ha incorporado por referencia en el presente documento.

65

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

Los anticuerpos bifuncionales también se describen en la publicación de patente europea n.º EPA 0 105 360. Como se divulga en esta referencia, los anticuerpos híbridos o bifuncionales pueden derivarse ya sea biológicamente, es decir, mediante técnicas de fusión celular, o químicamente, especialmente con agentes de reticulación o reactivos formadores de puentes disulfuro, y pueden comprender anticuerpos completos o sus fragmentos. Los métodos para obtener dichos anticuerpos híbridos se divulgan, por ejemplo, en la publicación internacional WO 83/03679, y en la publicación de patente europea n.º EPA 0 217 577.

El anticuerpo puede ser un fragmento, derivado o análogo de un anticuerpo funcionalmente activo que se une inmunoespecíficamente a antígenos de células cancerosas, antígenos víricos, o antígenos microbianos u otros anticuerpos unidos a células tumorales o matriz. A este respecto, "funcionalmente activo" significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de estimular anticuerpos anti-anti-idiotipo que reconocen el mismo antígeno que el anticuerpo del cual se deriva el fragmento, derivado o análogo reconocido. Específicamente, en una realización ilustrativa, se puede potenciar la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina mediante la delección de las secuencias marco y de las CDR que están en el extremo C de la secuencia de la CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar qué secuencias de las CDR se unen al antígeno, se pueden usar péptidos sintéticos que contienen las secuencias de las CDR en los ensayos de unión con el antígeno mediante cualquier procedimiento de ensayo de unión conocido en la materia (por ejemplo, el ensayo BIA core) (véanse, por ejemplo, Kabat y col., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, National Institutes of Health, Bethesda, Md; Kabat E et al., 1980, *J. of Immunology* 125(3):961-969).

Otros anticuerpos útiles incluyen fragmentos de anticuerpos tales como, aunque no de forma limitativa, fragmentos  $F(ab')_2$ , que contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada se pueden producir mediante digestión de la molécula de anticuerpo con pepsina, y los fragmentos Fab, que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos  $F(ab')_2$ . Otros anticuerpos útiles son los dímeros de cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpos, o cualquier fragmento mínimo de los mismos tales como los Fv o los anticuerpos monocatenarios (SCA) (por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4946778; Bird, 1988, *Science* 242:423-42; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; y Ward et al., 1989, *Nature* 334:544-54), o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo.

Adicionalmente, los anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden tanto porciones humanas como no humanas, que pueden fabricarse utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales, son anticuerpos útiles. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que las distintas porciones se obtienen de distintas especies animales, tales como las que tienen una región variable obtenida de un monoclonal murino y regiones constantes de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, Cabilly et al., patente de Estados Unidos n.º 4816567; y Boss et al., patente de Estados Unidos n.º 4816397). Los anticuerpos humanizados son moléculas de ser humano procedentes de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) procedentes de especies no humanas y una región marco procedente de una molécula de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, Queen, patente de Estados Unidos n.º 5.585.089.) Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en la publicación internacional N.º WO 87/02671; publicación de patente europea n.º 184.187; publicación de patente europea n.º 171496; publicación de patente europea n.º 173494; publicación internacional N.º WO 86/01533; patente de Estados Unidos n.º 4816567; publicación de patente europea n.º 12.023; Berter et al., 1988, *Science* 240:1041-1043; Liu et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu et al., 1987, *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura et al., 1987, *Cancer. Res.* 47:999-1005; Wood et al., 1985, *Nature* 314:446-449; y Shaw et al., 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, 1985, *Science* 229:1202-1207; Oi et al, 1986, *BioTechniques* 4:214; patente de Estados Unidos n.º 5225539; Jones et al., 1986, *Nature* 321:552-525; Verhoeyan et al. (1988) *Science* 239: 1534; y Beidler et al., 1988, *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Son particularmente deseables los anticuerpos completamente humanos y se pueden producir utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar los genes de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar los genes de la cadena pesada y ligera humana. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o parte de un polipéptido de la invención. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno utilizando la tecnología del hibridoma convencional. Los transgenes de la inmunoglobulina humana hospedados por los ratones transgénicos se redisponen durante la diferenciación de los linfocitos B y experimentan posteriormente cambio de clase y mutación somática. Por tanto, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos de IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véanse Lonberg y Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). Para una descripción detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y los protocolos para producir dichos anticuerpos. Véase, por

ejemplo, patentes de Estados Unidos n.º 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806. Se pueden obtener otros anticuerpos humanos comercialmente de, por ejemplo, Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Genpharm (San Jose, CA).

5 Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconozcan un epítipo seleccionado utilizando una técnica denominada "selección guiada". En esta solución, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se usa para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Jespers et al. (1994) *Biotechnology* 12:899-903). Los anticuerpos humanos se pueden producir usando varias técnicas conocidas en la materia, incluyendo las fagotecas de expresión (Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991); Quan, M. P. y Carter, P. 2002. *The rise of monoclonal antibodies as therapeutics*. En *Anti-IgE and Allergic Disease*, Jardieu, P. M. y Fick Jr., R. B., ed., Marcel Dekker, Nueva York, NY, Capítulo 20, págs. 427-469).

15 En otros ejemplos, el anticuerpo es una proteína de fusión de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionalmente activos, por ejemplo, en el que el anticuerpo se fusiona mediante un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), bien en el extremo N o en el extremo C de una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o parte de la misma, preferentemente al menos una porción de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína) que no es el anticuerpo. Preferentemente, el anticuerpo o fragmento del mismo está unido covalentemente a la otra proteína en el extremo N del dominio constante.

20 Los anticuerpos incluyen análogos y derivados que bien pueden estar modificados, es decir, mediante el enlace covalente de cualquier tipo de molécula siempre que dicho enlace covalente permita al anticuerpo retener su inmunoespecificidad de unión a antígeno. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, los derivados y análogos de los anticuerpos incluyen aquellos que se han modificado adicionalmente, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes, escisión proteolítica, unión a una unidad de anticuerpo celular u otra proteína, etc. Se pueden llevar a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, incluyendo, aunque no de forma limitativa, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

30 Los anticuerpos incluyen anticuerpos que tienen modificaciones (por ejemplo, sustituciones, deleciones o adiciones) en restos de aminoácidos que interactúan con receptores Fc. En particular, los anticuerpos incluyen anticuerpos que tienen modificaciones en restos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio dirigido contra Fc y el receptor de FcRn (véase, por ejemplo, la publicación internacional n.º WO 97/34631. Los anticuerpos inmunoespecíficos de un antígeno de células cancerosas se pueden obtener comercialmente anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de células cancerosas, por ejemplo de Genentech (San Francisco, CA) o producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, por ejemplo, síntesis química o técnicas de expresión recombinante. Pueden obtenerse anticuerpos inmunoespecíficos que codifican la secuencia de nucleótidos de un antígeno de célula cancerosa, por ejemplo, de la base de datos GenBank o de una base de datos del tipo de ésta, publicaciones de bibliografía, o por clonación y secuenciación rutinarias.

40 En un ejemplo específico, se pueden usar anticuerpos conocidos para el tratamiento o la prevención del cáncer. Se pueden obtener anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa comercialmente o producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, por ejemplo, técnicas de expresión recombinante. Pueden obtenerse anticuerpos inmunoespecíficos que codifican la secuencia de nucleótidos de un antígeno de célula cancerosa, por ejemplo, de la base de datos GenBank o de una base de datos del tipo de ésta, publicaciones de bibliografía, o por clonación y secuenciación rutinarias. Los ejemplos de anticuerpos disponibles para el tratamiento del cáncer incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado, HERCEPTIN® (trastuzumab; Genentech) para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico; RITUXAN® (rituximab; Genentech) que es un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra CD20 para el tratamiento de pacientes con linfoma no de Hodgkin; OvaRex (AltaRex Corporation, MA) que es un anticuerpo de murino para el tratamiento del cáncer de ovario; Panorex (Glaxo Wellcome, NC) que es un anticuerpo IgG<sub>2a</sub> de murino para el tratamiento del cáncer colorrectal; Cetuximab Erbitux (Imclone Systems Inc., NY) que es un anticuerpo quimérico dirigido contra EGFR IgG para el tratamiento de cánceres positivos para el factor de crecimiento epidérmico, tales como cáncer de cabeza y cuello; Vitaxin (MedImmune, Inc., MD) que es un anticuerpo humanizado para el tratamiento del sarcoma; Campath I/H (Leukosite, MA) que es un anticuerpo IgG<sub>1</sub> humanizado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC); SMART MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo IgG humanizado dirigido contra CD33 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA); LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ) que es un anticuerpo de tipo IgG humanizado dirigido contra CD22 para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin; SMART ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo humanizado dirigido contra HLA-DR para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin; Oncolym (Techniclone, Inc., CA) que es un anticuerpo de murino radiomarcado dirigido contra HLA-Dr10 para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin; Allomune (BioTransplant, CA) que es un mAb humanizado dirigido contra CD2 para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin o del linfoma no de Hodgkin; Avastina (Genentech, Inc., CA) que es un anticuerpo humanizado anti-MHCII para el tratamiento de los cánceres de pulmón y colorrectal; Epratuzamab (Immunomedics, Inc., NJ y Amgen, CA) que es un anticuerpo dirigido contra CD22 para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin; y CEAcide (Immunomedics, NJ) que es un anticuerpo humanizado dirigido contra CEA para el tratamiento del cáncer

colorrectal.

Otros anticuerpos útiles en el tratamiento del cáncer incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos frente a los siguientes antígenos: CA125 (ovario), CA15-3 (carcinomas), CA19-9 (carcinomas), L6 (carcinomas), Lewis Y (carcinomas), Lewis X (carcinomas), alfa fetoproteína (carcinomas), CA 242 (colorrectal), fosfatasa alcalina placentaria (carcinomas), antígeno específico de próstata (próstata), fosfatasa ácida prostática (próstata), factor de crecimiento epidérmico (carcinomas), MAGE-1 (carcinomas), MAGE-2 (carcinomas), MAGE-3 (carcinomas), MAGE-4 (carcinomas), receptor anti-transferrina (carcinomas), p97 (melanoma), MUC1-KLH (cáncer de mama), CEA (colorrectal), gp100 (melanoma), MARTI (melanoma), PSA (próstata), receptor de IL-2 (leucemia de linfocitos T y linfomas), CD20 (linfoma no de Hodgkin), CD52 (leucemia), CD33 (leucemia), CD22 (linfoma), gonadotropina coriónica humana (carcinoma), CD38 (mieloma múltiple), CD40 (linfoma), mucina (carcinomas), P21 (carcinomas), MPG (melanoma), y el producto del oncogén Neu (carcinomas). Algunos anticuerpos específicos útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, mAb BR96 (Trail, P. A., Willner, D., Lasch, S. J., Henderson, A. J., Hofstead, S. J., Casazza, A. M., Firestone, R. A., Hellstrom, I., Hellström, K. E., "Cure of Xenografted Human Carcinomas by BR96-Doxorubicin Immunoconjugates" *Science* 1993, 261,212-215), BR64 (Trail, PA, Willner, D, Knipe, J., Henderson, A. J., Lasch, S. J., Zoeckler, M. E., Trailsmith, M. D., Doyle, T. W., King, H. D., Casazza, A. M., Braslawsky, G. R., Brown, J. P., Hofstead, S. J., (Greenfield, R. S., Firestone, R. A., Mosure, K., Kadow, D. F., Yang, M. B., Hellstrom, K. E., y Hellstrom, I. "Effect of Linker Variation on the Stability, Potency, and Efficacy of Carcinoma-reactive BR64-Doxorubicin Immunoconjugates" *Cancer Research* 1997, 57, 100-105, mAb contra el antígeno CD40, tal como el MAb S2C6 (Francisco, J. A., Donaldson, K. L., Chace, D., Siegall, C. B., y Wahl, A. F. "Agonistic properties and *in vivo* antitumor activity of the anti-CD-40 antibody, SGN-14" *Cancer Res.* 2000, 60, 3225-3231), los mAb contra el antígeno CD70, tales como el mAb 1F6 y el mAb 2F2, y los mAb contra el antígeno CD30, tal como AC10 (Bowen, M. A., Olsen, K. J., Cheng, L., Avila, D., y Podack, E. R. "Functional effects of CD30 on a large granular lymphoma cell line YT" *J. Immunol.*, 151,5896-5906, 1993; Wahl et al., 2002 *Cancer Res.* 62(13):3736-42). Se pueden usar otros muchos anticuerpos internalizadores que se unen a antígenos asociados a tumores y se han revisado (Franke, A. E., Sievers, E. L., y Scheinberg, D. A., "Cell surface receptor-targeted therapy of acute myeloid leukemia: a review" *Cancer Biother Radiopharm.* 2000,15, 459-76; Murray, J. L., "Monoclonal antibody treatment of solid tumors: a coming of age" *Semin Oncol.* 2000, 27, 64-70; Breitling, F. y Dubel, S., *Recombinant Antibodies*, John Wiley, and Sons, Nueva York, 1998).

En algunos ejemplos, el anticuerpo no es Trastuzumab (anticuerpo dirigido contra HER2 humanizado de longitud completa (MW 145167)), HerceptinF(ab')<sub>2</sub> (derivado enzimáticamente del anticuerpo dirigido contra HER2 (MW 100000)), 4D5 (anticuerpo dirigido contra HER2 murino, de longitud completa, derivado de hibridoma), rhu4D5 (anticuerpo humanizado de longitud completa, expresado transitoriamente), rhuFab4D5 (Fab recombinante humanizado (MW 47738)), 4D5Fc8 (anticuerpo dirigido contra HER2 murino, de longitud completa, con dominio de unión a FcRn mutado), o Hg (4D5 humanizado de longitud completa "sin bisagra", donde las cisteínas de la cadena pesada están mutadas a serinas. Expresados en *E. coli* (por tanto, no glicosilados)).

En otro ejemplo específico, los anticuerpos conocidos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad autoinmunitaria. se utilizan de acuerdo con las composiciones y métodos de la invención. Los anticuerpos inmunoespecíficos de un antígeno de una célula que es responsable de producir anticuerpos autoinmunitarios se puede obtener de cualquier organización (por ejemplo, un científico de una universidad o una compañía) o producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, por ejemplo, síntesis química o técnicas de expresión recombinante. En otra realización, los anticuerpos útiles que son inmunoespecíficos para el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpo antinuclear; anticuerpo dirigido contra el ADNds; anticuerpo dirigido contra el ADNss, IgM de anticuerpo dirigido contra cardiolipina, IgG; IgM de anticuerpo dirigido contra fosfolípido, IgG; anticuerpo dirigido contra SM; anticuerpo dirigido contra mitocondrias; anticuerpo tiroideo; anticuerpo microsomal; anticuerpo de tiroglobulina; anticuerpo dirigido contra SCL-70; anticuerpo dirigido contra Jo; anticuerpo dirigido contra U.<sub>1</sub>RNP; anticuerpo dirigido contra La/SSB; anticuerpo dirigido contra SSA; anticuerpo dirigido contra SSB; anticuerpo dirigido contra células peritales; anticuerpo dirigido contra histonas; anticuerpo dirigido contra RNP; C-ANCA; P-ANCA; Anticentrómero; anticuerpo antifibrilarina y anticuerpo dirigido contra GBM.

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

En un ejemplo, el Ligando se une a un linfocito activado que se asocia con una enfermedad autoinmunitaria.

En otro ejemplo específico, los Ligandos inmuno-específicos útiles para un antígeno vírico o microbiano son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos quiméricos, humanizados o monoclonales humanos. Como se usa en el presente documento, el término "antígeno vírico" incluye, pero sin limitación, cualquier péptido vírico, proteína polipeptídica (por ejemplo, gp120 del VIH, VIH nef, glicoproteína F del VSR, neuraminidasa del virus de la gripe, hemaglutinina del virus de la gripe, HTLV tax, glicoproteína del virus del herpes simple (por ejemplo, gB, gC, gD y gE) y el antígeno superficial de la hepatitis B) que es capaz de estimular una respuesta inmunitaria. Como se usa en el presente documento, la expresión "antígeno microbiano" incluye, pero sin limitación, cualquier péptido microbiano, polipéptido, proteína, sacárido, polisacárido, o molécula de lípido (por ejemplo, una bacteria, hongos, protozoo patógeno o polipéptido de levadura incluyendo, por ejemplo, LPS y un polisacárido capsular 5/8) que es capaz de estimular una respuesta inmune.

Se pueden obtener anticuerpos inmuno-específicos de un antígeno vírico o microbiano comercialmente, por ejemplo, de BD Biosciences (San Francisco, CA), Chemicon International, Inc. (Temecula, CA), o Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA) o producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, por ejemplo, síntesis química o técnicas de expresión recombinante. se puede obtener la secuencia de nucleótidos que codifica anticuerpos que son inmuno-específicos de un antígeno vírico o microbiano, por ejemplo, de la base de datos GenBank o de una base de datos del tipo de ésta, publicaciones de bibliografía, o por clonación y secuenciación rutinarias.

En un ejemplo específico, los Ligandos útiles son aquellos que son útiles para el tratamiento de una infección vírica o microbiana de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documento. Los ejemplos de anticuerpos útiles para el tratamiento de una infección vírica o una infección microbiana incluyen, aunque no de forma limitativa, SYNAGIS (MedImmune, Inc., MD) que es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el virus sincitial respiratorio (VSR) para el tratamiento de pacientes con infección por VSR; PRO542 (Progenies) que es un anticuerpo de fusión con CD4 útil para el tratamiento de la infección por VIH; OSTAVIR (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo humano útil para el tratamiento del virus de la hepatitis B; PROTOVIR (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo de IgG<sub>1</sub> humanizado útil para el tratamiento del citomegalovirus (CMV); y anticuerpos dirigidos contra LPS.

Otros anticuerpos útiles en el tratamiento de las enfermedades infecciosas incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos contra los antígenos procedentes de cepas patógenas de bacterias (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenas*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter (Vibrio) fetus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Treponema carateum*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma spp.*, *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia tsutsugumushi*, *Chlamydia spp.*); pathogenic fungi (*Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*); protozoos (*Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Pneumocystis pneumonia*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*); o Helminthos (*Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *SSchistosoma haematobium*, y *anquilostomas*).

Otros anticuerpos para el tratamiento de enfermedades víricas incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos contra antígenos de virus patógenos, que incluyen como ejemplos y no como limitación: Poxviridae, Herpesviridae, Virus del Herpes Simple 1, Virus del Herpes Simple 2, Adenoviridae, Papovaviridae, Enteroviridae, Picornaviridae, Parvoviridae, Reoviridae, Retroviridae, los virus de la gripe, los virus de la paragripe, paperas, sarampión, virus sincitial respiratorio, rubeola, Arboviridae, Rhabdoviridae, Arenaviridae, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis E, virus de la hepatitis no A/no B, Rhinoviridae, Coronaviridae, Rotoviridae, y el virus de la inmunodeficiencia humana.

En los intentos para descubrir las dianas celulares eficaces para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer, los investigadores han deseado identificar polipéptidos transmembrana o asociados de otra forma a tumores que se expresan específicamente sobre la superficie de uno o más tipo(s) concreto(s) de células cancerosas en comparación con una o más célula(s) no cancerosas normales. A menudo, dichos polipéptidos asociados a tumores se expresan más abundantemente sobre la superficie de células cancerosas en comparación a sobre la superficie de células no cancerosas. la identificación de dichos polipéptidos de antígenos superficiales celulares asociados a tumores ha proporcionado una sensibilización a la capacidad de las células cancerosas para dirigirse de manera específica para los tratamientos basados en anticuerpos mediante la destrucción.

Los anticuerpos que comprenden Ab en los conjugados de anticuerpo y fármaco de Fórmula 1c (ADC) y que pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos contra antígenos



asociados a tumores(TAA). Dichos antígenos asociados a tumores son bien conocidos en la técnica, y se pueden preparar para su uso en la generación de anticuerpos usando métodos e información que son bien conocidos en la materia. Los ejemplos de TAA incluyen (1)-(35), aunque no de forma limitativa los TAA (1)-(35) listados a continuación. Por comodidad, la información relativa a dichos antígenos, todos los cuales son conocidos en la técnica, se relacionan a continuación e incluyen nombres, nombres alternativos, números de registro de GenBank y referencia(s) primaria(s). Los antígenos asociados a tumores que son diana de anticuerpos incluyen todas las variantes de secuencia de aminoácidos y las isoformas que tienen al menos aproximadamente 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 % de identidad de secuencia con respecto a las secuencias identificadas en las correspondientes secuencias relacionadas (SEQ ID NOS: 1-35) o las secuencias identificadas en las referencias citadas. En algunos ejemplos, los TAA que tienen variantes de secuencia de aminoácidos que presentan sustancialmente las mismas propiedades o características biológicas que un TAA que tiene la secuencia que aparece en las correspondientes secuencias relacionadas (SEQ ID NOS: 1-35). Por ejemplo, un TAA que tiene una variante de secuencia generalmente es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo que se une específicamente al TAA de la correspondiente secuencia relacionada. Las secuencias y la divulgación específicamente citada en el presente documento se han incorporado expresamente por referencia.

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

(1) BMPR1B (receptor de la proteína morfogenética ósea - tipo IB, n.º de registro GenBank NM\_001203, ten Dijke,P., et al. *Science* 264 (5155): 101-104 (1994), *Oncogene* 14 (11):1377-1382 (1997)); documento WO2004063362 (Reivindicación 2); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento US2003134790-A1 (Página 38-39); documento WO2002102235 (Reivindicación 13; página 296); documento WO2003055443 (Página 91-92); documento WO200299122 (Ejemplo 2; Página 528-530); documento WO2003029421 (Reivindicación 6); documento WO2003024392 (Reivindicación 2; Fig 112); documento WO200298358 (Reivindicación 1; página 183); documento WO200254940 (Página 100-101); documento WO200259377(página 349-350); documento WO200230268 (Reivindicación 27; página 376); documento WO200148204 (Ejemplo; Fig. 4) NP\_001194 receptor de la proteína morfogenética ósea, tipo IB /pid=NP\_001194.1-Referencias cruzadas: MIM:603248; NP\_001194.1; NM\_001203\_1 502 aa

```

MLLRSGKLNVTGKEDGESTAPTTPRPKVLRCCKHHHCPEDSVNNICSTDGVCPTMIEED
DSGLPVVVTSGCLGLEGSDFQCRDTPIPHQRRSIECCTERNECNKDLHPTLPPLKNRDFVD
GPIHHRALLISVTVCSSLLLVLIILFCYFRYKRQETRPRYSIGLEQDETYIPPGESLRDLI
EQSQSSGSGSGLPLLQVQRTIAKQIQMVKQIGKGRYGEVWVGKWRGEKVAVKVFFTTEEAS
WFRETEIYQTVLMRHENILGFIAADIKGTGSWTQLYLYLITDYHENGSLYDYLYKSTTLDAKS
MLKLAYSSVSGLCHLHTEIFSTQGKPAIAHRDLKSKNILVKKNGTCCIADLGLAVKFI SD
TNEVDI PPNTRVGT KRYMPPEVLDES LNRNHFSYIMADMY SFGLILWEVARRCVSGGIV
EEYQLPHYDLVPSDP SYEDMREIVC IKKLRPSFPNRWSSDECLRQMGKLMTECWAHNPAS
RLTALRVKKT LAKMSESQDIKL

```

30

(SEQ ID NO: 1)

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, n.º de registro GenBank NM\_003486); *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255 (2), 283-288 (1999), *Nature* 395 (6699):283-291 (1998), Gaugitsch,H.W., et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267 (16):11267-11273); documento WO2004048938 (Ejemplo 2); documento WO2004032842 (Ejemplo IV); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento WO2003016475 (Reivindicación 1); documento WO200278524 (Ejemplo 2); documento WO200299074 (Reivindicación 19; Página 127-129); documento WO200286443 (Reivindicación 27; Páginas 222,393); documento WO2003003906 (Reivindicación 10; página 293); documento WO200264798 (Reivindicación 33; Página 93-95); documento WO200014228 (Reivindicación 5; Página 133-136); documento US2003224454 (Fig 3); documento WO2003025138 (Reivindicación 12; página 150); NP\_003477 familia del transportador de soluto 7 (transportador de aminoácidos catiónicos, sistema y+), miembro 5 /pid=NP\_003477.3 - Homo sapiens Referencias cruzadas: MIM:600182; NP\_003477.3; NM\_015923; NM\_003486\_1 507 aa

45

MAGAGPKRRALAAPAAEKEEAREKMLAAKSADGSAPAGEGEGVTLQRNITLLNGVAIV  
 GTIIGSGIFVVTPTGVLKEAGSPGLALVVWAACGVFSIVGALCYAELGTTISKSGGDYAYM  
 LEVYGSLPAFLKLWIELLIIRPSSQYIVALVFATYLLKPLFPVPEEAAKLVAACLV  
 LLTAVNCYSVKAATRVQDAFAAAKLLALALIILLGFVQIGKGVVSNLDPNFSFEGTKLDV  
 GNIVLALYSGLFAYGGWNYLNFVTEEMINPYRNLPLAIIISLPIVTLVYVLTNLAYFTTL  
 STEQMLSSEAVAVDFGNVHLGVMSWIIIPVFGVLSFCGVSNGSLFTSSRLLFFVGSREGHLP  
 SILSMIHPQLLTPVPSLVFTCVMTLLYAFSKDIFSVINFFSFFNWLCVALAIGMIWLRH  
 RKPELERPIKVNALPVFFILACLFLIAVSFWKTPVECGIGFTIILSGLPVYFFGVWVK  
 KPWLLQGIFFSTTVLCQKLMQVVPQET

(SEQ ID NO: 2)

- 5 (3) STEAP1 (antígeno epitelial seis transmembrana de la próstata, n.º de registro GenBank NM\_012449 Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert,R.S., et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96 (25):14523-14528); documento WO2004065577 (Reivindicación 6); documento WO2004027049 (Fig 1L); documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento WO2004016225 (Reivindicación 2); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento US2003157089 (Ejemplo 5); documento US2003185830 (Ejemplo 5); documento US2003064397 (Fig 2); documento  
 10 WO200289747 (Ejemplo 5; Página 618-619); documento WO2003022995 (Ejemplo 9; Fig 13A, Ejemplo 53; Página 173, Ejemplo 2; Fig 2A);  
 NP\_036581 antígeno epitelial seis transmembrana de la próstata  
 Referencias cruzadas: MIM:604415; NP\_036581.1; NM\_012449\_1  
 339 aa

15

MESRKDITNQEELWKMKPRRNLEEDDYLHKDTGETSMLKRPVLLHLHQTAHADEFDCPSE  
 LQHTQELFPQWHLPIKIAAIIASLTFLYTLREVIHPLATSHQQYFYKIPILVINKVLP  
 VSIITLLALVYLPGVIAAIVQLHNGTKYKFFPHWLDKMWLTKRQFGLLSFFFVAVLHAIYSL  
 SYPMRRSYRYKLLNWAYQQVQONKEDAWIEHDVWRMEIYVSLGIVGLAILALLAVTTSIPS  
 VSDSLTWREFHYIQSKLGI V S L L L G T I H A L I F A W N K W I D I K Q F V W Y T P P T F M I A V F L P I V  
 VLIFKSILFLPCLRKKILKIRHGVEDVTKINKTEICSQL

(SEQ ID NO 3)

- 20 (4) 0772P (CA125, MUC16, n.º de registro GenBank AF361486 J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375 (2001)); documento WO2004045553 (Reivindicación 14); documento WO200292836 (Reivindicación 6; Fig 12); documento WO200283866 (Reivindicación 15; Página 116-121); documento US2003124140 (Ejemplo 16); documento US2003091580 (Reivindicación 6); documento WO200206317 (Reivindicación 6; Página 400-408);  
 Referencias cruzadas: GI:34501467; AAK74120.3; AF361486\_1  
 25 6995 aa

PVTSLLTPGLVITTDTRMGISREPGTSSTSNLSSTSHERLTTLEDTVDTEAMQPSTHTAVT  
NVRTSISGHESQSSVLSDESTPKATSPMGTTYTMGETSVSISTSDFFETSRIQIEPTSSL  
TSGLRETSSSERISSATEGSTVLSEVPSGATTEVSRTEVISSRGTSMSGPDQFTISPDIS  
TEAITRLSTSPIMTESAESAITIETGSPGATSEGLTLDLDTSTTTFWSGTHSTASPGFHS  
EMTTLMSRTPGDVFPWPSLPSVEEASSVSSSLSPAMTSTSTFFSTLPESISSSPHPVTALL  
TLGPVKTTDMLRTSSEPETSPPNLSSTSAEILATSEVTKDREKIHPSNTPVVNVGTVI  
YKHLSPSSVLADLVTTKPTSPMATTSTLGNTSVSTSTPAFPETMMTQPTSSLTSGLREIS  
TSQETSSATERSASLSCMPTGATTKVSRTEALS LGRTSTPGPAQSTISPEISTETITRIS  
TPLTTTGS AEMTITPKTGHS GASSQGTFFLDTSSRASWP GTHSAATHRSPHSGMTTPMSR  
GPEDVSWPSRPSVEKTSPPSSLVLSAVTSPSPLYSTPSESSHSSPLRVTSLFTPVMMKT  
TDMLDTSLEPVTTSPPSMNTSDESLATSKATMETEAIQLSENTAVTQMGTISARQEFYS  
SYPGLPEPSKVTSPVVTSSSTIKDIVSTTIPASSEITRIEMESTSTLTPTPRETSTSQEIH  
SATKPSTVPYKALTSATIEDSMTQVMSSSRGPPDQSTMSQDISTEVITRLSTSPIKTES  
TEMTITTQTGSPGATSRGTLTLDLDTSTTFMSGTHSTASQGFHSQMTALMSRTPGEVPWLS  
HPSVEEASSASFSLSPPVMTSSSPVSTLPDSIHSSSLPVTSLLTSGLVKTTTELLGTSS  
PETSSPPNLSSTSAEILATTEVTTDTEKLEMTNVVTSGYTHESPSSVLADSVTTKATSSM  
GITYPTGDTNVLSTPAFSDTSRIQTKSKLSLTPGLMETSISEETSSATEKSTVLSSVPT  
GATTEVSRTEAISSRSTIPGPAQSTMSSDTSMETITRISTPLTRKESTDMAITPKTGPS  
GATSQGTFTLDSSSTASWP GTHSATTQRFPRSVVTT PMSRGPEDVSWPSPLSVEKNSPPS  
SLVSSSSVTSPPLYSTPSSGSSHPVPVTSLFTS IMMKATDMLDASLEPETTSAPNMNI  
TSDESLAASKATTETEAIHFV FENTAASHVETTSATEELYSSSPGFSEPTKVISPVVTTSS  
IRDNMVSTTMPGSSGITRIEIESMSSLTPGLRETRTSQDITSSSTETSTVLYKMPGATPE  
VSRTEVMPSRSTIPGPAQSTMSLDISDEVVTRLSTSPIMTESAEITITTQTGYSLATSQ  
VTLPLGTSMTFLSGTHSTMSQGLSHSEMNLMSRGPESLSWTSPRFVETTRSSSSLTSLP  
LTTSLSPVSSTLDDSSPSPLPVTSLILPGLVKTTTEVLDTSSSEPKTSSSPNLSSTSV EIP  
ATSEIMTDTEKIHPSNNTAVAKVRTSSSVHESHSSVLADSETTITIPSMGITSAVEDTTV

FTSNPAFSETRRIPTTEPTFSLTPGFRSTSEETTSITETSAVLPVGPVTSATTEVSMTEI  
 MSSNRTHIPDSQSTMSPIITEVITRLSSSSMMSESTQMTITTOKSSPGATAQSTLTLA  
 TTTAPLARHSTVPPRFLHSEMTTLMRSRSPENPSWKSSPFVEKTSSSSSLLSLPVTTSPS  
 VSSTLPQSIPISSSFVSTSLTPGMVKTDTSTEPGTSLSPNLSGTSVEILAASEVTTDTE  
 KIHPSSMAVTNVGTTSSGHELYSSVSIHSEPSKATYPVGTTPSSMAETSISTSMANFET  
 TGFEAEPFSLTSGLRKTNMSLDTSSVTPNTNPSSPGSTHLLQSSKTDFTSSAKTSSPDW  
 PPASQYTEIPVDIITPFNASPSITESTGITSPFESRFTMSVTESTHHLSTDLLPSAETIS  
 TGTVMPSLSEAMTSFATTGVPRAISGSGSPFSRTESGPGDATLSTIAESLPSSTPVFPSS  
 STFTTTDSSTIPALHEITSSSATPYRVDTSLGTESSTTEGRLVMVSTLDTSSQPGRSTSS  
 PILDTRMTESVELGTVTSAYQVPSLSTRLTRTDGIMEHI TKIPNEAAHRTIRPVKGPQT  
 STSPASPKGLHTGGTKRMTTTTALKTTTALKTTSRATLTSVYPTLGLTLPNLSMQ  
 MASTIPTEMMITPYVFPDVPETSSSLATSLGAETSTALPRTTPSVFNRESETTASLVS  
 SGAERSPVIQTLDVSSSEPDITASWVIHPAETIPTVSKTTPNFFHSELDTVSSSTATSHGA  
 DVSSAIPTNISPELDTLPLVTISGTDSTTFPTLTKSPHETETRTTWLTHPAETSSTI  
 PRTIPNFSSHESDATPSIATSPGAETSSAIPIMTVSPGAEDLVTSQVTSSGTRNMTIPT  
 LTLSPGEPKTIASLVTHPEAQTSSAIPSTISPAVSRVLSMVTSLAAKTSTNRLTNS  
 PGEPATTVSLVTHSAQTSPTVPWTTISFFHKSDDTTPSMTTSHGAESSAVPTPTVSTEV  
 PGVVTPLVTSRRAVISTTIPILTLSPGEPETTPSMATSHGEEASSAIPPTVSPGVPGVV  
 TSLVTSRRAVSTTIPILTFSLGEPETTPSMATSHGTEAGSAVPTVLPEVPGMVTSLVAS  
 SRAVSTTLPTLTLSPGEPETTPSMATSHGAEASSTVPTVSPVPGVVTSLVTSSSGVNS  
 TSIPTLILSPGELETPSMATSHGAEASSAVPTPTVSPGVSGVVTPLVTSRRAVSTTIP  
 ILLTSSSEPETTPSMATSHGVEASSAVLTVSPEVPGMVTFVLVTSRRAVSTTIPTLTSS  
 DEPETTTSLVTHSEAKMISAIPTLGVSPVQGLVTSLVTSSSGSETSAFNSLTVASSQPET  
 IDSWAHPGTEASSVPTLVSTGEPFTNISLVTHPAESSSTLPRTTSRFHSSELDTMPS  
 TVTSPEAESSAISTTISPGIPGVLTSLVTSSSGRDISATFPTVPESPHSEATASWVTHP  
 AVTSTTVPRTPNYSHSEPDTPSIATSPGAEATSDFPTITVSPDVPDMVTSQVTSSGTD  
 TSITIPTLTLSSGEPETTTSFITYSEHTSSAIPTLFVSPDASKMLTSLVISSGTDSTT  
 FPTLTETPYEPETTAIQLIHPAETNTMVPRTPKFSHKSDDTLPVAITSPGPEASSAVS  
 TTTISPMSDLVTSLVPSGGTDTSTTFPTLSETPYEPETTATWLTHPAETSTTVSGTIPN  
 FSHRGSDTAPSMVTSPGVDTRSGVPTTTIPPSIPGVVTSQVTSSATDTSTAIPTLTPSPG  
 EPETTASSATHPGTQTGFVPIRTVPSSEPDYMASWVTHPPQTSTPVSRRTSSFSHSSPD  
 ATPVMATSPRTEASSAVLTTISPGAPEMVTSQITSSGAATSTTVPTLTHSPGMPETTALL  
 STHPRTESTKTFPASTVFPQVSETTASLTIRPGAETSTALPTQTSSSLFTLLVGTSRVD  
 LSPTASPGVSAKTAPLSTHPGTETSTMIPTSTLSLGLLETTGLLATSSSAETSTSTLTLT  
 VSPAVSGLSSASITTDKPQTVTSWNTETSPTSPTSVPPEPFRSRTVGTMTLIPSEMPTP  
 KTSHGEGVSPTTILRRTMVEATNLATGSSPTVAKTTTTFNLAGSLFTPLTTPGMSTLA  
 SESVTSRTSYNHRSWISTSSYNRRYWPATSTPVTSTFSPGISTSSIPSSAATVFPFV  
 PFTLNFTITNLQYEDMRHPGSRKFNATERELQGLLKPLFRNSSLEYLYSGCRLASLRPE  
 KDSSATAVDAICTHRPDPEDLGLDRERLYWELSNLTNGIQELGPYTLDRNSLYVNGFTHR  
 SSMPTTSTPGTSTVDVGTSGTPSSSPSTTAGPLLMPTLNFTITNLQYEDMRRTGSRK  
 FNTMESVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLTLRPEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGLN  
 REQLYWELSKLTNDIEELGPYTLDRNSLYVNGFTHQSSVSTSTPGTSTVDLRTSGTPSS  
 LSSPTIMAAGPLLVPTLNFTITNLQYGEDMHPGSRKFNTERVLQGLLGPFKNTSVG  
 PLYSGCRLTSLRSEKDGAATGVDAICIHHLDPKSPGLNRERLYWELSQLTNGIKELGPYT  
 LDRNSLYVNGFTHRTSVPTTSTPGTSTVDLGTSGTPFSLPSPATAGPLLVFTLNFTITN

LKYEDMHRPGSRKFNTTTERVLQTLVGPMPFKNTSVGLLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDA  
ICTHRLDPKSPGVDRQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHWIPVPTSSPTG  
TSTVDLGSSTPSSLPSPSATSATAGPLLVPFTLNFTITNLKYEDMHCPGSRKFNTTTERVLQ  
SLLGPMFKNTSVGPLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGVDRQLYWEL  
QLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHQTSAPNTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPSATSAGP  
LLVPFTLNFTITNLQYEDMHHPGSRKFNTTTERVLQGLLGPMPFKNTSVGLLYSGCRLTLL  
RPEKNGAATGMDAICSHRLDPKSPGLNREQLYWELSQLTHGIKELGPYTLDRNSLYVNGF  
THRSSVAPTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPPTAVPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMRHPG  
SRKFNTTTERVLQGLLGPMPFKNTSVGPLYSGCRLISLRSEKDGAATGVDAICTHHLNQPSP  
GLDREQLYWQLSMTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSGLTSTPWTSTVDLGTSGT  
PSPVPSPTAGPLLVPFTLNFTITNLQYEDMHRPGSRKFNTATERVLQGLLSPIFKNSSV  
GPLYSGCRLTSLRPEKDGAATGMDAVCLYHPNPKRPGLDREQLYWELSQLTHNITELGPY  
SLDRDSLYVNGFTHQNSVPTTSTPGTSTVYWATTGTPSSFPGHTEPGPLLIPTTFNFTIT  
NLHYEENMQHPGSRKFNTTTERVLQGLLKPFLKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKQEAATGVD  
TICTHRVDPGPGLDREQLYWELSQLTNSITELGPYTLDRDSLYVNGFNPWSSVPTTSTP  
GTSTVHLATSGTPSSLPGHATAPVPLLIPTFLNFTITNLHYEENMQHPGSRKFNTTTERVLQ  
GLLKPFLKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKHGAATGVDAICTLRLDPTGPGLDREQLYWEL  
QLTNSVTELGPYTLDRDSLYVNGFTHRSSVPTTIPGTSAVHLETSGTPASLPGHATAPGP  
LLVPFTLNFTITNLQYEDMHRPGSRKFNTTTERVLQGLLKPFLKNTSVGPLYSGCRLTLL  
RPEKGAATGVDTICTHRLDPLNPGLDREQLYWELSKLTRGIIELGPYLLDRGSLYVNGF  
THRNFVPTSTPGTSTVHLGTSETPSSLPRIVPGPLLVPFTLNFTITNLQYEBAMRHPG  
SRKFNTTTERVLQGLLRPLFKNTSIGPLYSSCRLTLLRPEKDKAATRVDAICTHHPDPQSP  
GLNREQLYWELSQLTHGITELGPYTLDRDSLYVDGFTHWSPIPTTSTPGTSTIVNLGTSGI  
PPLPETTATGPLLVPFTLNFTITNLQYEBAMRHPGSRKFNTITNESVLQGLLKPFLKNTSV  
GPLYSGCRLTLLRPEKDVATRVDICTHRPDKIPGLDRQQLYWELSQLTHSITELGPY  
TLDRDSLYVNGFTQRSSVPTTSTPGTFTVQPETSETPSSLPGPATATGPVLLPFTLNFTIT  
NLQYEDMHRPGSRKFNTTTERVLQGLLMPFLKNTSVSSLYSGCRLTLLRPEKDGAATRV  
AVCTHRPDKSPGLDRERLYWELSQLTHGITELGPYTLDRHSLYVNGFTHQSSMTTTRTP  
DTSTMHLATSRTPASLSGPTTASPLLVLFTINFTITNLRYEENMHHPGSRKFNTTTERVLQ  
GLLRPVFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGAATKVDICTYRPDKSPGLDREQLYWEL  
QLTHSITELGPYTLDRDSLYVNGFTQRSSVPTTIPGTPVDLGTSGTPVSKPGPSAASP  
LLVLFTLNFTITNLRYEENMQHPGSRKFNTTTERVLQGLLRSLFKNTSVGPLYSGCRLTLL  
RPEKDGATGVDAICTHHPDKSPRLDREQLYWELSQLTHNITELGPYALDNDSLFVNGF  
THRSSVSTTSTPGTPTVYLGASKTPASIFGPSAASHLLILFTLNFTITNLRYEENMWPGS  
RKFNNTTTERVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGEATGVDAICTHRPDPGPG  
LDREQLYLELSQLTHSITELGPYTLDRDSLYVNGFTHRSSVPTTSTGVVSEBFTLNFTIT  
NNLRYMADMGQPGSLKFNITDNVMQHLLSPLFQRSSLGARYTGCRVIALRSVKNGAETRV  
DLLCTYLQPLSGPLPIKQVFHELSSQTHGITRGLPYSLDKDSLYLNGYNEPGPDEPPTT  
PKPATTFLPPLSEATTAMGYHLKTLTLNFTISNLQYSPDMGKSATFNSTEGVLQHLLRP  
LFQKSSMGPFFYLGQQLISLRPEKDGAATGVDTTCTYHPDPVGPGLDIQQLYWELSQLTHG  
VTQLGFYVLDLDRSLFINGYAPQNLISIRGEYQINFHIVNWNLSNPDPTSSEYITLLRDIQD  
KVTTLYKGSQHLDTFRFCLVNTLMDSVLVTVKALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLNASPHW  
LGSTYQLVDIHVTEMESSVYQPTSSSSTQHLYNFTITNLQYSPDMGKSATFNSTEGVLQHLLRP  
IEDALNQLFRNSSIKSYFSDCQVSTFRSVPNRHHTGVDSL CNFSP LARRVDRVAIYEEFL  
RMTRNGTQLQNFLLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNLDFPFAVILIGLAGLGLITCLIC  
GVLVTTTRRRKKEGEYNVQQQCPGYYSQSHLDLEDLQ

(SEQ ID NO:4)

- 5 (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina, n.º de registro GenBank NM\_005823 Yamaguchi, N., et al. *Biol. Chem.* 269 (2), 805-808 (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 (20):11531-11536 (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 (1):136-140 (1996), *J. Biol. Chem.* 270 (37):21984-21990 (1995)); documento

WO2003101283 (Reivindicación 14); (documento WO2002102235 (Reivindicación 13; Página 287-288); documento WO2002101075 (Reivindicación 4; Página 308-309); documento WO200271928 (Página 320-321); documento WO9410312 (Página 52-57);

Referencias cruzadas: MIM:601051; NP\_005814.2; NM\_005823\_1

5 622 aa

MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPLDGVLANPPNISS  
 LSPRQLLGFPCAIEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPL  
 DLLLFLNPDADFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLPAALACWGVRSLLSEA  
 DVRALGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGPLDQDQOEAAARAALQGGGPPYGGPSTW  
 SVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQSSRDPSWRQPERTILRPRFRREVEKT  
 ACPGSKKAREIDESLIIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDLEY  
 PQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLETALKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFVK  
 GRGQLDKDITLDTLTAFFYPGYLCSLSPEELSSVPPSSIWAVERPQDLDTCDPRQLDVLVYKA  
 RLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPITVAEVQ  
 KLLGPHVEGLKAERHRPVRDWILRQRQDDLDLTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGT  
 PCLLGGPVLTVLALLLASTLA

(SEQ ID NO:5)

10 (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIb, SLC34A2, familia 34 del transportador de soluto (fosfato de sodio), miembro 2,  
 transportador 3b de fosfato dependiente del sodio de tipo II, n.º de registro GenBank NM\_006424, J. Biol. Chem. 277  
 (22):19665-19672 (2002), Genomics 62 (2):281-284 (1999), Feild, J.A., et al. (1999) Biochem. Biophys. Res.  
 15 Commun. 258 (3):578-582); documento WO2004022778 (Reivindicación 2); documento EP1394274 (Ejemplo 11);  
 documento WO2002102235 (Reivindicación 13; página 326); documento EP875569 (Reivindicación 1; Página 17-  
 19); documento WO200157188 (Reivindicación 20; página 329); documento WO2004032842 (Ejemplo IV);  
 documento WO200175177 (Reivindicación 24; Página 139-140);  
 Referencias cruzadas: MIM:604217; NP\_006415.1; NM\_006424\_1  
 20 690 aa

MAPWPELGDAQPNPDKYLEGAAGQQPTAPDKSKETNKTDNTEAPVTKIELLPSYSTATLI  
 DEPTVEVDDPWNLP TLQDSGIKWSE RDTKGKILCFFQIGRLILLGLFLYFFVCSLDILSS  
 AFQLVGGKMAGQFFSNSSIMSNPLLGLVIGVLVTVLVQSSSTSTSI VVSMVSSSLLTVRA  
 AIP IIMGANIGTSITNTIVALMQVDRSEFRRAFAGATVHDFFNWLSVLVLLPVEVATHY  
 LEIITQLIVESFHFKNGEDAPDLLKVITKPF TKLIVQLDKKVISQIAMNDEKAKNKSLVK  
 IWCKTFTNKTQINVTVPSTANCTSPSLCWT DGIQNWTMKNV TYKENIAKQHI FVNFHLP  
 DLAVGTILLILSLLVLCGCLIMIVKILGSVLKGQVATVIKKTINTDFPPFFAWLTGYLAI  
 LVGAGMTFIVQSSSVFTSALTPLIGIGVITIERAYPLTLG SNIGTTTTAILAALASPGNA  
 LRSSLQIALCHFFFNISGILLWYPIPFTRLP IIRMAKGLGNI SAKYRWFVAVFYLI IFFFLI  
 PLTVFGLSLAGWRVVLVGVGVVVFII ILVLCRLQLQSRCPRVLPKKLQNNWFLPLWMRSL  
 KPWDVVSKFTGCFQMRCYCCRVCCRACCLLCGCPKCCRC SKCEDLEEAQEGQDVPVK  
 APETFDNITISREAQGEVPASDSKTECTAL

(SEQ ID NO:6)

25 (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete  
 repeticiones de tromboespondina (tipo 1 y análogo al tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico  
 corto, (semaforina) 5B, n.º de registro GenBank AB040878,  
 Nagase T., et al. (2000) DNA Res. 7 (2): 143-150); documento WO2004000997 (Reivindicación 1); documento  
 30 WO2003003984 (Reivindicación 1); documento WO200206339 (Reivindicación 1; página 50); documento  
 WO200188133 (Reivindicación 1; Página 41-43, 48-58); documento WO2003054152 (Reivindicación 20); documento  
 WO2003101400 (Reivindicación 11); Registro: Q9P283; EMBL; ABO40878; BAA95969.1. Genew; HGNC: 10737;  
 1093 aa



MVLAGPLAVSLLLPSLTLVSHLSSSQDVSSEPSSEQQLCALSKHPTVAFEDLQPWVSNF  
 TYPGARDFSQLALDPSGNQLIVGARNYLFRLSLANVSLLOATEWASSEDTRRSCQSKGKT  
 EEECCQNYVRVLIIVAGRKVFMCGTNAFSPMCTSRQVGNLSRTTEKINGVARCPYDPRHNST  
 AVISSQGELYAATVIDFSGRDPAIYRSLGSGPPLRTAQYNSKWLNEPNFVAAYDIGLFAY  
 FFLRENAVEHDCGRTVYSRVARVCKNDVGGFRFLLEDITWTFMKARLNCSSRPEVFPFYNE  
 LQSAFHLPEQDLIYGVFTTNVNSIAASAVCAFNLSAISQAFNGPFRYQENPRAAWLP IAN  
 PIPNFQCGTLPETGPNENLTERSLQDAQRLFLMSEAVQPVTPEPCVTQDSVRFSHLVVDL  
 VQAKDTLYHVLYIGTESGTLKALSTASRSLHGICYLEELHVLPPGRREPLRSLRILHSAR  
 ALFVGLRDGVLRVPLERCAAYRSQGA CLGARDPYCGWDGKQQRCTLEDSSNMSLWTQNI  
 TACPVRNVTRDGGFGPWSWPQCEHLDGDNSSGCLCRARSCDSRPRCGGLDCLGPAIHI  
 ANCSRNGAWTPWSSWALCSTSCGIGFQVRQRSCSNPAPRHGGRI CVGKSREERFCNENTP  
 CPVPIFWASWGSWSKCSSNCGGMQSRRRACENGNSCLGCGVEFKTCNPEGCPEVRRNTP  
 WTPWLPVNVTVQGGARQEQRFRTCRAPLADPHGLQFGRRTTETRTCPADGSGSCDTDALV  
 EDLLRSGSTSPHTVSGGWAAWGPWSSCSRDCLELGFVRVRKRTCTNPEPRNGGLPCVGDAAE  
 YQDCNPQACPVRGAWSCWTSWSPCSASCGGGHYQRTRTSCTSPAPSPGEDI CLGLHTEEAL  
 CATQACPEGWSPWSEWSKCTDDGAQSRSRHCEELLPGSSACAGNSSQSRPCPYSEIPVIL  
 PASSMEEATGCAGFNLIHLVATGISCFLGSGLLTLAVYLSQCQCQRQSQBESTLVHPATPN  
 HLHYKGGGTPKNEKYTPMEFKTLNKNLI PDDRANFYPLQQTNVYTTTYYPSPLNKHSFR  
 PEASPGQRCPNS

5 (SEQ ID NO:7)

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN ADNc 2100050C12, RIKEN ADNc 2700050C12 gen, n.º de registro GenBank AY358628); documento US2003129192 (Reivindicación 2); documento US2004044180 (Reivindicación 12); documento  
 10 US2004044179 (Reivindicación 11); documento US2003096961 (Reivindicación 11); documento US2003232056 (Ejemplo 5); documento WO2003105758 (Reivindicación 12); documento US2003206918 (Ejemplo 5); documento EP1347046 (Reivindicación 1); documento WO2003025148 (Reivindicación 20); Referencias cruzadas: GI:37182378; AAQ88991.1; AY358628\_1  
 141 aa

15

MWVLGIAATFCGLFLLPGFALQIQCYQCEEFQLNNDCSSPEFIVNCTVNVQDMCQKEVME  
 QSAGIMYRKSCASSAACLIASAGYQSFCSPGKLSVCI SSCNTPLCNGPRPKRGSSASA  
 LRPGLRRTTILFLKLLALFSAHC

(SEQ ID NO:8)

(9) ETBR (Receptores de tipo B de la endotelina, n.º de registro GenBank AY275463); Nakamuta M., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 248-255, 1991; Arai H., et al. *Jpn. Circ. J.* 56, 1303-1307, 1992; Arai H., et al. *J. Biol. Chem.* 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 656-663, 1991; Elshourbagy N. A., et al. *J. Biol. Chem.* 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., et al. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., et al. *Gene* 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C., et al. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., et al. *Biol. Chem.* 272, 21589-21596, 1997; Verheij J. B., et al. *Am. J. Med. Genet.* 108,223-225,2002; Hofstra R. M. W., et al. *Eur. J. Hum. Genet.* 5, 180-185,1997; Puffenberger E. G., et al. *Cell* 79, 1257-1266, 1994; Attie T., et al, *Hum. Mol. Genet.* 4, 2407-2409, 1995; Auricchio A., et al. *Hum. Mol. Genet.* 5:351-354, 1996; Amiel J., et al. *Hum. Mol. Genet.* 5, 355-357, 1996; Hofstra R. M. W., et al. *Nat. Genet.* 12, 445-447, 1996; Svensson P. J., et al. *Hum. Genet.* 103, 145-148, 1998; Fuchs S., et al *Mol. Med.* 7, 115-124,2001; Pingault V., et al. (2002) *Hum. Genet.* 111, 198-206; documento WO2004045516 (Reivindicación 1); documento WO2004048938 (Ejemplo 2); documento WO2004040000 (Reivindicación 151); documento WO2003087768 (Reivindicación 1); documento WO2003016475 (Reivindicación 1); documento WO2003016475 (Reivindicación 1); documento WO200261087 (Fig 1); documento WO2003016494 (Fig 6); documento WO2003025138 (Reivindicación 12; página 144); documento WO200198351 (Reivindicación 1; Página 124-125); documento EP522868 (Reivindicación 8; Fig 2); documento WO200177172 (Reivindicación 1; Página 297-299); US2003109676; documento US6518404 (Fig 3); documento US5773223 (Reivindicación 1a; Col 31-34); WO2004001004;

35

442 aa

MQPPPSLCGRALVALVLACGLSRIWGEERGFPDRATPLLQTAEIMTPPTKTLWPKGSNA  
 SLARSLAPAEVPGKDRTAGSPPTISPPPCQGPPIEIKETFKYINTVVSCLVFLVGIIGN  
 TLLRIYKKNKMRNGPNILIASLALGDLHIVIDIPINVYKLLAEDWPPGAEMCKLVFFI  
 QKASVGITVLSLICALSIDRYRAVASWSRIKIGIVPKWTAVEIVLIWVVSVLAVPEAIGF  
 DIIITMDYKGSYLRI CLLHPVQKTA FMQFYKTAKDWLWLSFYFCLPLAITAFFYTLMTCEM  
 LRKKSQMIALNDHLKQRREVAKTVFCLVLFALCWLPLHLSRILKLTLYNQNDPNRCEL  
 LSFLLVLDYIGINMASLNSCINPIALYLVS KRFKNCFKSCLCWCQSFEEKQSLEEKQSC  
 LKFKANDHGYDNFRSSNKYSSS

5 (SEQ ID NO:9)

(10) MSG783 (RNF124, proteína teórica FLJ20315, n.º de registro GenBank NM\_017763);  
 documento WO2003104275 (Reivindicación 1); documento WO2004046342 (Ejemplo 2); documento  
 WO2003042661 (Reivindicación 12); documento WO2003083074 (Reivindicación Página 61); documento  
 10 WO2003018621 (Reivindicación 1); documento WO2003024392 (Reivindicación 2; Fig 93); documento  
 WO200166689 (Ejemplo 6); Referencias cruzadas: LocusID:54894; NP\_060233.2; NM\_017763\_1  
 783 aa

MSGGHQLQLAALWPWLLMATLQAGFGRTGLVLA AVESERSAEQKAIIRVIPLKMDPTGK  
 LNLTLLEGVFAGVAEITPAEGKLMQSHPLYLCNASDDDNLEPGFISIVKLESPRRAPRCL  
 SLASKARMAGERGASAVLFDITEDRAAAEQLQQLGLTWPVVLIWGNDAEKLMFVYKNQ  
 KAHVRIELKEPPAWPDYDVWILMTVVGTIFVILASVLRIRCRPRHSRDPDPLQORTAWAI  
 SQLATRRYQASCRQARGEPDSSGSSSAPVCAICLEEFSEGQELRVISCLHEFHRNCVD  
 PWLHQHRTCP LCVFNITEGDSFSQSLGPSRSYQEPGRRLHLIRQHPGHAHYHLPAAYLLG  
 PRSAAVARPPRPFPFLPSQEPGMGRHHRFPRAAHPRAPGEQQRLAGAHQHPYAQGWGMSH  
 LQSTSQHAAACPVPLRRARPPDSSSGSGESYCTERSGYLADGPASDSSSGPCHGSSSDSVV  
 NCTDISLQGVHGSSSTFCSSLSDFDPLVYCS PKGDPQRVDMQPSVTSRPRSLDSVVPTG  
 ETQVSSHVHYHRHRHHYKRFQWHGRKPGPETGVPQSRPPIPRTPQPEPPSPDQQVVG  
 SNSAAPSGRLSNPQCPRALPEFAPGPVDASSICPSTSSLFNLQSSLSARHPQRKRRGGP  
 SEPTPGSRPQDATVHPACQIFPHYTPSVAYPWSPEAHPLICGPPGLDKRLLPETPGPCYS  
 NSQPWWLCLTPRQPLEPHPPGEGPSEWSSDTAEGRPCPYPHCQVLSAQPGSEEBEELCE  
 QAV

15 (SEQ ID NO:10)

(11) STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata,  
 proteína 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial seis transmembrana de la próstata 2, proteína seis  
 20 transmembrana de la próstata, n.º de registro GenBank AF455138,  
 Lab. Invest. 82 (11):1573-1582 (2002)); WO2003087306; documento US2003064397 (Reivindicación 1; Fig 1);  
 documento WO200272596 (Reivindicación 13; Página 54-55); documento WO200172962 (Reivindicación 1; Fig. 4B);  
 documento WO2003104270 (Reivindicación 11); documento WO2003104270 (Reivindicación 16); documento  
 US2004005598 (Reivindicación 22); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento US2003060612  
 25 (Reivindicación 12; Fig 10); documento WO200226822 (Reivindicación 23; Fig 2); documento WO200216429  
 (Reivindicación 12; Fig 10);  
 Referencias cruzadas: GI:22655488; AAN04080.1; AF455138\_1  
 490 aa



MESISMMGSPKSLSETVLPNGINGIKDARKVTVGVIGSGDFAKSLTIRLIRCGYHVVIGS  
 RNPKFASEFFPHVVDVTHHEDALTKTNIIFVAIHREHYTSLWDLRHLVVGKILIDVSNM  
 RINQYPESNAEYLASLFPDSLIVKGFNVVSAWALQLGPKDASRQVYICSNNIQARQQVIE  
 LARQLNFIPIIDLGLSSAREIENLPLRLFTLWRGPVVVAISLATFFFLYSFVRDVIHPYA  
 RNQOSDFYKIPIEIVNKTLPIVAITLLSLVYLAGLLAAAYQLYGYTKYRRFPPWLETWLQ  
 CRKQLGLLSFFFAMVHVAYSCLPMRRSERYLFLNMAYQQVHANIENSWNEEEVWRIEMY  
 ISFGIMSLGLLSLLAVTSPSVSNALNWREFSFIQSTLGYVALLISTFHVLIYGWKRAFE  
 EEEYRFYTPPNFVLALVLPISIVILGKIILFLPCISQKLKRIKKGWEKSQFLEEGIGGTIP  
 HVSPERVTVM

(SEQ ID NO:11)

- 5 (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, receptor potencial transitorio del canal de cationes, subfamilia M, miembro 4, n.º de registro GenBank NM\_017636  
 Xu, X.Z., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98 (19):10692-10697 (2001), Cell 109 (3):397-407 (2002), J. Biol. Chem. 278 (33):30813-30820 (2003)); documento US2003143557 (Reivindicación 4); documento WO200040614 (Reivindicación 14; Página 100-103); documento WO200210382 (Reivindicación 1; Fig 9A); documento  
 10 WO2003042661 (Reivindicación 12); documento WO200230268 (Reivindicación 27; página 391); documento US2003219806 (Reivindicación 4); documento WO200162794 (Reivindicación 14; Fig 1A-D);  
 Referencias cruzadas: MIM:606936; NP\_060106.2; NM\_017636\_1  
 1214 aa

MVVPEKEQSWIPKIFKKKTCTTFIVDSTDPGGTLCQCGRPRTAHPAVAMEDAFGAAVVTV  
 WSDAHTTEKPTDAYGELDFTGAGRKHSNFLRLSDRTDPAAVYSLVTRTWGFRAPNLVVS  
 VLGSGGGPVLQTLWLDLLRRGLVRAAQSTGAWIVTGGLHTGIGRHVGVAVRDHQMSTGG  
 TKVVAMGVAPWGVVRNRDTLINPKGSFPARYRWRGDPEDGVQFPLDYNYSAFFLVDDGTH

15

GCLGGENRFRRLRESYISQKKTGVGGTGIDIPVLLLLIDGDEKMLTRIENATQAQLPCLL  
 VAGSGGAADCLAETLEDTLAPGSGGARQGEARDRI RRRFFPKGDLEVLQAQVERIMTRKEL  
 LTVYSSSEDGSEEFETIVLKALVKACGSSEASAYLDELRLAVAWNRVDIAQSELFRGDIQW  
 RSFHLEASLMDALLNDRPEFVRLLI SHGLSLGHFLTPMRLAQLYSAAPSNLIRNLLDQA  
 SHSAGTKAPALKGGAAELRPPDVGHVLRMLLGKMCAPRYPSGGAWDPHPGQGFGESMYLL  
 SDKATSPLSLDAGLGQAPWSDLLLWALLLNRAQMAMYFWEMGSNAVSSALGACLLLRVMA  
 RLEPDAEEAARRKDLAFKFEFGMGVDFGECYRSSEVRAARLLLLRRCPWGDATCLQLAMQ  
 ADARAFFAQDGVQSLLTQKWGDMASTTPIWALVLAFFCPPLIYTRLITFRKSEEEPTRE  
 ELEFDMDSVINGEGPVGTADPAEKTPLGVPRQSGRPGCCGGRGRRCLRRWFHFWGAPV  
 TIFMGNVVSYLLFLLLFSRVLLVDFQPAPPGSLELELLYFWAFTLLCEELRQGLSGGGGSL  
 ASGGPGPGHASLSQRLRLYLADSWNQCDLVALTCFLLGVGCRITPGLYHLGRTVLCIDFM  
 VFTVRLLLHIFTVNKQLGPKIIVISKMMKDVFFFLFPLGVWLVAYGVATEGLLRPRDSDFP  
 SILRRVFYRYPYLQIFGQIPQEDMDVALMEHSNCSSEPGFWAHPGAQAGTCVSYANWL  
 VLLLVIFFLLVANILLVNLIIAMFSYTFGKVQGNSDLYWKAQRYRLIREFHSR PALAPFFI  
 VISHLRLLLLRQLCRRRPRSPQPSSPALEHFRVYLSKEAERKLLTWESVHKENFLLARARDK  
 RESDSERLKRSTSQKVDLALKQLGHI REYEORLKVLEREVQQCSRVLGWVAEALSRSALLP  
 PGGPPPPDLPGSKD

(SEQ ID NO:12)

- 20 (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, n.º de registro GenBank NP\_003203 o NM\_003212,  
 Ciccodicola, A., et al. EMBO J. 8 (7):1987-1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555-565 (1991)); documento

US2003224411 (Reivindicación 1); documento WO2003083041 (Ejemplo 1); documento WO2003034984 (Reivindicación 12); documento WO200288170 (Reivindicación 2; Página 52-53) documento WO2003024392 (Reivindicación 2; Fig 58); documento WO200216413 (Reivindicación 1; Página 94-95, 105); documento WO200222808 (Reivindicación 2; Fig 1) documento US5854399 (Ejemplo 2; Col 17-18); documento US5792616 (Fig 2);

Referencias cruzadas: MIM: 187395; NP\_003203.1; NM\_003212\_1  
188 aa

MDCRKMARFSYSVIWIMAIKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGLAFRDDSINWPQEEPAIR  
PRSSQRVPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSGFCACPPSFYGRNCEHDVRKENCOSVPH  
DTWLPKCKSLCKCWHGQLRCFFQAFLPGCDGLVMDEHLVASRTPPELPPSARTTTFMLVGI  
CLSIQSY

(SEQ ID NO:13)

(14) CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus de Epstein Barr) o Hs.73792 n.º de registro GenBank M26004,

Fujisaku et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264 (4):2118-2125; Weis J.J., et al. *J. Exp. Med.* 167, 1047-1066, 1988; Moore M., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 9194-9198, 1987; Barel M., et al. *Mol. Immunol.* 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 5639-5643, 1986; Sinha S. K., et al. (1993) *J. Immunol.* 150, 5311-5320; documento WO2004045520 (Ejemplo 4); documento US2004005538 (Ejemplo 1); documento WO2003062401 (Reivindicación 9); documento WO2004045520 (Ejemplo 4); documento WO9102536 (Fig 9.1-9.9); documento WO2004020595 (Reivindicación 1); Registro: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.

1033 aa

MGAAGLLGVFLALVAPGVLGISCGSPPPILNGRISYYSTPIAVGTVIRYSCSGTFRLLIGE  
KSLLCITKDKVDGTWDPKPAKCEYFNKYSSCPEPIVPGGYKIRGSTPYRHGDSVTFACKT  
NFSMNGNKSVMWCQANNMWGPTRLPTCVSVFPLECPALPMIHNGHHTSENVGSIAPGLSVT  
YSCESGYLLVGEKIINCLSSGKWSAVPPTCEEARCKSLGRFPNGKVKEPPIILRVGV TANF  
FCDEGYRLQGGPPSSRCVIAQGQVAWTKMPVCEEIIFCPSPPPILNGRHIGNSLANVSYGSI  
VTYTCDDPDEEGVNFILIGESTLRCTVDSQKTGTWSGPAPRCELSTSAVQCPHPQILRGR  
MVSGQKDRYTYNDTVIFACMFGFTLKGSKQIRCNAQGTWEP SAPVCEKECQAPPNINLNGQ  
KEDRHMVRFDPGTSIKYSCNPGYVVLVEESI QCTSEGVTWPPVPQCKVAACEATGRQLLT  
KPQHQFVRPDVNSSCGEGYKLSGSVYQECQGTIPWFMEIRLCKEITCPPPPVIYNGAHTG  
SSLEDFPYGTTVTYTCNPGPERGVEFSLIGESTIRCTSNDQERGTWSGPAPLCKLSLLAV  
QCSHVHIANGYKISGKEAPYFYNDTVTFKCYSGFTLKGSSQIRCKADNTWDPEIPVCEKE  
TCQHVRQSLQELPAGSRVELVNTSCQDGYQLTGHAYQMCQDAENGIWFKKIPLCKVIHCH  
PPPVI VNGKHTGMMAENFLYGNEVSYECDQGFYLLGEKQLQCRSDSKGHGSGWSPQCL  
RSPPVTRCPNPEVKHGYKLNKTHSAYSHNDIVYVDCNPGFIMNGSRVIRCHTDNTWVPGV  
PTCIKKAFIGCPPPKTPNGNHTGGNIARFSPGMSILYSCDQGYLLVGEALLLCTHEGTW  
SQPAPHCKEVNCS SPADMDGIQKGLEPRKMYQYGA VVTLECEDGYMLEGSPQSQCQSDHQ  
WNPPLAVCRSRSLAPVLCGIAAGLILLTFLIVITLYVISKHRERNYYTDTSQKEAFHLEA  
REVYSVDPYNPAS

(SEQ ID NO:14)

(15) CD79b (CD79B, CD79β, Igb (inmunoglobulina beta-asociada), B29, n.º de registro GenBank NM\_000626 o 11038674, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2003) 100 (7):4126-4131, *Blood* (2002) 100 (9):3068-3076, Muller et al. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22 (6):1621-1625); documento WO2004016225 (reivindicación 2, Fig 140); WO2003087768, documento US2004101874 (reivindicación 1, página 102); documento WO2003062401 (reivindicación 9); documento WO200278524 (Ejemplo 2); documento US2002150573 (reivindicación 5, página 15); US5644033; documento WO2003048202 (reivindicación 1, páginas 306 y 309); documento WO 99/558658, documento US6534482 (reivindicación 13, Fig 17A/B); documento WO200055351 (reivindicación 11, páginas 1145-1146);

Referencias cruzadas: MIM: 147245; NP\_000617.1; NM\_000626\_1  
229 aa

MARLALSPVPSHWMVALLLLLSEAEPVPAARSEDRYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT  
VKMHCYMNSASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIREFDNGIY  
FCQQKCNNTSEVYQGCGETELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGI IMIQTLIIILFIIIVPIFL  
L.LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

5  
(SEQ ID NO:15)

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (dominio SH2 que contiene la proteína de anclaje a fosfatasa 1a), SPAP1B, SPAP1C, n.º de registro GenBank NM\_030764,  
10 Genome Res. 13 (10):2265-2270 (2003), Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002), Blood 99 (8):2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98 (17):9772-9777 (2001), Xu,M.J., et al. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768-775; documento WO2004016225 (Reivindicación 2); WO2003077836; documento WO200138490 (Reivindicación 5; Fig 18D-1-18D-2); documento WO2003097803 (Reivindicación 12); documento WO2003089624 (Reivindicación 25);  
15 Referencias cruzadas: MIM:606509; NP\_110391.2; NM\_030764\_1  
508 aa

MLLWSELLVIFDAVTEQADSLTLVAPSSVFEGDSIVLKCQGEQNWKIQKMAYHKDNKELSV  
FKKFSDFLIQSAVLSDSGNFYFCSTKGQLFLWDKTSNIVKIKVQELFQRPVLTASSFQPIE  
GGPVSLKCETRLSPQRLDVQLQFCFFRENQVLGSGWSSPELQISAVWSEDTGSYWKAE  
TVTHRIRKQSLQSQIHVQRIPISNVSLERAPGGQVTEGQKLIILLCVAGGTGNVTFWSY  
REATGTSMGKKTQRSLSAELEIPAVKESDAGKYCRADNGHVPIQSKVVNIPVRI PVS RP  
VLTLRSPGAQA AVGD LLELHCEALRGSPPILYQFYHEDVTLGNSSAPSGGGASFNLSLTA  
EHSNGYSCEANGLGAQCSEAVPVVISGPDGYRRDLMTAGVLWGLFGVLGFTGVALLLYA  
LFHKISGESSATNEPRGASRPNPQEFTYSSPTPMEELQPVYVNVGSDVDVVDVYSQVWSM  
QQPESSANIRTLENKDSQVIYSSVKKS

20 (SEQ ID NO:16)

(17) HER2 (ErbB2, n.º de registro GenBank M11730, Coussens L., et al. Science (1985) 230(4730):1132-1139); Yamamoto T., et al. Nature 319, 230-234, 1986; Semba K., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J. M., et al. J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004; Kuhns J. J., et al. J. Biol. Chem. 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., et al. Nature 421,756-760, 2003; Ehsani A., et al. (1993) Genomics 15, 426-429; documento WO2004048938 (Ejemplo 2); documento WO2004027049 (Fig 11); WO2004009622; WO2003081210; documento WO2003089904 (Reivindicación 9); documento WO2003016475 (Reivindicación 1); US2003118592; documento WO2003008537 (Reivindicación 1); documento WO2003055439 (Reivindicación 29; Fig 1A-B); documento WO2003025228 (Reivindicación 37; Fig 5C); documento WO200222636 (Ejemplo 13; Página 95-107); documento WO200212341 (Reivindicación 68; Fig 7); documento WO200213847 (Página 71-74); documento WO200214503 (Página 114-117); documento WO200153463 (Reivindicación 2; Página 41-46); documento WO200141787 (Página 15); documento WO200044899 (Reivindicación 52; Fig 7); documento WO200020579 (Reivindicación 3; Fig 2); documento US5869445 (Reivindicación 3; Col 31-38); documento WO9630514 (Reivindicación 2; Página 56-61); documento EP1439393 (Reivindicación 7); documento WO2004043361 (Reivindicación 7); WO2004022709; documento  
35 WO200100244 (Ejemplo 3; Fig 4); Registro: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761;  
AAA35808.1.  
1255 aa

MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTMKLRRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVGQNL  
 ELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNVQRVQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNG  
 DPLNNTTPVTGASPGGLRELQRLSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLA  
 LTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQC  
 AAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACP  
 YNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSAN  
 IQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSL  
 DLSVFNQLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSLALIHNTHLCFVHTV  
 PWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQEC  
 VEBCRVLQGLPREYVNRHCLPCHPECQPONGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFPCVARC  
 PSGVKPDLSPYIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIIISAVVG  
 ILLVVVLGVVFGILIKRRQOKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETEL  
 RKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGS  
 YVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRRGLGSQDLNWCMIKAGMSYLEDVR  
 LVHRDLAARNVLVKS PNHVKITDFGLARLLDIDETEHADGGKVPKIMMALESILRRRFT  
 HQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPIREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWM  
 IDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNEGLGPASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDA  
 BEYLVPQQGFPCDPAPGAGGMVHHRHSSTRSGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEG  
 AGSDVFDGDLGMAAKGLQSLPHTDPSPLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYV  
 NQPDRVPQPPSPREGPLPAARPAATLERPKTLPSPKNGVVKDVFAGGAVENPEYLTPQ  
 GGAAQPHPPPAFSPAFDNLYYWDQPPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV

(SEQ ID NO:17)

- 5 (18) NCA (CEACAM6, n.º de registro GenBank M18728); Barnett T., et al Genomics 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99:16899-16903,2002; WO2004063709; documento EP1439393 (Reivindicación 7); documento WO2004044178 (Ejemplo 4); WO2004031238; documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento WO200278524 (Ejemplo 2); documento WO200286443 (Reivindicación 27; página 427); documento WO200260317 (Reivindicación 2); Registro: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1.
- 10 EMBL; M18728;  
 344 aa

MGPPSAPP CRLHVPWKEVLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNVAEGKEVLLLAHNLPO  
 NRIGYSWYKGERVDGNSLIVGYVIGTQQATPGPAYSGRETIYPNASLLIQNVTONDTGFY  
 TLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPEVQNTTYLWVW  
 NGQSLPVS PRLQLSNGNMTLTLSSVKRNDAGSYECEIQNPASANRSDPVTLNVLYGPDVP  
 TISPSKANYRPGENLNLSCHAASNPPAQYSWFFINGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQ  
 AHNSATGLNRRTVTMITVSGSAPVLSAVATVGITIGVLRVALI

- 15 (SEQ ID NO:1B)

- (19) MDP (DPEP1, n.º de registro GenBank BC01 7023, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99 (26):16899-16903 (2002)); documento WO2003016475 (Reivindicación 1); documento WO200264798 (Reivindicación 33; Página 85-87); documento JP05003790 (Fig 6-8); documento WO9946284 (Fig 9); Referencias cruzadas: MIM: 179780; AAH17023.1; BC017023\_1
- 20 411 aa

MWSGWLLWPLVAVCTADFRDEAERIMRDSPVIDGHNDLPWQLLDMFNNRLQDERANLTT  
LAGTHTNIPKLRAGFVGGQFWSVYTPCDTQNKDAVRRRTLEQMDVVHRMCRMPETFLYVT  
SSAGIRQAFREGKVASLIGVEGGHSIDSSLGVLRALYQLGMRYLTLTHSCNTPWADNWL  
DTGDSEPPQSQGLSPFGQRVVKELNRLGLVIDLAHVSVATMKATLQLSRAPVIFSHSSAYS  
VCASRRNVPDDVLRVVKQTDLSVMVNFYNNYISCTNKANLSQVADHLDHIKEVAGARAVG  
FGGDFDGVPRVPEGLEDVSKYPDLIAELLRRNWTEAEVKGALADNLLRVFEAVEQASNLT  
QAPEEPIPLDQLGGSCRTHYGYSSGASSLHRHWGLLLASLAPLVLCLSLL

(SEQ ID NO:19)

- 5 (20) IL20R $\alpha$  (IL20Ra, ZCYTOR7, n.<sup>o</sup> de registro GenBank AF184971); Clark H. F., et al. *Genome Res.* 13, 2265-2270, 2003; Mungall A. J., et al. *Nature* 425, 805-811, 2003; Blumberg H., et al. *Cell* 104, 9-19, 2001; Dumoutier L., et al. *J. Immunol.* 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J., et al. *J. Biol. Chem.* 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S., et al. (2003) *Biochemistry* 42:12617-12624; Sheikh F., et al. (2004) *J. Immunol.* 172, 2006-2010; documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento US2004005320 (Ejemplo 5); documento WO2003029262 (Página 74-75);  
10 documento WO2003002717 (Reivindicación 2; página 63); documento WO200222153 (Página 45-47); documento US2002042366 (Página 20-21); documento WO200146261 (Página 57-59); documento WO200146232 (Página 63-65); documento WO9837193 (Reivindicación 1; Página 55-59); Registro: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971;  
AAF01320.1.553 aa

15

MRAPGRPALRPLPLPPLLLLLLAAPWGRAVPCVSGGLPKPANITFLSINMKNVLQWTPPE  
GLQGKVKVTVYTVQYFIYGQKKWLNKSECRNINRTYCDLSAETS DYEHQYYAKVKAIWGTKC  
SKWAESGRFYPFLETQIGPPEVALTTDEKSI SVVLTAPEKWKRNPELDPVSMQIYSNLK  
YNVSVLNTKSNRTWSQCVTNHTLVLTWLEPNTLYCVHVESFVPGPPRRAPSEKQCARTL  
KDQSSEFKAKIIFWYVLPISITVFLFSVMGYSIYRYIHVGKEKHPANLILYGNFDFKRF  
FVPAEKIVINFITLNI SDDSKISHQDMSLLGKSSDVSSLNDPQPSGNLRPPQEEEEVKHL  
GYASHLMEIFCDSEENTEGETSFTQQESLSRTIPPDKTVIEYEYDVRTTDCAGPEEQELS  
LQEEVSTQGTLLSQAALAVLGPQTLQYSYTPQLQDLDPLAQEHTDSEEGPEEPPSTTLV  
DWDPQTGRLCIPSLSSFDQDSEGCEPSEGDLGEEGLLSRLYEPPAPDRPPGENETYLMQ  
FMEEWGLYVQMEN

(SEQ ID NO:20)

- 20 (21) Brevican (BCAN, BEHAB, n.<sup>o</sup> de registro GenBank AF229053) Gary S.C., et al. *Gene* 256, 139-147, 2000; Clark H. F., et al. *Genome Res.* 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 16899-16903, 2002; documento US2003186372 (Reivindicación 11); documento US2003186373 (Reivindicación 11); documento US2003119131 (Reivindicación 1; Fig 52); documento US2003119122 (Reivindicación 1; Fig 52); documento US2003119126 (Reivindicación 1); documento US2003119121 (Reivindicación 1; Fig 52); documento  
25 US2003119129 (Reivindicación 1); documento US2003119130 (Reivindicación 1); documento US2003119128 (Reivindicación 1; Fig 52); documento US2003119125 (Reivindicación 1); documento WO2003016475 (Reivindicación 1); documento WO200202634 (Reivindicación 1);  
911 aa



MAQLFLPLLAALVLAQAPAALADVLEGDSSDRAFRVRIAGDAPLQGVLGALTI PCHVH  
 YLRPPPSRRAVLGSPRVKWTFLSRGREAEVLVARGVRVKVNEAYRFRVALPAYPASLTDV  
 SLALSELRPNDSGIYRCEVQHGIDSSDAVEVKVKGVVFLYREGSARYAFSFGAQEACA  
 RIGAHIAATPEQLYAAYLGGYEQCDAGWLSDQTVRYPIQTPREACYGDMDFPGVRNYGVV  
 DPDDLVDVYCYAEDLNGELFLGDPPEKLTLEEARAYCQERGAETATGQLYAAWDGGLDH  
 CSPGWLADGSVRYPIVTPSQRCGGGLPGVKTLFLFPNQTGFNPKHSRNFVYCFRDSAQPS  
 AIPASNPNASNPASDGLEAIVTVTETLEELQLPQEATESESRGAIYSIPIMEDGGGGSST  
 PEDPABAPRTLLEFETQSMVPPTGFSEEEGKALEEEEEKYEDDEEKEEEEEVEDEALW  
 AWPSELSSPGPEASLPTEPAAQEKSLSQAPARAVLQPGASPLPDGESEASRPPRVHGPPT  
 ETLPPTPRERNLASPSSTLVEAREVGEATGGPELSGVPRGESEETGSSEGAPSLLPATRA  
 PEGTRELEAPSEDNSGRTAPAGTSVQAQPVLPFTDSASRGGVAVVPASGDCVPSpchnggt  
 CLEEEEGVRCLCLPGYGGDLCDVGLRFCNPGWDAFQGACYKHFSTRRSWEEAETQCRMYG  
 AHLASISTPEEQDFINNRYREYQWIGLNDRTIEGDFLWSDGVPLLYENWNPNQGPDSYFLS  
 GENCVVMVWHDQGWSDVPCNYHLSYTCMGLVSCGPPPELFLAQVFGRPRLRYEVDTVL  
 RYRCREGLAQRNPLIRCOENGRWEAPQISCVPRRPARALHPEEDPEGRQGRLLGRWKAL

LIPPSSPMPGP

(SEQ ID NO:21)

- 5 (22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, n.º de registro GenBank NM\_004442) Chan, J. y Watt, V.M.,  
 Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991) Oncogene 10 (5):897-905 (1995), Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998), Int.  
 Rev. Cytol. 196:177-244 (2000)); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento WO200053216  
 (Reivindicación 1; página 41); documento WO2004065576 (Reivindicación 1); documento WO2004020583  
 (Reivindicación 9); documento WO2003004529 (Página 128-132); documento WO200053216 (Reivindicación 1;  
 10 página 42); Referencias cruzadas: MIM:600997; NP\_004433.2; NM\_004442\_1  
 987 aa

MALRRILGAALLLLPLLAAVEETLMDSTTATAELGWMVHPPSGWEEVSGYDENMNTIRTYQ  
 VCNVFESSQNNWLRTKFIRRRGAHRIHVEMKFSVRDCSSIPSVPGSCKETFNLYYEADF  
 DSATKTFPNWMENPWVKVDITIAADESFSQVDLGGVRMKINTEVRSFGPVSRSFGFYLAQD  
 YGGCMSLIAVRVYRKCPRIIQNGAIFQETLSGAESTSLVAARGSCIANAEVDPVIKLY  
 CNGDGEWLVPIGRCMCKAGFEAVENGTVCRGCPSTGTFKANQGD EACTHCPINSRTTSEGA  
 TNCVCRNGYYRADLDPLDMPCTTIPSAQAVISSVNETSLMLEWTPPRDSSGGREDLVYNI  
 ICKSCGSGRGACTRCGDNVQYAPRQLGLTEPRIYISDLLAHTQYTFEIQAVNGVTDQSPF  
 SPQFASVNITTNQAAPSAVSIMHQVSRVTDSITLSWSQPDQPNGVILDYELQYYEKELSE  
 YNATAIKSPNTNTVTVQGLKAGAIYVFQVRARTVAGYGRYSKMYFQMTTEABYQTSIQEK  
 LPLIIGSSAAGLVFLIAVVVIAIVCNRRRGFERADSEYTDKLGHYTSGHMTPGMKIYIDF  
 FTYEDPNEAVREFAKEIDISCVKIEQVIGAGEFGEVCSGHLKLPKREIFVAIKTLKSGY  
 TEKQRRDFLSEASIMGQFDHPNVIHLEGVVTKSTPVMITTEFMENGLSDFSFLRQNDGQFT  
 VIQLVGMLRGLIAAGMKYLADMNYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFLSRFLEDDTSDPT  
 YTSALGGKIPIRWTAPEAIQYRKFTSASDVWSYGIWMWEVMSYGERPYWDMTNQDVINAI  
 EQDYRLPPMDCPSALHQLMLDCWQKDRNHRPKFGQIVNTLDKIMIRNPNSLKAMAPLSSG  
 INLPLLDRTIPDYTSFNTVDEWLEAIKMGQYKESFANAGFTSFDVVSQMMMEDILRVGVT  
 LAGHQKKILNSIQVMRAQMNQIQSVEV

15 (SEQ ID NO:22)

- (23) ASLG659 (B7 h, n.º de registro GenBank AX092328)  
 documento US20040101899 (Reivindicación 2); documento WO2003104399 (Reivindicación 11); documento

WO2004000221 (Fig 3); documento US2003165504 (Reivindicación 1); documento US2003124140 (Ejemplo 2); documento US2003065143 (Fig 60); documento WO2002102235 (Reivindicación 13; página 299); documento US2003091580 (Ejemplo 2); documento WO200210187 (Reivindicación 6; Fig 10); documento WO200194641 (Reivindicación 12; Fig 7b); documento WO200202624 (Reivindicación 13; Fig 1A-1B); documento US2002034749 (Reivindicación 54; Página 45-46); documento WO200206317 (Ejemplo 2; Página 320-321, Reivindicación 34; Página 321-322); documento WO200271928 (Página 468-469); documento WO200202587 (Ejemplo 1; Fig 1); documento WO200140269 (Ejemplo 3; Páginas 190-192); documento WO200036107 (Ejemplo 2; Página 205-207); documento WO2004053079 (Reivindicación 12); documento WO2003004989 (Reivindicación 1); documento WO200271928 (Página 233-234, 452-453); documento WO 0116318;

282 aa

MASLGQILFWSIIISIIILAGAIALIIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEP  
 DIKLSDIVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRRTAVFADQVIVGNASLRLKNV  
 QLTDAQTYKCYIIITSKGKKNANLEYKTGAFSMPEVNVVDYNASSETLRCEAPRWFPPQPTVV  
 WASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVSVLYNVTINNTYSMIENDIAKATGDIKV  
 TESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLK

(SEQ ID NO:23)

(24) PSCA (precursor del antígeno de citoblastos, n.º de registro GenBank AJ297436) Reiter R.E., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., et al. Oncogene 19, 1288-1296, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):783-788; WO2004022709; documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento US2004018553 (Reivindicación 17); documento WO2003008537 (Reivindicación 1); documento WO200281646 (Reivindicación 1; página 164); documento WO2003003906 (Reivindicación 10; página 288); documento WO200140309 (Ejemplo 1; Fig 17); documento US2001055751 (Ejemplo 1; Fig 1b); documento WO200032752 (Reivindicación 18; Fig 1); documento WO9851805 (Reivindicación 17; página 97); documento WO9851824 (Reivindicación 10; página 94); documento WO9840403 (Reivindicación 2; Fig. 1B); Registro: O43653; EMBL; AF043498; AAC39607.1.

123 aa

MKAVLLALLMAGLALQPGTALLCYSCKAQVSNEDCLQVENCTQLGEQCWTARIRAVGLLT  
 VISKGCSLNCVDDSDQDYVVGKKNITCCDIDLNASGAHALQAAAAILALLPALGLLLWGP  
 GQL

(SEQ ID NO:24)

(25) GEDA (n.º de registro GenBank AY260763); AAP14954 lipoma HMGIC proteínas de tipo fusión /pid=AAP14954.1 - Homo sapiens Especie: Homo sapiens (ser humano) documento WO2003054152 (Reivindicación 20); documento WO2003000842 (Reivindicación 1); documento WO2003023013 (Ejemplo 3, Reivindicación 20); documento US2003194704 (Reivindicación 45); Referencias cruzadas: GI:30102449; AAP14954.1; AY260763\_1

236 aa

MFGAAAAAAAAAAMLPAQEAAKLYHTNYVRNSRAIGVLWAIFTICFAIVNVVCFIQPYW  
 IGDGVDTPQAGYFGLFHYCIGNGFSRELTCRGSFTDFSTLPSGAFKAASFFIGLSMMLII  
 ACIICTLFFFCNTATVYKICAWMQLTSAACLVLGCMIFPDGWDSDDEVKRMCGEKTKDYT  
 LGACSVRWAYILAIIGILDALILSFLAFVLGNRQDSLMAEELKAENKVLLSQYSLE

(SEQ ID NO:25)

(26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, BLYS receptor 3, BR3, n.º de registro GenBank NP\_443177.1); NP\_443177 BAFF receptor /pid=NP\_443177.1 - Homo sapiens Thompson, J.S., et al. Science 293 (5537), 2108-2111 (2001); WO2004058309; WO2004011611; documento WO2003045422 (Ejemplo; Página 32-33); documento WO2003014294 (Reivindicación 35; Fig. 6B); documento WO2003035846 (Reivindicación 70; Página 615-616); documento WO200294852 (Col 136-137); documento WO200238766 (Reivindicación 3; página 133); documento WO200224909 (Ejemplo 3; Fig 3); Referencias cruzadas: MIM:606269; NP\_443177.1; NM\_052945\_1

184 aa

MRRGPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQ  
 ESGVAGAGEAALPLPGLLFGAPALLGLALVLALVLVGLVSWRRRQRRLRGASSAEAPDGD  
 KDAPEPLDKVIILSPGISDATAPAWPPPGEDPGTTPPGHVSVPVATELGSTELVTTKTAG  
 PEQQ

(SEQ ID NO:26)

- 5 (27) CD22 (isoforma CD22-B del receptor de linfocitos B, n.º de registro GenBank NP-001762.1); Stamenkovic, I. y Seed, B., Nature 345 (6270), 74-77 (1990); US2003157113; US2003118592; documento WO2003062401 (Reivindicación 9); documento WO2003072036 (Reivindicación 1; Fig 1); documento WO200278524 (Ejemplo 2); Referencias cruzadas: MIM: 107266; NP\_001762.1; NM\_001771\_1  
 847 aa

10

MHLLGPNLLLLVLEYLAFSDSSKWFVFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFH  
 NPEYNKNTSKFDGTRLYESTKDGKVPSEQKRVQFLGDKNKNCTLSIHPVHLNDSGQLGLR  
 MESKTEKWMERIHNLVSERPFPPIQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSYGYPIQLQWLLEG  
 VPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSELKFSQWSSHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKH  
 TPKLEIKVTPSDAIVREGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNLEVT  
 KDQSGKYCCQVSNVGPGRSEEVFLQVQYAPEPSTVQIILHSPAVEGSQVEFLCMLANPL  
 PTNYTWYHNGKEMQGRTEEKVHIPKILFWHAGTYSCVAENILGTGQRGPGAELDVQYPPK  
  
 KVTTVIQNPMPIREGDTVTLSCNYNSSNPVTRYEWKPHGAWEEPVLGVLKIQNVGWDNT  
 TIACARCNSWCSWASPVALNVQYAPRDVVRKIKPLSEIHSGNSVSLQCDFSSSHPKVEVQ  
 FFWEKNGRLLGKESQLNFDISISPEDAGSYSWCWVNSIGQTASKAWTLEVLYAPRRLRVS  
 M  
 SPGDQVMGKSAATLTCESDANPPVSHYTWFDWNNQSLPHHSQKLRLEPVKQVHSGAYWCQ  
 GTNSVGKGRSPLSTLTVYVSPETIGRRVAVGLGSLAILILAIICGLKLRWRKRTQSQQG  
 LQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGPVSLGVCYNPMMEDGISYTTLRFPENIIPRTGDAES  
 SEMQRPPRTCDDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENV  
 DYVILKH

15 (SEQ ID NO:27)

- (28) CD79a (CD79A, CD79α, inmunoglobulina alfa-asociada, una proteína específica de linfocitos B que interactúa covalentemente con la Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie con moléculas de Ig M, transduce una señal implicada en la diferenciación de linfocitos B) SECUENCIA DE PROTEÍNA Completa mpggggv...dvqlkp  
 20 (1..226; 226 aa), pl: 4,84, MW: 25028 TM: 2 [P] Cromosoma génico: 19q13.2, n.º de registro GenBank NP\_001774.1;  
 WO2003088808, US20030228319; documento WO2003062401 (reivindicación 9); documento US2002150573 (reivindicación 4, páginas 13-14); documento WO9958658 (reivindicación 13, Fig 16); documento WO9207574 (Fig 1); US5644033; Ha et al. (1992) J. Immunol. 148(5):1526-1531; Mueller et al. (1992) Eur. J. Biochem. 22:1621-1625;  
 25 Hashimoto et al. (1994) Immunogenetics 40(4):287-295; Preud'homme et al. (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1):141-146; Yu et al. (1992) J. Immunol. 148(2) 633-637; Sakaguchi et al. (1988) EMBO J. 7(11):3457-3464;  
 226 aa

MPPGGPVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCALWVHMKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSN  
 NANVTWWRVHLHGNYTWPPEFLGPGEDPNGTLIIQNVNKSHTGGIYVCRVQEGNESYQQSCG  
 TYLRVRQPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFKRKRWQNEKLGLDAGD  
 EYEDENLYEGLNLDLDCSMYEDISRGLQGTQYQDVGSLNIGDVQLEKP

30

(SEQ ID NO:28)

- (29) CXCR5 (receptor 1 del linfoma de Burkitt, un receptor acoplados a la proteína G que se activa mediante la quimioquina CXCL13, actúa en la migración de linfocitos y en la defensa humoral, tiene un papel en la infección por VIH-2 y quizás en el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma, y leucemia) SECUENCIA DE PROTEÍNA Completa

35



mnypltl...atstlff (1..372; 372 aa), pl: 8.54 MW: 41959 TM: 7 [P] Cromosoma génico: 11q23.3, n.º de registro GenBank NP\_001707.1; WO2004040000; WO2004015426; documento US2003105292 (Ejemplo 2); documento US6555339 (Ejemplo 2); documento WO200261087 (Fig 1); documento WO200157188 (Reivindicación 20, página 269); documento  
 5 WO200172830 (páginas 12-13); documento WO200022129 (Ejemplo 1, páginas 152-153, Ejemplo 2, páginas 254-256); documento WO9928468 (reivindicación 1, página 38); documento US5440021 (Ejemplo 2, col 49-52); documento WO9428931 (páginas 56-58); documento WO9217497 (reivindicación 7, Fig 5); Dobner et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22:2795-2799; Barella et al. (1995) Biochem. J. 309:773-779;  
 10 372 aa

```

MNYPLTLEMDLENLEDLFWELDRLDNYNDTSLVENHLCPATEGPLMASFKAVFVFPVAYSLL
IFLLGVIGNVLVLVILERHRQTRSSTETFLFHLAVADLLLVLFPFAVAEGSVGWVLTGF
LCKTVIALHKVNFYCSSLLLACIAVDRYLAIVHAVHAYRHRRLLSIHITCGTIWLVGFL
ALPEILFAKVSQGHNNSLPRCTFSQENQAETHAWFTSRFLYHVAGFLLPMLVMGWCVYG
VVHRLRQAQRPPQRQKAVRVAILVTSIFFLCWSPYHIVIFLDTLARLKAVDNTCKLNGSL
PVAITMCEFLGLAHCCLNPMLYTFAGVKFRSDLRLLTKLGCTGPASLCQLFPPSWRRSSL
SESENATSLTTF
    
```

(SEQ ID NO:29)

15 (30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula de clase II de MHC (antígeno Ia) que se une a péptidos y los presenta a linfocitos T CD4+) SECUENCIA DE PROTEÍNA Completa msggwvp...vllpqsc (1..273; 273 aa, pl: 6.56 MW: 30820 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 6p21.3, n.º de registro GenBank NP\_002111.1; Tonnelle et al. (1985) EMBO J. 4(11):2839-2847; Jonsson et al. (1989) Immunogenetics 29(6):411-413; Beck et al. (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441; Strausberg et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903; Serenius et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:8759-8766; Beck et al. (1996) J. Mol. Biol. 255:1-13; Naruse et al. (2002) Tissue Antigen 59:512-519; documento WO9958658 (reivindicación 13, Fig 15); documento US6153408 (Col 35-38); documento US5976551 (col 168-170); documento US6011146 (col 145-146); Kasahara et al. (1989) Immunogenetics 30(1):66-68; Larhammar et al. (1985) J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119;  
 20 273 aa

```

MGSGWVPWVVALLVNLTSLDSSMTQGTDSPEDFVIQAKADCYFTNGTEKVQFVVRFI FNL
EEYVRFDSVDGMFVALTKLGQPDAEQWNSRLDLLERSRQAVDGVCRHNYRLGAPFTVGRK
VQPEVTVPERTPLLHQHNLHCSVTGFYPGDIKIKWFLNGQEERAGVMSTGPIRNGDWT
FQTVVMLEMTPELGHVYTCLVDHSSLLSPVSVIEWRAQSEYSWRKMLSGIAAFLLGLIFLL
VGIVIQLRAQKGYVRTQMSGNEVSRAVLLPQSC
    
```

(SEQ ID NO:30)

30 (31) P2X5 (Receptor purinérgico P2X del canal de iones controlado por ligando 5, un canal de iones controlado por el ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión sináptica y en la neurogénesis, la deficiencia puede contribuir a la patofisiología de la inestabilidad idiopática del detrusor) SECUENCIA DE PROTEÍNA Completa mgqagck...lephrst (1 ..422; 422 aa), pl: 7,63, MW: 47206 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 17p13.3, n.º de registro GenBank NP\_002552.2;  
 35 Le et al. (1997) FEBS Lett. 418(1-2): 195-199; WO2004047749; documento WO2003072035 (reivindicación 10); Touchman et al. (2000) Genome Res. 10:165-173; documento WO200222660 (reivindicación 20); documento WO2003093444 (reivindicación 1); documento WO2003087768 (reivindicación 1); documento WO2003029277 (página 82);  
 40 422 aa

MGQAGCKGLCLSLFDYKTEKYVIAKNKKVGLLYRLLQASILAYLVVWVFLIKKGYQDVDT  
 SLQSAVITKVKGVAFNTNTSDLGQRIWDVADYVIPAQGENVFFVVTNLIVTPNQRQNVCAE  
 NEGIPDGACSKSDSDCHAGEAVTAGNGVKTGRCLRRENLARGTCEIFAWCPLETSSRPEEP  
 FLKEAEDFTIFIKNHIRFPKFNFSKSNVMDVKDRSFLKSCHFGPKNHYCPIFRLGSVIRW  
 AGSDFQDIALEGGVIGINIEWNCDDLKAASECHPHYSFSRLDNKLSKSVSSGYNFRFARY  
 YRDAAGVEFRTLKAYGIRFDVMVNGKGAFFCDLVLIIYLIKREFYRDKKYEEVRGLEDS  
 SQEAEDEASGLGLSEQLTSGPGLLGMPEQQELQEPPEAKRGSSSQKNGSVCPQLLEPHR  
 ST

(SEQ ID NO:31)

- 5 (32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de linfocitos B, Lyb-2) SECUENCIA DE PROTEÍNA Completa  
 maeaity...tafrfpd (1..359; 359 aa), pl: 8,66, MW: 40225 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 9p13.3, n.º de registro  
 GenBank NP\_001773.1; documento WO2004042346 (reivindicación 65); documento WO2003026493 (páginas 51-  
 52, 57-58); documento WO200075655 (páginas 105-106); Von Hoegen et al. (1990) J. Immunol. 144(12):4870-4877;  
 10 Strausberg et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903;  
 359 aa

MAEAITYADLRFVKAPLKKSISRLGQDPGADDDGEITYENVQVPAVLGVPSSLASSVLG  
 DKAARKSEQPTASWRAVTSFAVGRILPCRTTCLRYLLLGLLLTCLLLGVTAICLVRYLQ  
 VSQQLQQTNRVLEVTNSSLRQQLRLKITQLGQSAEDLQGSRRRLAQSQEALQVEQRAHQA  
 AEGQLQACQADRQKTKETLQSEEQRRALEQKLSNMENRLKPFPTCGSADTCCPSGWIMH  
 QKSCFYISLTSKNWQESQKQCETLSSKLATFSEIYPQSHSYFFLNSLLPNGGSGNSYWTG  
 LSSNKDWKLTDDTQRTRYAQSSKCNKVHKTWSWWTLESESCRSSLPIYICEMTAFRFPD

(SEQ ID NO:32)

- 15 (33) LY64 (Antígeno linfocitario 64 (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repeticiones ricas en  
 leucina (LRR), regula la activación de linfocitos B y la apoptosis, la pérdida de función está asociada con un aumento  
 de la actividad de la enfermedad en pacientes con lupus sistémico eritematoso) SECUENCIA DE PROTEÍNA  
 20 Completa mafdvsc...rwyqhi (1..661; 661 aa), pl: 6,20, MW: 74147 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 5q12, n.º de  
 registro GenBank NP\_005573.1; US2002193567; documento WO9707198 (reivindicación 11, páginas 39-42); Miura  
 et al. (1996) Genomics 38(3):299-304; Miura et al. (1998) Blood 92:2815-2822; WO2003083047; documento  
 WO9744452 (reivindicación 8, páginas 57-61); documento WO200012130 (páginas 24-26);  
 661 aa

MAFDVSCFFWVVLFSAGCKVITSWDQMCIEKEANKTYNCENLGLSEIPDTLPNTTEFLEF  
 SFNFLPTIHNRTFSRLMNLTFDLTRCQINWIHEDTFQSHHQLSTLVLTGNPLIFMAETS  
 LNGPKSLKHLFLIQTGISNLEFIPVHNLENLESYLGSNHISSIKFPKDFPARNLKVLDL  
 QNNAIHYSREDMRSLEQAINLSLNFNGNNVKGIELGAFDSTVFQSLNFGGTPNLSVIFN  
 GLQNSTTQSLWLGTPEIDDEDISSAMLKGLCEMSVESLNLQEHFSDISSTTFQCFTQL  
 QELDLTATHLKGLPSGMKGLNLLKLVLSVNHFDQLCQISANFPSLTHLYIRGNVKKLH  
 LGVGCLEKLGNLQTLDSLHNDIEASDCCSLQLKNSHLQTLNLSHNEPLGLQSQAFKECP  
 QLELLDLAFTRLHINAPQSPFQNLHFLQVLNLTFCFLDTSNOHLLAGLPVLRHNLKGNH  
 FQDGTITKTNLLQTVGSLEVLILSSCGLLSIDQAFHSLGKMSHVLDLHNSLTCDSIDSL  
 SHLKGIIYLNLAANSINIISPRLPILSQOSTINLSHNPLDCTCSNIHFLTWYKENLHKL  
 GSEETTCANPPSLRGVKLSVVKLSCGITAIGIFFLIVFLLLLAILLFFAVKYLLRWKYQH  
 I

25

(SEQ ID NO:33)

- (34) FCRH1 (proteína 1 análoga al receptor Fc, un receptor posible del dominio Fc de inmunoglobulinas que

contiene los dominio de tipo C2 e ITAM análogo a Ig, puede tener un papel en la diferenciación de linfocitos B) SECUENCIA DE PROTEÍNA Completa mlprll...vdyedam (1..429; 429 aa), pl: 5,28, MW: 46925 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 1q21-1q22, n.º de registro GenBank NP\_443170.1;

- 5 WO2003077836; documento WO200138490 (reivindicación 6, Fig 18E-1-18-E-2); Davis et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):9772-9777; documento WO2003089624 (reivindicación 8); documento EP1347046 (reivindicación 1); documento WO2003089624 (reivindicación 7);  
429 aa

MLPRLLLLLICAPLCEPAELFLIASPSHPTGSPVTLTCKMPFLQSSDAQFQFCFFRDTRA  
LGGWSSSPKLQIAAMWKEDTGSYWCEAQTMAKVLRSRRSQINVHRVPVADVSLETQPP  
GGQVMEGDRVLVICSVMAGTGDITFLWYKGAVGLNLQSKTQRSLTAEYBIPSVRESDAEQ

10

YYCVAENGYGPPSPGLVSI TVRIPVSRPILMLRAPRAQAAVEDVLELHCEALRGSPPILY  
WPHYHEDITLGSRSAPSGGGASFNLSL TEEHSGNYSCEANGLGAQRSEAVTLNFTVPTGA  
RSNHLTSGVIEGLLSTLGPATVALLFCYGLKRKIGRRSARDPLRSLPSPLPQEFTYLNSP  
TPGQLQPIYENVNVVSGDEVYSLAYNQPEQESVAAETLGTHMEDKVSLEDIYSRLRKANI  
TDVDYEDAM

(SEQ ID NO:34)

- 15 (35) IRTA2 (superfamilia del receptor de translocación 2 asociado a inmunoglobulina, un inmunorreceptor posible con teóricos papeles en el desarrollo de linfocitos B y en la linfomagénesis; la desregulación del gen por translocación se produce en algunas neoplasias malignas de linfocitos B) SECUENCIA DE PROTEÍNA Completa mlwviL.assaphr (1..977; 977 aa), pl: 6.88 MW: 106468 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 1q21, n.º de registro GenBank NP\_112571.1;

- 20 documento WO2003024392 (reivindicación 2, Fig 97); Nakayama et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124-127; WO2003077836; documento WO200138490 (reivindicación 3, Fig 18B-1-18B-2);  
977 aa

MLLWVILLVLPVSGQFARTPRPIIFLQPPWTTVFQGERVTLTCKGFRFYSPQKTKWYHR  
YLGKEILRETPDNILEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVHLD FSSASLILQAPLSVFE GDSVV  
LRCRAKAEVTLNNTIYKNDNVLAFLNKRTDFHI PHACLKDN GAYRCTGYKESCCPVSSNT  
VKIQVQEPFTRPVL RASSFQPI SGNPVTLT CETQLSLERSDVPLRFRFRDDQTLGLGWS  
LSPNFQITAMWSKDSGFYWCKAATMPHSVISDS PRSWIQVQIPASHPVL TLSPEKALNFE  
GTKVTLHCETQEDSLRTL YRFYHEGVPLRHKS VRCERGASISFSLT TENS GNYYCTADNG  
LGAKPSKAVSLSVTVPVSHPV LNLSSPEDLIFEGAKVTLHCEAQRGSLPILYQFHEDAA  
LERRSANSAGGVAISFSLTAEHSGNYYCTADNGFGPQRSKAVSLSITVPVSHPV LTLSSA  
EALTFEGATVTLHCEVQRGSPQILYQFYHEDMPLWSSSTPSVGRV SFSFSLTEGHSGNYY  
CTADNGFGPQRSEVVS L FVTVPVSRPILTLRV PRAQAVVGD LLELHCEAPRGSPPILYWF  
YHEDVTLGSSSAPSGGEASFNLSL TAEHSGNYSCEANGLVAQHS DTISLSVIVPVS RPI  
LTFRAPRAQAVVGD LLELHCEALRGSSPILYWFYHEDVTLGKISAPSGGGASFNLSL TTE  
HSGIYSCEADNGPEAQRSEM VTLKVAVPVS R PVLTLR APGTHAAVGD LLELHCEALRGSP  
LILYRFFHEDVTLGNRSSPSGGASLNL SLTAEHSGNYSCEADNGLGAQRSETV TLYITGL  
TANRSGPFATGVAGLLS IAGLAAGALLLYCWL SRKAGRKPASDPARSPPDS DSQEPTYH  
NVPaweELQPVYTNANPRGENVVYSEVRIIQEKKKH AVASDPRHLRNKGSPIIYSEVKVA  
STPVSGSLFLASSAPHR

25

(SEQ ID NO:35)

- 30 Véanse también: WO04/045516 (03 Jun 2004); WO03/000113 (03 Jan 2003); WO02/016429 (28 Feb 2002); WO02/16581 (28 Feb 2002); WO03/024392 (27 Mar 2003); WO04/016225 (26 Feb 2004); WO01/40309 (07 Jun 2001), y la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos con número de serie 60/520842 "COMPOSITIONS

AND METHODS FOR THE TREATMENT OF TUMOR OF HEMATOPOIETIC ORIGIN", presentada el 17 de nov de 2003.

5 En un ejemplo, el Conjugado de ligando-enlazador-fármaco tienen la Fórmula IIIa, donde el Ligando es un anticuerpo Ab incluido uno que se une a al menos uno de CD30, CD40, CD70, antígeno Lewis Y,  $w=0$ ,  $y=0$ , y D tiene la Fórmula Ib. Los Conjugados ilustrativos de Fórmula IIIa incluyen donde  $R^{17}$  es  $-(CH_2)_5-$ . También se incluyen tales Conjugados de Fórmula IIIa en la que D tiene la estructura del Compuesto 2 del Ejemplo 3 y ésteres de los mismos. También se incluyen tales Conjugados de Fórmula IIIa que contienen de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, en un aspecto, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 Restos de fármaco D, es decir, Conjugados de Fórmula la en la que p tiene un valor en el intervalo de aproximadamente 3-8, por ejemplo aproximadamente 3-5. Los conjugados que contienen combinaciones de rasgos estructurales indicados en este párrafo también se describen.

15 En otro ejemplo, el Conjugado de ligando-enlazador-fármaco tiene la Fórmula IIIa, donde el Ligando es un anticuerpo Ab que se une a uno de CD30, CD40, CD70, antígeno Lewis Y,  $w=1$ ,  $y=0$ , y D tiene la Fórmula Ib. Están incluidos dichos Conjugados de Fórmula IIIa en los que  $R^{17}$  es  $-(CH_2)_5-$ . También se incluyen dichos Conjugados de Fórmula IIIa en la que W es -Val-Cit-, y/o donde D tiene la estructura del Compuesto 2 del Ejemplo 3 y ésteres de los mismos. También se incluyen tales Conjugados de Fórmula IIIa que contienen de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, preferentemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 Restos de fármaco D, es decir, Conjugados de Fórmula la en la que p tiene un valor en el intervalo de aproximadamente 3-8, preferentemente aproximadamente 3-5. Los conjugados que contienen combinaciones de rasgos estructurales indicados en este párrafo también son ilustrativos.

25 En un ejemplo, el Conjugado de ligando-enlazador-fármaco tienen la Fórmula IIIa, donde el Ligando es un anticuerpo Ab que se une a uno de CD30, CD40, CD70, antígeno Lewis Y,  $w=1$ ,  $y=1$ , y D tiene la Fórmula Ib. Están incluidos los Conjugados de Fórmula IIIa en los que  $R^{17}$  es  $-(CH_2)_5-$ . También se incluyen dichos Conjugados de Fórmula IIIa en la que: W es -Val-Cit-; Y tiene la Fórmula X; D tiene la estructura del Compuesto 2 del Ejemplo 3 y ésteres de los mismos; p es de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, preferentemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 Restos de fármaco D. Los conjugados que contienen combinaciones de rasgos estructurales indicados en este párrafo también se contemplan.

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

35 Un ejemplo es el Compuesto TAA o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo que está en forma aislada o purificada.

Se describen también métodos para destruir o inhibir la multiplicación de una célula tumoral o una célula cancerosa que comprenden administrar a un paciente, por ejemplo, un ser humano con un trastorno hiperproliferativo, una cantidad de un Compuesto TAA o una sal o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, siendo dicha cantidad eficaz para destruir o inhibir la multiplicación de una célula tumoral o de una célula cancerosa.

40 Se describe también un método para tratar un cáncer que comprende administrar a un paciente, por ejemplo, un ser humano con un trastorno hiperproliferativo, una cantidad de un Compuesto TAA o una sal o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, siendo dicha cantidad eficaz para tratar el cáncer, en solitario o de forma conjunta con una cantidad eficaz de un agente anticanceroso adicional. Se describe también un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria, que comprende administrar a un paciente, por ejemplo, un ser humano con un trastorno hiperproliferativo, una cantidad de un Compuesto TAA o una sal o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, siendo dicha cantidad eficaz para tratar una enfermedad autoinmunitaria.

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

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

55 Se pueden producir anticuerpos utilizando cualquier método conocido en la técnica que sea útil para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o mediante expresión recombinante.

60 La expresión recombinante de anticuerpos, o fragmentos, derivados o análogos de los mismos, requiere la construcción de un ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, se puede ensamblar un ácido nucleico que codifica el anticuerpo a partir de oligonucleótidos químicamente sintetizados (por ejemplo, como se describe en Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17:242), que implica la síntesis de solapamiento de oligonucleótidos que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, la hibridación y la ligadura de aquellos oligonucleótidos, y a continuación la amplificación de los oligonucleótidos ligados, por ejemplo, mediante PCR.

65 Como alternativa, se puede generar una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo a partir de una fuente

adecuada. Si no está disponible un clon que contiene el ácido nucleico que codifica el anticuerpo concreto, pero se conoce la secuencia del anticuerpo, se puede obtener un ácido nucleico que codifica el anticuerpo a partir de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpos, o una biblioteca de ADNc generada a partir de cualquier tejido o células que expresan la inmunoglobulina) mediante, por ejemplo, amplificación de la PCR  
5 utilizando cebadores sintéticos hibridables en los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación usando una sonda de oligonucleótidos específica de la secuencia génica concreta.

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

Una vez que se obtiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos el dominio variable del anticuerpo, se puede introducir en un vector que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica las regiones constantes del anticuerpo (véase, *por ejemplo*, la publicación internacional n.º WO 86/05807; WO 89/01036; y la Patente de Estados Unidos n.º 5122464). Están disponibles vectores que contienen la cadena ligera o pesada completa que permiten la expresión de una molécula de anticuerpo completa. Después, la molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo se puede usar para introducir las sustituciones o deleciones de nucleótidos necesarias para sustituir (o  
20 eliminar) los uno o más restos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intracadena con un resto aminoácido que no contiene un grupo sulfhidrilo. Se pueden llevar a cabo dichas modificaciones mediante cualquier método conocido en la técnica para la introducción de mutaciones o deleciones específicas en una  
25 secuencia de nucleótidos, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, mutagénesis química y mutagénesis dirigida a sitio *in vitro* (Hutchinson et al., 1978, *J. Biol. Chem.* 253:6551).

Además, se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855; Neuberger et al., 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314:452-454) cortando y empalmado genes de una molécula de anticuerpo de ratón de una especificidad por el antígeno adecuada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica adecuada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que las distintas porciones se obtienen de distintas especies animales, tales como las que tienen una región variable obtenida de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana, por ejemplo, anticuerpos humanizados.  
35

Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente de Estados Unidos 4.694.778; Bird, 1988, *Science* 242:423-42; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; y Ward et al., 1989, *Nature* 334:544-54) se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos monocatenarios se forman uniendo los fragmentos de la cadena pesada y ligera de la región Fv mediante un puente de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido monocatenario. Se pueden usar también técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra et al., 1988, *Science* 242:1038-1041).  
40

Se pueden generar fragmentos de anticuerpos que reconocen epítomos específicos mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, aunque no de forma limitativa, fragmentos F(ab')<sub>2</sub> que se pueden producir mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>.  
45

Una vez que se ha obtenido una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo, el vector para la producción del anticuerpo se puede producir mediante tecnología de ADN recombinante utilizando técnicas bien conocidas en la materia. Pueden usarse métodos bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen las secuencias codificantes del anticuerpo y las señales de control de la transcripción y la traducción adecuadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al. (1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) y Ausubel et al. (eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY).  
50  
55  
60

Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de un anticuerpo o la secuencia de nucleótidos de un anticuerpo se puede transferir a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación, transfección liposomal, y precipitación con fosfato de calcio), y las células transfectadas se cultivan a continuación mediante técnicas convencionales para producir el anticuerpo. En realizaciones específicas, la expresión del anticuerpo se regula por un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor específico de  
65

tejido.

Las células hospedadoras usadas para expresar el anticuerpo recombinante pueden ser tanto células bacterianas tales como *Escherichia coli*, como, preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de la molécula de inmunoglobulina recombinante completa. En particular, las células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como un elemento promotor mayor del gen temprano intermedio procedente del citomegalovirus humano son un sistema de expresión eficaz para las inmunoglobulinas (Foecking et al., 198, Gene 45:101; Cockett et al., 1990, BioTechnology 8:2).

Se puede utilizar varios sistemas vectoriales de expresión en el hospedador para expresar los anticuerpos de la inmunoglobulina. Dichos sistemas de expresión en el hospedador representan vehículos mediante los cuales se pueden producir secuencias del anticuerpo y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias que codifican los nucleótidos adecuados, expresar una molécula de inmunoglobulina anticuerpo *in situ*. Estos incluyen, aunque no de forma limitativa, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformados con ADN de bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN plásmido o ADN cósmido que contienen secuencias de codificación de la inmunoglobulina; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen secuencias de codificación de la inmunoglobulina; sistemas de células de insectos con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias de codificación de la inmunoglobulina; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, el virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el virus del mosaico del tabaco (TMV) o transformarse con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias de codificación de la inmunoglobulina; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BH, 293, 293T, 3T3) que transportan promotores que contienen construcciones de expresión recombinantes obtenidas del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, el promotor de la metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia).

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar de forma ventajosa dependiendo del uso previsto del anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de elevados niveles de productos de proteínas de fusión que se purifiquen fácilmente. Dichos vectores incluyen, aunque no de forma limitativa, el vector de expresión pUR278 de *E. coli* (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791), en el que la secuencia que codifica el anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en marco con la región que codifica *lac Z* de tal manera que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509); y similares. Se pueden usar también vectores pGEX para expresar los polipéptido extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a perlas de una matriz de glutatión-agarosa seguido por elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de la proteasa de la trombina o de la proteasa del factor Xa de tal manera que el producto del gen diana clonado puede liberarse del resto GST.

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

en células hospedadoras de mamífero, se pueden utilizar numerosos sistemas de expresión basados en virus. En los casos donde se usa un adenovirus como un vector de expresión, la secuencia que codifica el anticuerpo de interés a un complejo de control de la transcripción/traducción adenovírico, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede insertarse a continuación en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, la región E1 o E3) da como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de inmunoglobulina en hospedadores infectados. (por ejemplo, véase Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359). se pueden requerir también señales de inicio específicas para una traducción eficaz de las secuencias que codifican el anticuerpo insertado. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y las secuencias adyacentes. Además, el codón de inicio debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción de la inserción completa. Estas señales exógenas de control de la traducción y los codones de inicio pueden ser de varios orígenes, tanto naturales como sintéticos. Se puede potenciar la eficacia de la expresión mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción adecuados, terminadores de la transcripción, etc. (véase Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544).

Además, se puede seleccionar una cepa de célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas y procese el producto génico en la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos de la proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen características y mecanismos específicos para el

procesamiento y la modificación posterior a la traducción de las proteínas y productos génicos. Se pueden seleccionar líneas de células adecuadas o sistemas hospedadores para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Con este fin, se pueden usar células hospedadoras eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, la glicosilación, y la fosforilación del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamífero incluyen, aunque no de forma limitativa, CHO, VERY, BH, HeLa, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.

A largo plazo, se prefiere la expresión estable de la producción de alto rendimiento de las proteínas recombinantes. Por ejemplo, se pueden diseñar mediante ingeniería genética líneas de células que expresen de forma estable un anticuerpo. Más bien que utilizar vectores de expresión que contengan orígenes de replicación víricos, las células hospedadoras pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión adecuados (por ejemplo, promotores, potenciadores, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN extraño, pueden dejarse crecer las células diseñadas mediante ingeniería genética durante 1-2 días en un medio enriquecido, y a continuación se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crecer para formar foci que a la vez pueden clonarse y expandirse en líneas de células. Este método puede utilizarse de forma ventajosa para diseñar mediante ingeniería genética líneas de células que expresan el anticuerpo. Dichas líneas de células diseñadas mediante ingeniería genética pueden ser particularmente útiles en el cribado y la evaluación de antígenos tumorales que interactúan directa o indirectamente con el anticuerpo.

Se pueden usar numerosos sistemas de selección, incluyendo, aunque no de forma limitativa la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., 1977, Cell 11:223), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, 192, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., 1980, Cell 22:817) genes que se pueden emplear en células tk-, hprt o aprt, respectivamente. También, se puede usar la resistencia antimetabolitos como la base de selección de los siguientes genes: DHFR, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G- 418 (Clinical Pharmacy 12: 488-505; Wu y Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; y Morgan y Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; mayo de 1993, TIB TECH 11(5): 155-215) e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., 1984, Gene 30:147). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel et al. (eds., 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1).

Se pueden aumentar los niveles de expresión de un anticuerpo mediante la amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vectores que expresa un anticuerpo es amplificable, un aumento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de la célula hospedadora aumentará el número de copias del gen marcador. Debido a que la región amplificada está asociada con la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, aumentará también la producción del anticuerpo (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

La célula hospedadora puede transfectarse simultáneamente con dos vectores de expresión, el primer vector codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual de polipéptidos de la cadena pesada y ligera. Como alternativa, se puede usar un único vector para codificar los polipéptidos de la cadena pesada y ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera debe colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197). Las secuencias de codificación de las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que el anticuerpo se ha expresado de manera recombinante, puede purificarse usando un método conocido en la técnica para la purificación de un anticuerpo, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, de intercambio de iones, de afinidad, particularmente mediante afinidad por el antígeno específico después de la proteína A, y cromatografía de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica normalizada para la purificación de proteínas.

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

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

patología.

#### **4.5.2 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS**

5 Se ilustrará la producción de anticuerpos con referencia a anticuerpos dirigidos contra CD30, pero será evidente para los expertos en la materia que los anticuerpos contra otros miembros de la familia del receptor TNF pueden producirse y modificarse de una manera similar. El uso de CD30 para la producción de anticuerpos es solo ilustrativo y no se pretende que sea limitante.

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

En otro ejemplo, el antígeno ErbB2 que se va a usar para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, una forma soluble del dominio extracelular de ErbB2 o una parte del mismo, que contiene el epítipo deseado. Como alternativa, pueden usarse células que expresan ErbB2 en su superficie celular (por ejemplo células, NIH-3T3 transformadas para expresar en exceso ErbB2; o una línea de células de carcinoma tal como células SK-BR3, véase Stancovski et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8691-8695 (1991)) para generar anticuerpos. Otras formas de ErbB2  
20 útiles para generar anticuerpos resultarán evidentes para los expertos en la materia.

##### **(i) Anticuerpos policlonales**

25 Los anticuerpos policlonales se hacen aumentar preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que es inmunógena en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina de bovino, o un inhibidor de la tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico,  $\text{SOCl}_2$ , o  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , donde R y  $\text{R}^1$  son grupos alquilo diferentes.  
30

Los animales se inmunizan frente al antígeno, conjugados inmunógenos, o derivados combinando, por ejemplo, 100  $\mu\text{g}$  o 5  $\mu\text{g}$  de la proteína o conjugado (de conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después se reforzó a los animales con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días después se sangraron los animales y se evaluó el suero para el título de anticuerpos. Los animales se reforzaron hasta la meseta del título. Preferentemente, el animal se reforzó con el conjugado del mismo antígeno, pero se conjugó con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Pueden prepararse también conjugados en un cultivo de células recombinantes como proteínas de fusión. También, se usan de forma adecuada agentes de agregación tales como alum para potenciar la respuesta inmunitaria.  
35  
40

##### **(ii) Anticuerpos monoclonales**

Se obtienen anticuerpos monoclonales a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto para posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica que la naturaleza del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos pequeños.  
45  
50

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., Nature, 256: 495 (1975), o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos n.º 4816567).  
55

En el método del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal hospedador adecuado, tal como un hámster, se inmuniza como se ha descrito anteriormente en el presente documento para estimular a los linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después se fusionan los linfocitos con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)).  
60

Las células de hibridoma preparadas de esta forma se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma precursoras no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente  
65



incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

5 Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, apoyan la producción estable de altos niveles del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como un medio HAT. Entre estas, las líneas de células de mieloma preferidas son las líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, Estados Unidos y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos. Se han descrito también las líneas de células de mieloma humano y heteromioma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); y Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

15 El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se ensaya con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de inmunoprecipitación de absorción (ELISA). Se puede determinar la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal, por ejemplo, determinarse mediante el análisis Scatchard de Munson *et al.*, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

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

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan convenientemente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero por procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

30 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que sean capaces de unirse específicamente a genes que codifica las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de murino). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que se transfieren a continuación en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra y col., Curr. Opin. Immunol., 5:256-262 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992).

40 los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpo generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., Nature, 348:552-554 (1990). Clackson y col., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por intercambio de cadenas (Marks y col., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para aislamiento de anticuerpos monoclonales.

50 El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y cadena ligera humana en el lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de Estados Unidos n.º 4816567; y Morrison, et al. (1984) Proc. Natl Acad. Sci. USA 81:6851), o mediante la unión covalente a la secuencia de codificación de la inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido no de inmunoglobulina.

60 Normalmente dichos polipéptidos no de inmunoglobulina se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

### (iii) Anticuerpos humanizados

65 Un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácidos introducidos en este a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se citan a menudo como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente

siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y, posiblemente algunos restos de la FR, están sustituidos por restos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el procedimiento denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se examina respecto toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta entonces como la región marco conservada humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims y col., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia y col., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro procedimiento usa una región marco concreta derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo concreto de cadenas ligera o pesada. El mismo marco se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta y col., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Los anticuerpos pueden estar humanizados con la retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Se pueden preparar anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles habitualmente y son familiares para los expertos en la materia. Se dispone de programas informáticos que ilustran y exponen posibles estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias seleccionadas de la inmunoglobulina candidata. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de tal forma que se logra la característica deseada del anticuerpo, de tal manera que se consigue una afinidad aumentada por el antígeno (o los antígenos) diana. En general, los restos de la región hipervariable están directamente, y más sustancialmente, implicados en la influencia de la unión a antígeno.

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

Los Ejemplos describen la producción de un anticuerpo humanizado dirigido contra ErbB2 ilustrativo. El anticuerpo humanizado puede, por ejemplo, comprender restos de región hipervariable no humana incorporados en un dominio pesado variable humano y puede comprender además una sustitución de la región marco (FR) en una posición seleccionada del grupo que consiste en 69H, 71H y 73H utilizando el sistema de numeración de dominio variable expuesto en Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una realización, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones de FR en dos o todas las posiciones 69H, 71H y 73H. Otros Ejemplo describe la preparación de anticuerpo trastuzumab purificado a partir de la formulación de HERCEPTIN®.

#### (iv) Anticuerpos humanos

Como una alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, es ahora posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo ( $J_H$ ) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal tendrá como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann y col., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); y las patentes de Estados Unidos números 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

Como alternativa, se puede usar tecnología de expresión en fagos (McCafferty y col., *Nature* 348: 552-553 (1990)) para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos *in vitro*, de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina (V) de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, se clonan genes de dominio V de anticuerpo en el marco de un gen de proteína recubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica

el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La presentación de fagos puede realizarse en diversos formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes V para la expresión en fagos. Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991) aislaron una serie de diversos anticuerpos dirigidos contra oxazolona a partir de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo auto antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas en Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), o Griffith y col., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Véanse, también, patentes de Estados Unidos n.º 5565332 y 5573905. Tal como se ha analizado anteriormente, se pueden generar también anticuerpos humanos mediante linfocitos B activados *in vitro* (véanse las patentes de Estados Unidos números 5567610 y 5229275). Se describen anticuerpo humanos dirigidos contra CD30 en solicitud de patente estadounidense con número de serie 10/338.366.

#### (v) Fragmentos de anticuerpos

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, porejemplo, Morimoto et al, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992); y Brennan et al, *Science*, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpo analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH recuperados directamente de *E. coli* y acoplados químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse directamente fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo elegido es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; patente de Estados Unidos n.º 5.571.894; y la patente de Estados Unidos n.º 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos N.º 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

#### (vi) Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos pueden unirse a dos epítopos diferentes de la proteína CD30. Como alternativa, el brazo dirigido contra CD30 puede combinarse con un brazo que se une a los receptores Fc de IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) con el fin de centrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa CD30. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan CD30.

La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión simultánea de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein y co., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpos, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es demasiado complicada y los rendimientos del producto son bajos. Procedimientos similares están descritos en el documento WO 93/08829 y en Trauneker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991). De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos una parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión con la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se inserta en vectores de expresión separados, y se transfecta simultáneamente en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones no son de significancia particular.

En un ejemplo de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de la inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de

inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO/94/04690. Para detalles adicionales acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos, véanse, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

5 De acuerdo con otro enfoque descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5.731.168, la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo se puede diseñar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas secundarias de aminoácidos pequeños procedentes de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen con cadenas secundarias más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) gran(des) cadena(s) sobre la interfase de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo secundarias de aminoácidos grandes con unas pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre los productos finales no deseados tales como los homodímeros.

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

25 El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que puede estar químicamente acoplado para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> específico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los anticuerpos homodiméricos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología del "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) vinculado a un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

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

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

Se contemplan la modificación o modificaciones de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos introduciendo los cambios de nucleótidos adecuados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de deleción, inserción, y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos pueden alterar también los procesos posteriores a la traducción del anticuerpo, tales como cambiar el número o la posición de los sitios de glicosilación.

Un método útil para la identificación de determinados restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferentes para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina" como se describe en Cunningham y Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989). Aquí, se identifican un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferente alanina o polialanina) que influye sobre la interacción de los aminoácidos con el

antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan a continuación introduciendo variantes adicionales o diferentes en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque se predetermine el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita determinarse. Por ejemplo, para analizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se llevó a cabo el barrido de Ala o la mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y se cribaron las variantes de anticuerpos expresadas para la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

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

Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento (a) de la estructura principal del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral:

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

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

Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) seleccionada(s) para el desarrollo tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo precursor a partir del cual se generan. Un modo conveniente de generar dichas variantes de sustitución implican maduración por afinidad utilizando la expresión en fagos. En resumen, algunos sitios de la región hipervariable (por ejemplo, sitios 6-7) están mutados para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpos generadas de esta manera se expresan de una manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado en cada partícula. Las variantes expresadas en fagos se criban a continuación para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se divulga en el presente documento. A fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede llevar a cabo la mutagénesis de barrido de alanina para identificar restos de regiones hipervariables que contribuyen significativamente a la unión del antígeno. De forma alternativa o adicional, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a selección como se describe en el presente documento y se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

Puede ser deseable modificar el anticuerpo con respecto a la función efectora, por ejemplo, con el fin de potenciar la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. De forma alternativa o adicional, pueden introducirse uno o varios restos cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una eliminación de células mediada por complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentadas. Véase Caron et al. J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). También pueden prepararse también anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada utilizando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff y col. Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Como alternativa, puede diseñarse mediante ingeniería genética un anticuerpo que tiene regiones Fc dobles y puede de este modo potenciarse la lisis por el complemento y las capacidades de ADCC. Véase Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor de rescate

en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5739277, por ejemplo. Como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión al receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, o IgG<sub>4</sub>) que es responsable de aumentar la semivida en suero de la molécula de IgG *in vivo*.

5

(viii) Variantes de glicosilación

Los anticuerpos en el ADC de la invención pueden estar glicosilados en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund, (1997) *Chem. Immunol.* 65:111-128; Wright y Morrison, (1997) *TibTECH* 15:26-32). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas alteran la función de la proteína (Boyd et al., (véanse 1996) *Mol. Immunol.* 32:1311-1318; Wittwe y Howard, (1990) *Biochem.* 29:4175-4180), y la interacción intramolecular entre porciones de la glicoproteína que pueden alterar la conformación y la superficie tridimensional presentada de la glicoproteína (Hefferis y Lund, *anteriormente*; Wyss y Wagner, (1996) *Current Opin. Biotech.* 7:409-416). Los oligosacáridos pueden servir también para dirigir una glucoproteína dada a determinadas moléculas basándose en las estructuras de reconocimiento específicas. Por ejemplo, se ha notificado que en la IgG agalactosilada, el resto de oligosacárido se 'voltea' hacia fuera del espacio inter-CH<sub>2</sub> y los restos de N-acetilglucosamina terminales que quedan disponibles para unirse a la proteína de unión a manosa (Malhotra et al., (1995) *Nature Med.* 1:237-243). La eliminación por la glicopeptidasa de los oligosacáridos de CAMPATH-1H (un anticuerpo IgG1 monoclonal de murino humanizado recombinante que reconoce el antígeno CDw52 de los linfocitos humanos) producida en células de ovario de hámster chino (CHO) dio como resultado una reducción completa en la lisis mediada por el complemento (CMCL) (Boyd et al., (1996) *Mol. Immunol.* 32:1311-1318), mientras que la eliminación selectiva de restos de ácido siálico utilizando neuraminidasa no dio como resultado la pérdida de CMCL. Se ha notificado también que la glicosilación de anticuerpos altera la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, células CHO con tetraciclina regularon la expresión de la β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), se notificó que una glicosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc bisectora, tenía una actividad ADCC mejorada (Umana et al. (1999) *Mature Biotech.* 17:176-180).

La glicosilación de anticuerpos es normalmente una unión al átomo de N o una unión al átomo de O. La unión al átomo de N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es un aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de una de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. La glucosilación unida al átomo de O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

Las variantes de glicosilación de anticuerpos son variantes en las que está alterado el modelo de glicosilación de un anticuerpo. Por alterar se entiende eliminar uno o más de los restos de hidratos de carbono que se encuentran en el anticuerpo, añadiendo uno o más restos de hidratos de carbono al anticuerpo, cambiando la composición de la glicosilación (modelo de glicosilación), la extensión de la glicosilación, etc.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unida al átomo de N). La alteración puede realizarse también mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O). De manera similar, la eliminación de sitios de glicosilación puede llevarse a cabo mediante la alteración de aminoácidos en los sitios de glicosilación naturales del anticuerpo.

La secuencia de aminoácidos se altera usualmente alterando la secuencia de ácido nucleico subyacente. Estos métodos incluyen, aunque no de forma limitativa, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que se producen naturalmente) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), la mutagénesis mediante la PCR, y la mutagénesis de casete de una variante preparada inicialmente o una versión no variante del anticuerpo.

La glicosilación (incluyendo el modelo de glicosilación) de los anticuerpos puede alterarse también sin alterar la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende en gran parte de la célula hospedadora utilizada para expresar el anticuerpo. Debido al tipo de célula utilizado para la expresión de glicoproteínas recombinantes, por ejemplo, anticuerpos, ya que la terapéutica potencial rara vez es la célula nativa, se pueden esperar variaciones significativas en el modelo de glicosilación de los anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Hse et al., (1997) *J. Biol. Chem.* 272:9062-9070. Además de la selección de las células hospedadoras, los factores que alteran la glicosilación durante la producción de anticuerpos recombinantes incluyen el modo de crecimiento, la formulación de medios, la densidad del cultivo, la oxigenación, pH, los esquemas de purificación y similares. Se han propuesto varios métodos para alterar el modelo de glicosilación conseguido en un organismo hospedador concreto incluyendo introducir o expresar en exceso determinadas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (patentes de Estados Unidos números 5047335; 5510261; 5278299). La glicosilación, o determinados tipos de glicosilación, puede ser eliminada de la glicoproteína, utilizando, por ejemplo, la endoglicosidasa H (Endo H).

Además, la célula hospedadora recombinante puede diseñarse mediante ingeniería genética, por ejemplo, haciendo defectivo el procesamiento de determinados tipos de polisacáridos. Estas técnicas, y técnicas similares son bien conocidas en la materia.

- 5 La estructura de la glicosilación de los anticuerpos puede analizarse fácilmente mediante técnicas convencionales de análisis de hidratos de carbono, incluyendo la cromatografía de lectina, RMN, Espectrometría de masas, HPLC, GPC, análisis de composición de monosacáridos, digestión enzimática secuencial, y HPAEC-PAD, que utiliza una cromatografía e intercambio aniónico a pH alto para separar los oligosacáridos basándose en la carga. Se conocen también los métodos para liberar oligosacáridos para fines analíticos, e incluyen, sin limitación, tratamiento enzimático (llevado a cabo comúnmente utilizando la péptido-N-glicosidasa F/endo-β-galactosidasa), eliminación utilizando un ambiente alcalino severo para liberar principalmente las estructuras unidas a átomo de O, y los métodos químicos utilizando hidrazina anhídra para liberar los oligosacáridos unidos a átomos de N y a átomos de O.

#### 15 **4.5.2a CRIBADO DE CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO (ADC)**

Los animales transgénicos y las líneas de células son particularmente útiles en el cribado de conjugados de anticuerpo fármaco (ADC) que tienen potencial como tratamientos profilácticos o terapéuticos de enfermedades o trastornos que implican la expresión en exceso de proteínas incluyendo Lewis Y, CD30, CD40 e CD70. Los animales transgénicos y las líneas de células son particularmente útiles en el cribado de conjugados de anticuerpo fármaco (ADC) que tienen potencial como tratamientos profilácticos o terapéuticos de enfermedades o trastornos que implican la expresión en exceso de HER2 (US6632979). El cribado de un ADC útil puede implicar administrar ADC candidato en un intervalo de dosis al animal transgénico, y la evaluación en varios puntos temporales del(los) efecto(s) del ADC sobre la enfermedad o el trastorno que se está evaluando. De forma alternativa o adicional, el fármaco se puede administrar antes de o de manera simultánea con exposición a un inductor de la enfermedad, cuando proceda. El ADC candidato puede cribarse en serie e individualmente, o en paralelo en medio o formato de cribado de alto rendimiento. La velocidad a la cual se puede cribar el ADC para la utilidad de los tratamientos profilácticos o terapéuticos de enfermedades o trastornos está limitada solo por la velocidad de síntesis o la metodología de cribado, incluyendo la detección/medida/análisis de los datos.

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

35 Otro ejemplo es un método de cribado que comprende (a) poner en contacto células de una línea de células de enfermedad de Hodgkin con un fármaco candidato ADC y (b) evaluar la capacidad del ADC candidato de bloquear la actividad del ligando de CD40.

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

45 Un ejemplo es un método de cribado que comprende (trasplantar células de una línea celular de cáncer estable a un animal no humano, (b) administrar un fármaco ADC candidato al animal no humano y (c) determinar la capacidad del candidato de inhibir la formación de tumores procedentes de la línea de células trasplantadas. La invención se refiere también a un método de cribar ADC candidatos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizada por la expresión en exceso de HER2 que comprende (a) poner en contacto células a partir de una línea celular de cáncer de mama estable con un fármaco candidato y (b) evaluar la capacidad del ADC candidato de inhibir el crecimiento de la línea celular estable.

50 Otro ejemplo es un método de cribado que comprende (a) poner en contacto células de una línea de células de cáncer estable con un fármaco candidato ADC y (b) evaluar la capacidad del ADC candidato de bloquear la actividad del ligando de HER2. En una realización, se evalúa la capacidad del ADC candidato de bloquear la unión a heregulina. En otra realización, se evalúa la capacidad del ADC candidato de bloquear la fosforilación de la tirosina estimulada por el ligando.

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

65 Otro ejemplo es un método de cribado que comprende (a) administrar un fármaco candidato ADC a un mamífero no humano transgénico que expresa en exceso en sus células de las glándulas mamarias una proteína HER2 humana nativa o un fragmento de la misma, en el que dicho mamífero transgénico ha integrado de forma estable en su genoma una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína HER2 humana o un fragmento de la misma que tiene la actividad biológica de HER2 humana nativa, unida operativamente a las secuencias reguladoras de la

transcripción dirigiendo su expresión a la glándula mamaria, y desarrolla un tumor de mama que no responde o responde mal al tratamiento con el anticuerpo dirigido contra HER2, o a un animal no humano que transporta un tumor trasplantado procedente de dicho mamífero no humano transgénico; y (b) evaluar el efecto del ADC candidato sobre la enfermedad o trastorno diana. Sin limitaciones, la enfermedad o trastorno puede ser un cáncer que expresa en exceso HER2, tal como cáncer de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas y vejiga. El cáncer preferentemente es cáncer de mama que expresa HER2 en al menos aproximadamente 500.000 copias por célula, más preferentemente al menos aproximadamente 2.000.000 copias por célula. Los fármacos candidatos ADC pueden, por ejemplo, evaluarse para su capacidad de inducir la muerte celular y/o la apoptosis, utilizando métodos de ensayo bien conocidos en la técnica, y que se describen a partir de ahora en el presente documento.

En un ejemplo, se cribó el ADC candidato administrándose al animal transgénico en un intervalo de dosis, y se evaluó la respuesta fisiológica del animal a los compuestos en el tiempo. La administración puede ser oral, o mediante inyección adecuada. Dependiendo de la naturaleza química del compuesto que se está evaluando. En algunos casos, puede ser adecuado administrar el compuesto junto con cofactores que potenciarían la eficacia del compuesto. Si se usan las líneas de células derivadas de los animales transgénicos sujeto para cribar los compuestos útiles para tratar diversos trastornos, se añaden los compuestos de ensayo al medio de cultivo celular en un momento adecuado, y se evalúa la respuesta celular al compuesto en el tiempo utilizando los ensayos bioquímicos y/o histológicos adecuados. En algunos casos, puede ser adecuado aplicar el compuesto de interés al medio de cultivo junto con cofactores que potenciarían la eficacia del compuesto.

Por tanto, se proporcionan en el presente documento ensayos para identificar ADC que se dirige específicamente y se une a una proteína diana, cuya presencia está correlacionada con función celular anómala, y en la patogénesis de la proliferación y/o la diferenciación celular que está causalmente relacionada con el desarrollo de tumores.

Para identificar un ADC que bloquea la activación del ligando de un receptor ErbB (por ejemplo, ErbB2), se puede determinar la capacidad del compuesto para bloquear la unión del ligando ErbB a las células que expresan el ErbB (ErbB2) (por ejemplo, en conjugación con otro receptor ErbB con el que el receptor ErbB de interés forma un hetero-oligómero de ErbB). Por ejemplo, se pueden incubar células aisladas del animal transgénico que expresa en exceso HER2 y transfectarse para expresar otro receptor de ErbB (con el cual HER2 forma un heterooligómero), es decir cultivar, con el ADC y a continuación exponerse al ligando de ErbB marcado. A continuación puede evaluarse la capacidad del compuesto para bloquear la unión del ligando con el receptor de ErbB en el hetero-oligómero de ErbB puede evaluarse después.

Por ejemplo, la inhibición de la unión de la heregulina (HRG) a las líneas celulares de tumor de mama, que expresan en exceso HER2 y establecidas en el presente documento a partir de mamíferos no humanos transgénicos (por ejemplo, ratones), por el ADC candidato puede llevarse a cabo utilizando cultivos monocapa en hielo en un formato de placas de 24 pocillos. Se pueden añadir anticuerpos monoclonales dirigidos contra ErbB2 a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos. A continuación puede añadirse rHRG $\beta_{1177-224}$  (25.000 cpm) marcada con  $^{125}\text{I}$ , y se puede continuar la incubación durante 4 a 16 horas. Se pueden preparar curvas de respuesta a la dosis y puede calcularse un valor de  $\text{CI}_{50}$  (actividad citotóxica) para el compuesto de interés.

De forma alternativa o adicional, Se puede evaluar la capacidad de un ADC para bloquear la fosforilación de tirosina estimulada por el ligando de ErbB de un receptor de ErbB presente en un hetero-oligómero de ErbB. Por ejemplo, se pueden incubar las líneas celulares establecidas procedentes de animales transgénicos con un ADC de ensayo y a continuación ensayarse con respecto a actividad de fosforilación de tirosina dependiente de ligando de ErbB usando un anticuerpo monoclonal (que está conjugado opcionalmente con una marca detectable). Está también disponible el ensayo de activación del receptor de la quinasa descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5766863 para determinar la activación del receptor de ErbB y el bloqueo de esa actividad por el compuesto.

En un ejemplo, se puede explorar el ADC que inhibe la estimulación de HRG de fosforilación de tirosina en p180 en células MCF7 esencialmente como se describe a continuación. Por ejemplo, Se puede sembrar en placas una línea celular establecida a partir de un animal transgénico HER2 en placas de 24 pocillos y puede añadirse el compuesto a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos a temperatura ambiente; después puede añadirse rHRG $\beta_{1177-244}$  a cada pocillo hasta una concentración final de 0,2 nM, y la incubación puede continuarse durante aproximadamente 8 minutos. Puede aspirarse el medio de cada pocillo, y pueden detenerse las reacciones mediante la adición de 100  $\mu\text{l}$  de tampón de muestra SDS (SDS al 5 %, DTT 25 mM; y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Cada muestra (25  $\mu\text{l}$ ) puede someterse a electroforesis en un gel de un gradiente 4-12 % (Novex) y después transferirse electroforéticamente a una membrana de difluoruro de polivinilideno. Pueden desarrollarse inmunotransferencias antifosfotirosina (a 1  $\mu\text{g/ml}$ ), y puede cuantificarse la intensidad de la banda reactiva predominante a  $M_r$  -180,000 mediante densitometría de reflectancia. Un método alternativo para evaluar la inhibición de la fosforilación del receptor es el ensayo KIRA (activación del receptor de la quinasa) de Sadick et al. (1998) Jour. of Pharm. and Biomed. Anal. Se puede usar alguno de los anticuerpos monoclonales bien establecidos contra HER2 que son conocidos por inhibir la estimulación de HRG de la fosforilación de la tirosina p180 como control positivo en este ensayo. Puede prepararse una curva de respuesta a la dosis para la inhibición de la estimulación de HRG de la fosforilación de la tirosina p180 como se determina por densitometría de reflectancia y puede calcularse una  $\text{CI}_{50}$  para el compuesto de interés.



Se pueden evaluar también los efectos inhibidores del crecimiento de un ensayo ADC sobre líneas de células derivadas de un animal transgénico HERR2, por ejemplo, esencialmente como se describe en Schaefer et al. (1997) Oncogene 15:1385-1394. De acuerdo con este ensayo, las células pueden tratarse con un compuesto de ensayo a varias concentraciones durante 4 días y teñirse con cristal violeta o el colorante redox azul Alamar. La incubación con el compuesto puede mostrar un efecto inhibidor del crecimiento en esta línea celular similar al presentado por el anticuerpo monoclonal 2C4 en células MDA-MB-175 (Schaefer *et al.*, anteriormente). En una realización adicional, la HRG exógena puede no invertir significativamente esta inhibición.

Para identificar los compuestos inhibidores del crecimiento que se dirigen específicamente a un antígeno de interés, se pueden cribar compuestos que inhiben el crecimiento de células cancerosas que expresan en exceso el antígeno de interés derivado de animales transgénicos, se puede llevar a cabo el ensayo descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5677171. De acuerdo con este ensayo, las células cancerosas que expresan en exceso el antígeno de interés se hacen crecer en una mezcla 1:1 de F12 y medio DMEM suplementado con suero de feto de bovino al 10 %, glutamina y penicilina estreptomycin. Las células se siembran en placas a 20.000 células en una placa de cultivo celular de 35 mm (placa de 2 ml/35 mm) y se añade el compuesto de ensayo a diversas concentraciones. Después de seis días, se cuenta el número de células, en comparación con las células no tratadas usando un contador de células COULTER™ electrónico. Se pueden seleccionar aquellos compuestos que inhiben el crecimiento celular en aproximadamente un 20-100 % o aproximadamente 50-100 % como compuestos inhibidores del crecimiento.

Para seleccionar los compuestos que inducen la muerte celular, se puede evaluar la pérdida de la integridad de membrana como se indica mediante, por ejemplo, PI, azul tripán o 7AAD con respecto al control. El ensayo de captación de PI utiliza células aisladas del tejido tumoral de interés de un animal transgénico. De acuerdo con este ensayo, las células se cultivan en medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM):F-12 de Ham (50:50) suplementado con FBS inactivado térmicamente al 10 % (Hyclone) y L-glutamina 2 mM. Por tanto, el ensayo se lleva a cabo en ausencia de complemento y células inmunoefectoras. Se sembraron las células a una densidad de  $3 \times 10^6$  por placa en placas de 100 x 20 mm y se dejó que se unieran durante la noche. A continuación se retiró el medio y se sustituyó con medio reciente solo o medio que contenía diversas concentraciones del compuesto. Se incubaron las células durante un periodo de tiempo de 3 días. Tras cada tratamiento, las monocapas se lavaron con PBS y se separaron mediante tripsinización. A continuación las células se centrifugaron a 1200 RPM durante 5 minutos a 4 °C, el aglomerado se resuspendió en 3 ml de tampón de unión a  $Ca^{2+}$  frío (Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM,  $CaCl_2$  2,5 mM) y se distribuyeron en alícuotas en tubos de 12 x 75 mm con un tapón de filtro de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de los grupos de células. A continuación los tubos reciben IP (10 µg/ml). Las muestras se pueden analizar utilizando el citómetro de flujo FACSCAN™ y el programa informático FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Aquellos compuestos que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular, como se determina por la captación de IP pueden seleccionarse como anticuerpos inductores de muerte celular.

Para seleccionar los compuestos que inducen la apoptosis, se llevó a cabo un ensayo de unión a anexina utilizando células establecidas procedentes del tejido tumoral de interés del animal transgénico. Las células se cultivaron y sembraron en placas como se ha analizado en el párrafo anterior. El medio se retiró a continuación y se reemplazó con medio nuevo solo o medio que contenía 10 µg/ml del conjugado del fármaco de anticuerpo (ADC). Tras un periodo de incubación de tres días, las monocapas se lavaron con PBS y se separaron mediante tripsinización. Las células se centrifugaron a continuación, se resuspendieron en tampón de unión con  $Ca^{2+}$  y se distribuyeron en alícuotas en tubos como se ha analizado anteriormente para el ensayo de muerte celular. Los tubos reciben después anexina marcada (por ejemplo anexina V-FTIC) (1 µg/ml). Las muestras pueden analizarse usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Los compuestos que inducen niveles estadísticamente significativos de unión a anexina en relación con el control se seleccionan como anticuerpos inductores de la apoptosis.

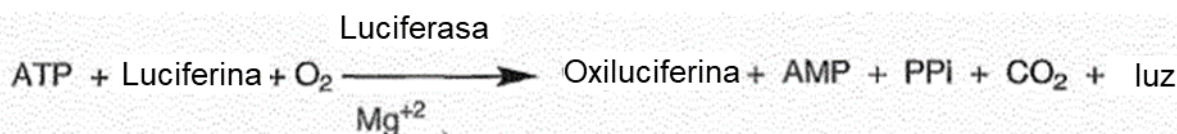
#### 4.5.3 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR IN VITRO

En general, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) se mide: exponiendo las células de mamífero que tenían proteínas receptoras al anticuerpo del ADC en un medio de cultivo celular; cultivando las células durante un periodo de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 5 días; y midiendo la viabilidad celular. Se usaron los ensayos *in vitro* basados en células para medir la viabilidad (proliferación), citotoxicidad, e inducción de la apoptosis (activación de la caspasa) del ADC de la invención.

Se midió la potencia *in vitro* de los conjugados de fármacos de anticuerpos mediante un ensayo de proliferación celular (Ejemplo 18, Figuras 7-10). El ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® es un método de ensayo homogéneo comercialmente disponible (Promega Corp., Madison, WI), basado en la expresión recombinante de la luciferasa en *Coleoptera* (patente de Estados Unidos con números 5583024; 5674713 y 5700670). Este ensayo de proliferación celular determina el número de células viables en un cultivo basándose en la cuantificación del ATP presente, un indicador de las células metabólicamente activas (Crounc et al.(1993) J. Immunol. Meth. 160: 81-88, patente de Estados Unidos n.º 6,602,677). Se llevó a cabo el ensayo CellTiter-Glo® en un formato de 96 pocillos, convirtiéndolo en adecuado para cribado automatizado de alto rendimiento (HTS) (Cree et al (1995) AntiCancer

Drugs 6:398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica añadir el reactivo individual (CellTiter-Glo® Reagent) directamente a células cultivadas en medio suplementado con suero. No se requiere el lavado de las células, la retirada del medio y múltiples etapas de pipeteado. El sistema detecta tan poco como 15 células/pocillo en un formato de 384 pocillos en 10 minutos después de añadir el reactivo y mezclar. Las células se pueden tratar de manera continua con ADC, o se pueden tratar y separar del ADC. En general, las células tratadas de forma breve, es decir, 3 horas, mostraron los mismos efectos de potencia que las células tratadas de forma continua.

El formato de "adición-mezcla-medida" da como resultado la lisis celular y la generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. La cantidad de ATP es directamente proporcional al número de células presentes en el cultivo. El ensayo CellTiter-Glo® genera una señal luminiscente de "tipo brillo", producida por la reacción de la luciferasa, que tiene una vida media generalmente mayor de cinco horas, dependiendo del tipo de célula y del medio utilizados. Las células viables se reflejan en unidades de luminiscencia relativas (ULR). El sustrato, luciferina de escarabajo, se decarboxila oxidativamente por la luciferasa de luciérnaga recombinante con conversión simultánea de ATP a AMP y generación de fotones. La vida media extendida elimina la necesidad de usar inyectores de reactivos y proporciona flexibilidad para el procesamiento en modo continuo o discontinuo de múltiples placas. Se puede usar este ensayo de proliferación celular con diversos formatos multipocillo, por ejemplo, un formato de 96 o 384 pocillos. Se pueden registrar los datos mediante un luminómetro o un dispositivo de formación de imágenes de una cámara CCD. La salida de la luminiscencia se presenta como unidades de luz relativa (ULR), medida en el tiempo.



Se pueden medir los efectos antiproliferativos de los conjugados de anticuerpo y fármaco mediante la proliferación celular, el ensayo de destrucción celular *in vitro* contra cuatro diferentes líneas de células de tumores de mama (Figuras 7-10). Se establecieron los valores de CI<sub>50</sub> para SK-BR-3 y BT-474 que son conocidas por expresar en exceso la proteína receptora de HER2. La Tabla 2a muestra las mediciones de potencia (CI<sub>50</sub>) de conjugados de anticuerpo y fármaco ilustrativos en el ensayo de proliferación celular contra células SK-BR-3. La Tabla 2b muestra las mediciones de potencia (CI<sub>50</sub>) de conjugados de anticuerpo y fármaco ilustrativos en el ensayo de proliferación celular contra células BT-474.

Conjugados de anticuerpo y fármaco: Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3,9 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAB, 4,1 MMAE/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 3,3 MMAE/Ab; y Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3,7 MMAF/Ab no inhibió la proliferación de células MCF-7 (Figura 9).

Conjugados de anticuerpo y fármaco: Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 4,1 MMAE/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 3,3 MMAE/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3,7 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab; Trastuzumab-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3,9 MMAF/Ab; y Trastuzumab-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab no inhibió la proliferación de células MDA-MB-468 (Figura 10).

las células MCF-7 y MDA-MB-468 no expresan en expresa en exceso la proteína del receptor HER2. Los conjugados de fármaco y anticuerpo dirigido contra HER2 descritos en el presente documento muestran, por tanto, selectividad para la inhibición de las células que expresan HER2.

Tabla 2a células SK-BR-3

Conjugado de anticuerpo y fármaco H = trastuzumab unido mediante un enlace cisteína [cys] salvo donde se indica	CI <sub>50</sub> (µg ADC/ml)
H-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab	0,008
H-MC-MMAF, 4,8 MMAF/Ab	0,002
H-MC-vc-PAB-MMAE,	0,007
H-MC-vc-PAB-MMAE	0,015
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab	0,0035 - 0,01
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4,4 MMAF/Ab	0,006 - 0,007
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4,8 MMAF/Ab	0,006
H-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3,9 MMAF/Ab	0,0035

ES 2 697 327 T3

H-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab	0,0035
H-MC-vc-PAB-MMAE, 4,1 MMAE/Ab	0,010
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab	0,007
H-MC-vc-PAB-MMAE, 4,1 MMAE/Ab	0,015
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3,7 MMAF/Ab.	0,010
H-MC-vc-PAB-MMAE, 7,5 MMAE/Ab	0,0025
H-MC-MMAE, 8,8 MMAE/Ab	0,018
H-MC-MMAE, 4,6 MMAE/Ab	0,05
H-MC-(L)val-(L)cit-PAB-MMAE, 8,7 MMAE/Ab	0,0003
H-MC-(D)val-(D)cit-PAB-MMAE, 8,2 MMAE/Ab	0,02
H-MC-(D)val-(L)cit-PAB-MMAE, 8,4 MMAE/Ab	0,0015
H-MC-(D)val-(L)cit-PAB-MMAE, 3,2 MMAE/Ab	0,003
H-Trastuzumab	0,083
H-vc-MMAE, unido mediante una lisina [lys]	0,002
H-phe-lys-MMAE, unido mediante una lisina [lys]	0,0015
4D5-Fc8-MC-vc-PAB-MMAF, 4,4 MMAF/Ab	0,004
Hg-MC-vc-PAB-MMAF, 4,1 MMAF/Ab	0,01
7C2-MC-vc-PAB-MMAF, 4,0 MMAF/Ab	0,01
4D5 Fab-MC-vc-PAB-MMAF, 1,5 MMAF/Ab	0,02
Anti-TF Fab-MC-vc-PAB-MMAE*	-

Tabla 2b células BT474

Conjugado de anticuerpo y fármaco H = trastuzumab unido mediante un enlace cisteína	CI <sub>50</sub> (µg ADC/ml)
H-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab	0,008
H-MC-MMAF, 4,8 MMAF/Ab	0,002
H-MC-vc-PAB-MMAE, 4,1 MMAE/Ab	0,015
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab	0,02 - 0,05
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4,4 MMAF/Ab	0,01
H-MC-vc-PAB-MMAF, 4,8 MMAF/Ab	0,01
H-MC-vc-PAB-MMAE, 3,3 MMAE/Ab	0,02
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3,7 MMAF/Ab.	0,02
H-MC-vc-PAB-MMAF, 3,8 MMAF/Ab	0,015
H-MC-(N-Me)vc-PAB-MMAF, 3,9 MMAF/Ab	0,010
H-MC-MMAF, 4,1 MMAF/Ab	0,00015
H-MC-vc-PAB-MMAE, 7,5 MMAE/Ab	0,0025
H-MC-MMAE, 8,8 MMAE/Ab	0,04
H-MC-MMAE, 4,6 MMAE/Ab	0,07
4D5-Fc8-MC-vc-PAB-MMAF, 4,4 MMAF/Ab	0,008
Hg-MC-vc-PAB-MMAF, 4,1 MMAF/Ab	0,01

7C2-MC-vc-PAB-MMAF, 4,0 MMAF/Ab	0,015
4D5 Fab-MC-vc-PAB-MMAF, 1,5 MMAF/Ab	0,04
Anti-TF Fab-MC-vc-PAB-MMAE*	-
<p>H = trastuzumab                      7C2 = anticuerpo de murino dirigido contra HER2 que se une a un epítipo diferente de trastuzumab.                      FcS = mutante que no se une a FcRn                      Hg = "Hingeless" 4D5 humanizado de longitud completa, donde las cisteínas de la cadena pesada están mutadas a serinas. Expresado en <i>E. coli</i> (por tanto, no glicosilado).                      Anti-TF Fab = fragmento de anticuerpo dirigido contra factor tisular                      * actividad contra células MDA-MB-468</p>	

- 5 En un descubrimiento sorprendente e inesperado, la actividad de proliferación celular *in vitro* da como resultado el ADC en las Tablas 2a y 2b muestra generalmente que ADC con un número promedio bajo de restos de fármaco por anticuerpo mostró eficacia, por ejemplo,  $Cl_{50} < 0,1 \mu\text{g}$  de ADC/ml. El resultado sugiere que al menos para el ADC de trastuzumab, la relación óptima de restos de fármaco por anticuerpo puede ser menor de 8, y puede ser aproximadamente 2 a aproximadamente 5.

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

- 10 Se investigaron la farmacocinética de aclaramiento del plasma y la estabilidad de ADC en ratas y en macacos. Se midió la concentración del plasma en el tiempo. La Tabla 2c muestra los datos farmacocinéticos de los conjugados de anticuerpo fármaco y otras muestras dosificadas en ratas. Las ratas son un modelo no específico para los anticuerpos del receptor ErbB, debido a que no se sabe que la rata exprese proteínas del receptor de HER2.

- 15 Tabla 2c Farmacocinética en ratas H = trastuzumab unido mediante una cisteína [cys] excepto donde se indica una dosis de 2 mg/kg excepto donde se indica

Dosis de muestra mg/kg	ABCinf día* µg/ml	CL ml/día/kg	Cmax µg/ml	T ½ Term. días	% Conj.
H-MC-vc-PAB-MMAE (Total Ab)	78,6	26,3	39,5	5,80	40,6
H-MC-vc-PAB-MMAE (Conj.)	31,1	64,4	33,2	3,00	
H-MC-vc-PAB-MMAF (Total Ab)	170	12,0	47,9	8,4	50,0
H-MC-vc-PAB-MMAF (Conj.)	83,9	24,0	44,7	4,01	
H-MC-MMAE (Total Ab)	279	18,9	79,6	7,65	33
H-MC-MMAE (Conj.) 5 mg/kg	90,6	62,9	62,9	4,46	
H-MC-MMAF (Total Ab)	299	6,74	49,1	11,6	37
H-MC-MMAF (Conj.)	110	18,26	50,2	4,54	
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (Total Ab)	306	6,6	78,7	11,9	19,6
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (Conj.)	59,9	33,4	82,8	2,1	
H-Me-vc-PAB-MMAF (Total Ab)	186	10,8	46,9	8,3	45,3
H-Me-vc-PAB-MMAF Conj.)	84,0	23,8	49,6	4,3	
H-Me-vc-PAB-MMAE (Total Ab)	135	15,0	44,9	11,2	23,8
H-Me-vc-PAB-MMAE (Conj.)	31,9	63,8	45,2	3,0	
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (Total Ab)	306	6,6	78,7	11,9	19,6
H-MC-vc-MMAF, wo/PAB, (Conj.)	59,9	33,4	82,8	2,1	
H-MC-(D)val-(L)cit-PAB-MMAE (Total Ab)	107	19,2	30,6	9,6	38,1
H-MC-(D)val-(L)cit-PAB-MMAE (Conj.)	40	50,4	33,7	3,98	
H-MC-(Me)-vc-PAB-MMAE, Total Ab	135,1	15,0	44,9	11,2	23,8
H-MC-(Me)-vc-PAB-MMAE, Conj.	31,9	63,8	45,2	2,96	

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

5 ABC inf es el área bajo la curva de concentración-tiempo en plasma desde el momento de la dosificación hasta el infinito y es una medida de la exposición total a la entidad medida (fármaco, ADC). CL se define como el volumen de plasma aclarado de la entidad medida en tiempo unitario y se expresa normaliza a peso corporal. El término T1/2 es la semivida del fármaco en el cuerpo medida durante su fase de eliminación. El término % Conj. es la cantidad relativa de ADC en comparación con el anticuerpo total detectado, mediante ensayos de inmunoafinidad ELISA separados ("Analytical Methods for Biotechnology Products", Ferraiolo et al, págs 85-98 en Pharmacokinetics of Drugs (1994) P.G. Welling and L.P. Balant, Eds., Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 110, Springer-Verlag. El cálculo de % Conj. es simplemente  $ABC_{inf} \text{ de ADC} \div ABC_{inf} \text{ de Ab total}$ , y es un indicador general de la estabilidad del enlazador, aunque pueden tener efecto otros factores y mecanismos.

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

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

## 20 EFICACIA *IN VIVO*

Se midió la eficacia *in vivo* del ADC de la invención mediante el modelo de ratón del explante transgénico de HER2 de alta expresión. Se propagó un aloinjerto procedente del ratón transgénico Fo5 mmtv que no responde a, o responde mal a, tratamiento con HERCEPTIN®. Se trataron los sujetos una vez con ADC y se controlaron durante 3-6 semanas para medir el tiempo hasta la duplicación del tumor, destrucción logarítmica de células, y acortamiento del tumor. Se llevaron a cabo el seguimiento de la respuesta a la dosis y experimentos multidosis.

30 Los tumores surgen fácilmente en ratones transgénicos que expresan una forma activada mutacionalmente de *neu*, el homólogo de rata de HER2, pero el HER2 que está expresado en exceso en cánceres de mama no está mutado y la formación del tumor es mucho menos sólida en ratones transgénicos que expresan en exceso HER2 no mutado

(Webster et al. (1994) Semin. Cancer Biol. 5:69-76).

5 Para mejorar la formación del tumor con HER2 no mutado, se produjeron ratones transgénicos utilizando ADNc  
plásmido de HER2 en el que se eliminó un ATG en la dirección 5' a fin de evitar el inicio de la traducción en dichos  
codones ATG en la dirección 5', que de otra forma reducirían la frecuencia del inicio de la traducción desde el codón  
de inicio auténtico en la dirección 3' de HER2 (por ejemplo, véase Child et al. (1999) J. Biol. Chem. 274: 24335-  
24341). Adicionalmente, se añadió un intrón quimérico al extremo 5', que debería potenciar también el nivel de  
10 expresión como se ha notificado anteriormente (Neuberger y Williams (1988) Nucleic Acids Res. 16: 6713; Buchman  
y Berg (1988) Mol. Cell. Biol. 8:4395; Brinster et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:836). El intrón quimérico se  
derivó de un vector de Promega, el vector de expresión en mamífero pCI-neo (pb 890-1022). El extremo 3' del ADNc  
está flanqueado por los exones 4 y 5 de la hormona de crecimiento humana y las secuencias de poliadenilación. Por  
otra parte, se usaron ratones FVB debido a que esta cepa es más susceptible al desarrollo del tumor. Se usó el  
15 promotor de MMTV-LTR para asegurar la expresión de HER2 específico de tejido en la glándula mamaria. Se  
alimentaron los animales con la dieta AIN 76A a fin de aumentar la susceptibilidad a la formación del tumor (Rao et  
al. (1997) Breast Cancer Res. and Treatment 45:149-158).

Tabla 2d Mediciones del tumor en un modelo de aloinjerto en ratón - Tumor de mama MMTV-HER2 Fo5, una única  
dosis de ratones lampiños atímicos en el día 1 (T = 0) excepto donde se indica H = trastuzumab unido mediante una  
cisteína [cys] excepto donde se indica

Fármacos de muestra por anticuerpo	Dosis	Ti	PR	CR	Tiempo hasta duplicación del tumor (días)	La media destrucción celular
Vehículo					2-5	0
H-MC-vc-PAB-MMAE 8,7 MMAE/Ab	1250 µg/m <sup>2</sup>	5/5	4/7	0/7	18	1,5
H-MC-vc-PAB-MMAF 3,8 MMAF/Ab	555 µg/m <sup>2</sup>	2/5	2/7	5/7	69	6,6
H-MC(Me)-vc-PAB-MMAF					>50	6,4
H-MC-MMAF 4,8 MMAF/Ab	9,2 mg/kg Ab 550 µg/m <sup>2</sup> a 0, 7, 14 y 21 días	7/7	6/7	0/7	63	9
H-MC-MMAF 4,8 MMAF/Ab	14 mg/kg Ab 840 µg/m <sup>2</sup> a 0, 7, 14 y 21 días	5/5	5/7	2/7	>63	
H-MC-vc-PAB-MMAF 5,9 MMAF/Ab	3,5 mg/kg Ab 300 µg/m <sup>2</sup> a 0, 21, y 42 días	5/6	1/7	3/7	>36	
H-MC-vc-PAB-MMAF 5,9 MMAF/Ab	4,9 mg/kg Ab 425 µg/m <sup>2</sup> a 0, 21, y 42 días	4/7	2/7	5/7	>90	
H-MC-vc-PAB-MMAF 5,9 MMAF/Ab	6,4 mg/kg Ab 550 µg/m <sup>2</sup> a 0, 21, y 42 días	3/6	1/7	6/7	>90	
H-(L)val-(L)cit-MMAE 8,7 MMAE/Ab	10 mg/kg	7/7	1/7	0/7	15,2	1,1

ES 2 697 327 T3

H-MC-MMAE 4,6 MMAE/Ab	10 mg/kg	7/7	0/7	0/7	4	0,1
H-(D)val-(D)cit- MMAE 4,2 MMAE/Ab	10 mg/kg	7/7	0/7	0/7	3	
H-(D)val-(L)cit- MMAE 3,2 MMAE/Ab	13 mg/kg	7/7	0/7	0/7	9	0,6
H-MC(Me)-vc-MMAE 3,0 MMAE/Ab	13 mg/kg	7/7	3/7	0/7	17	1,2
H-(L)val-(D)cit- MMAE 3,5 MMAE/Ab	12 mg/kg	7/7	0/7	0/7	5	0,2
H-vc-MMAE 8,7 MMAE/Ab	10 mg/kg	7/7			17	
H-cys-vc-MMAF 3,8 MMAF/Ab	1 mg/kg	7/7			3	
H-cys-vc-MMAF 3,8 MMAF/Ab	3 mg/kg	7/7			>17	
H-cys-vc-MMAF 3,8 MMAF/Ab	10 mg/kg	4/7	4/7	3/7	>17	
H-MC-vc-MMAF- TEG 4 MMAF/Ab	10 mg/kg	3/6	1/7	6/7	81	7,8
H-MC-vc-MMAF- TEG 4 MMAF/Ab	10 mg/kg q3wk x 3	0/5	0/7	7/7	81	7,9
H-vc-MMAF (lote 1)	10 mg/kg	4/6	2/8	5/8		
H-vc-MMAF (lote 2)	10 mg/kg	7/8	1/8	1/8		
H-MC-MMAF	10 mg/kg 550 µg/m <sup>2</sup>	8/8	1/8	0/8	18	
H-(Me)-vc-MMAF	10 mg/kg	3/7	2/8	5/8		
H-vc-MMAE 7,5 MMAE/Ab	3,7 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	6/6	0/7	1/7	17	2,3
H-vc-MMAE 7,5 MMAE/Ab	7,5 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	5/7	3/7	3/7	69	10
anti IL8-vc-MMAE 7,5 MMAE/Ab	7,5 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	7/7	0/7	0/7	5	0,5
anti IL8-vc-MMAE 7,5 MMAE/Ab	3,7 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	6/6	0/7	0/7	3	0,2
H-fk-MMAE 7,5 MMAE/Ab	7,5 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28	7/7	1/7	0/7	31	4,4
H-fk-MMAE 7,5 MMAE/Ab	3,7 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	7/7	0/7	0/7	8,3	0,9
anti EL8-fk-MMAE 7.5 MMAE/Ab	7,5 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	7/7	0/7	0/7	6	0,5

ES 2 697 327 T3

anti IL8-fk-MMAE 7.5 MMAE/Ab	3,7 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	7/7	0/7	0/7	3	0,1
Trastuzumab	7,5 mg/kg a 0, 7, 14, 21, 28 días	7/7	0/7	0/7	5	0,4
H-vc-MMAE 8.7 MMAE/Ab	10 mg/kg 1250 µg/m <sup>2</sup>	6/6	3/6	0/6	15	1,3
H-vc-MMAE	10 mg/kg 1250 µg/m <sup>2</sup> a 0, 7, y 14 días	7/7	5/7		>19	
H-vc-MMAE	3 a 0, 7, y 14 días	7/7			8	
H-vc-MMAE	1 mg/kg a 0, 7, y 14 días	7/7			7	
H-vc-MMAF	10 mg/kg	8/8	5/8		>21	
H-vc-MMAF	10 mg/kg a 0, 7, y 14 días	4/7	4/7	3/7	>21	
H-vc-MMAF	3 mg/kg a 0, 7, y 14 días	7/7			6	
H-vc-MMAF	1 mg/kg a 0, 7, y 14 días	8/8			4	
Trastuzumab	10 mg/kg a 0 y 7 días	8/8			3	
Hg-MC-vc-PAB-MMAF 4,1 MMAF/Ab	10 mg/kg a 0 días	6/7	3/8	5/8	56	5,1
Fc8-MC-vc-PAB-MMAF 4,4 MMAF/Ab	10 mg/kg a 0 días	7/7	6/8	0/8	25	2,1
7C2-MC-vc-PAB-MMAF 4 MMAF/Ab	10 mg/kg a 0 días	5/6	6/8	1/8	41	3,7
H-MC-vc-PAB-MMAF 5,9 MMAF/Ab	10 mg/kg a 0 días	3/8	3/8	5/8	62	5,7
2H9-MC-vc-PAB-MMAE		9/9			> 14 días	
2H9-MC-vc-PAB-MMAF		9/9			> 14 días	
11D10-vc-PAB-MMAE		9/9			> 14 días	
11D10-vc-PAB-MMAF		9/9			11 días	
<p>7C2 = anticuerpo de murino dirigido contra HER2 que se une a un epítipo diferente de trastuzumab.                      Fc8 = mutante que no se une a FcRn                      Hg = "Hingeless" 4D5 humanizado de longitud completa, donde las cisteínas de la cadena pesada están mutadas a serinas. Expresado en <i>E. coli</i> (por tanto, no glicosilado).                      2H9 = Anti-EphB2R                      11D10 = Anti-0772P</p>						

El término Ti es el número de animales en el grupo de estudio a T=0 4 animales totales en el grupo. El término PR es el número de animales que consiguen una remisión parcial del tumor ÷ animales con tumor en T = 0 en el grupo. El término CR es el número de animales que alcanzan una remisión completa del tumor ÷ animales con tumor en T = 0 en el grupo. La expresión destrucción logarítmica de células es el tiempo en días para que se duplique el volumen



del tumor - el tiempo en días para el volumen tumoral del control para que se divida a la mitad por 3,32 X para que se duplique el volumen tumoral en los animales del control (dosificados con vehículo). El cálculo de la destrucción logarítmica de células tiene en cuenta el retraso en el crecimiento del tumor resultante del tratamiento y el tiempo de duplicación del volumen tumoral del grupo del control. La actividad antitumoral de ADC se clasifica con valores de destrucción logarítmica de células de:

5

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

La Figura 13 muestra el cambio promedio de volumen tumoral con el tiempo en ratones lampiños atímicos con aloinjertos del tumor mamario MMTV-HER2 Fo5 que recibieron dosis el Día 0 con: Vehículo, Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE (1250 µg/m<sup>2</sup>) y Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF (555 µg/m<sup>2</sup>). (H = Trastuzumab). Se retardó el crecimiento de los tumores mediante el tratamiento con ADC en comparación con el nivel de crecimiento del control (Vehículo). La Figura 14 muestra el cambio promedio de volumen tumoral con el tiempo en ratones lampiños atímicos con aloinjertos del tumor mamario MMTV-HER2 Fo5 que recibieron dosis el Día 0 con 10 mg/kg de (660 µg/m<sup>2</sup>) de Trastuzumab-MC-MMAE y 1250 µg/m<sup>2</sup> de Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE. La Figura 15 muestra el cambio promedio de volumen tumoral con el tiempo en ratones lampiños atímicos con aloinjertos del tumor mamario MMTV-HER2 Fo5 que recibieron dosis de 650 µg/m<sup>2</sup> de trastuzumab-MC-MMAF. La Tabla 2d y las Figuras 13-15 muestran que el ADC tiene una fuerte actividad antitumoral en el aloinjerto de un tumor positivo para HERR2 (Fo5) que surge originalmente en un ratón transgénico MMTV-HER2. el anticuerpo solo (*por ejemplo*, Trastuzumab) no tiene una actividad antitumoral significativa en este modelo (Erickson et al. patente de Estados Unidos n.º 6632979). Como se ilustra en las Figuras 13-15, se retardó el crecimiento de los tumores mediante el tratamiento con ADC en comparación con el nivel de crecimiento del control (Vehículo).

10

15

20

En un descubrimiento sorprendente e inesperado, la actividad antitumoral *in vivo* resultante del ADC en la Tabla 2d muestra generalmente que ADC con un número promedio bajo de restos de fármaco por anticuerpo, mostró eficacia, por ejemplo, tiempo de duplicación del tumor > 15 días destrucción logarítmica de células promedio > 1,0. La Figura 16 muestra que para el conjugado de anticuerpo fármaco, trastuzumab-MC-vc-PAB- MMAF, el volumen tumoral medio disminuyó y no progresa cuando la relación MMAF:trastuzumab era 2 y 4, mientras que el tumor progresó en una relación de 5,9 y 6, pero a una velocidad inferior que la del vehículo (tampón). La velocidad de progresión en este modelo de xenoinjerto de ratón fue aproximadamente la misma, *es decir*, 3 días, para el vehículo y trastuzumab. El resultado sugiere que al menos para el ADC de trastuzumab, la relación óptima de restos de fármaco por anticuerpo puede ser menor de aproximadamente 8, y puede ser aproximadamente 2 a aproximadamente 4.

25

30

#### 4.5.5 TOXICIDAD EN ROEDORES

Se evaluaron los conjugados de anticuerpo y fármaco, y un control ADC-menos, "Vehículo", en un modelo de toxicidad aguda en rata. Se investigó la toxicidad de los ADC mediante el tratamiento de ratas Sprague-Dawley macho y hembra con los ADC y la posterior inspección y análisis de los efectos sobre varios órganos. Las observaciones ordinarias incluyen cambios en los pesos corporales y signos de lesiones y sangrado. Se llevaron a cabo los parámetros de la patología clínica (química sérica y hematología), histopatología, y necropsia en animales que se habían dosificado.

35

40

Se considera que la pérdida de peso, o el cambio de peso con respecto a los animales a los que se dosificó solo con vehículo, en animales tras la dosificación con ADC es un indicador ordinario y general de toxicidad sistémica o localizada. Las Figuras 17-19 muestran los efectos de diversos ADC y el control (vehículo) tras la dosificación en el peso corporal de la rata.

45

Se midió la hepatotoxicidad por la elevada concentración de enzimas hepáticas, los elevados números de figuras mitóticas y apoptóticas y la necrosis de los hepatocitos. Se observó toxicidad hematolinfoide por el agotamiento de leucocitos, principalmente granulocitos (neutrófilo), y/o plaquetas, y la implicación de órganos linfoides, es decir, atrofia o actividad apoptótica. Se notificó también toxicidad debida a lesiones en el tracto gastrointestinal tales como números elevados de figuras mitóticas y apoptóticas y enterocolitis degenerativa.

50

Las enzimas indicadoras de lesión hepática que se estudiaron incluyen:

55

AST (aspartato aminotransferasa)

- Localización: citoplásmica; hígado, corazón, músculo esquelético, riñón
- Relación hígado:plasma de 7000:1
- T1/2: 17 h

60

ALT (alanina aminotransferasa)

- Localización: citoplásmica; hígado, riñón, corazón, músculo esquelético
- Relación hígado:plasma de 3000:1

- 5
- T<sub>1/2</sub>: 42 h; variación diurna
  - GGT (g-glutamyl transferasa)
  - Localización: membrana plasmática de células con elevada capacidad secretora o absortiva; hígado, riñón, intestino
- 10
- Mal predictor de lesión hepática; comúnmente elevado en los trastornos de los conductos biliares

Se estudiaron los perfiles de toxicidad de trastuzumab-MC-val-cit-MMAF, trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF, trastuzumab-MC-MMAF y trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF en ratas Sprague-Dawley hembras (Ejemplo 19). El anticuerpo trastuzumab humanizado no se une de forma apreciable al tejido de rata, y cualquier se consideraría no específica. Las variantes a niveles de dosis de 840 y 2105  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  de MMAF se compararon con trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF a 2105  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ .

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

Las ratas tratadas con trastuzumab-MC-MMAF (grupos 6 y 7) fueron indistinguibles de los animales del control tratados con vehículo en ambos niveles de dosis; *es decir*, este conjugado mostró un perfil de seguridad superior en este modelo. Las ratas tratadas con trastuzumab-MC-val-cit-MMAF (sin el resto PAB autoinmolable; grupos 2 y 3) mostró cambios dependientes de la dosis típicos de conjugados MMAF; la extensión de los cambios fue menor en comparación de un conjugado MC-val-cit-PAB-MMAF de longitud completa (grupo 8). Los recuentos de plaquetas en el día 5 fueron a aproximadamente el 30 % de los valores iniciales en los animales del grupo 3 (dosis alta de trastuzumab-MC-val-cit-MMAF) en comparación con el 15 % en los animales del grupo 8 (dosis alta de trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF). Elevación de las enzimas hepáticas AST y ALT, de bilirrubina y la extensión de la trombocitopenia fue más evidente en animales tratados con trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF (grupos 4 y 5) de una manera dependiente de la dosis; los animales del grupo 5 (grupo de dosis alta) mostraron niveles de ALT en el día 5 de aproximadamente 10x el valor inicial y se redujeron las plaquetas en aproximadamente el 90 % en el momento de la necropsia.

Se dosificaron también ratas Sprague Dawley hembras a altos niveles (Ejemplo 19, estudio de dosis alta: Grupos 2, 3, 4) con trastuzumab-MC-MMAF, y vehículo del control (Grupo 1). Se observaron leves señales de toxicidad, incluyendo una elevación dependiente de la dosis de enzimas hepáticas ALT, AST y GOT. En el día 5, los animales en el grupo de la dosis más alta mostraron una elevación de 2 veces de ALT y una elevación de 5 veces de AST; GGT es también elevada (6U/l). Los niveles de la enzima muestran una tendencia hacia la normalización en el día 12. Hubo una granulocitosis leve en los tres grupos de dosis en el día 5, el recuento de plaquetas permaneció esencialmente sin cambiar en todos los animales. Los cambios morfológicos fueron leves; los animales tratados al nivel de dosis de 4210  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  (Grupo 2) mostraron una histología no remarcable del hígado, bazo, timo, los intestinos y la médula ósea. Se observó una actividad apoptótica y mitótica aumentada levemente en el timo y el hígado, respectivamente en animales tratados al nivel de dosis de 5500  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  (Grupo 3). La médula ósea era normocelular, pero mostró evidencias de hiperplasia granulocítica, que es consistente con la granulocitosis absoluta observada en los recuentos de sangre periférica en estos animales. Los animales a la dosis más elevada en el grupo 4 mostraron cualitativamente las mismas características; la actividad mitótica en el hígado aparece algo aumentada en comparación con los animales en el Grupo 3. También, se observó hematopoyesis extramedular en el bazo y el hígado.

EphB2R es un receptor de la tirosina quinada TM de tipo 1 con una estrecha homología entre ratón y ser humano, y se expresa en exceso en las células del cáncer colorrectal. 2H9 es un anticuerpo contra EphB2R. El anticuerpo puro no tiene efecto sobre el crecimiento del tumor, pero las células que expresan EphB2R destruyeron 2H9-val-cit-MMAE y mostraron eficacia en un modelo de xenoinjerto de ratón que utiliza tumores CXF1103 de colon humano (Mao et al (2004) Cancer Res. 64:781-788). 2H9 y 7C2 son anticuerpos de IgG 1 de ratón dirigidos contra HER2. Se compararon los perfiles de toxicidad de 2H9-MC-val-cit-PAB-MMAF (3.7 MMAF/Ab), 7C2-MC-val-cit-PAB-MMAF (4 MMAF/Ab), y trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF (5.9 MMAF/Ab). Las diferencias en la estructura de cada inmunocombinado o la porción de fármaco del inmunocombinados pueden alterar la farmacocinética y en última instancia, el perfil de seguridad. El anticuerpo trastuzumab humanizado no se une de forma apreciable al tejido de rata, y cualquier toxicidad se consideraría no específica.

TOXICIDAD/SEGURIDAD EN MACACOS

De forma similar a la del estudio de toxicidad/seguridad en rata, se trataron los macacos con ADC seguido por mediciones de la enzima hepática, y la inspección y el análisis de los efectos sobre varios órganos. Las observaciones ordinarias incluyen cambios en los pesos corporales y signos de lesiones y sangrado. Se llevaron a cabo los parámetros de la patología clínica (química sérica y hematología), histopatología, y necropsia en animales que se habían dosificado (Ejemplo n.º 19).

El conjugado de anticuerpo fármaco, H-MC-vc-PAB-MMAE (H = trastuzumab unido a través de cisteína) no mostró evidencias de toxicidad hepática en cualquiera de los niveles de dosis ensayados. Los granulocitos de la sangre periférica mostraron agotamiento tras una única dosis de 1100 mg/m<sup>2</sup> con recuperación completa 14 días después de la dosis. el conjugado de anticuerpo fármaco H-MC-vc-PAB-MMAF mostró elevación de las enzimas hepáticas a un nivel de dosis de 550 (transitorio) y 880 mg/m<sup>2</sup>, no hubo evidencias de granulocitopenia y disminución transitoria (grupos 2 y 3) de plaquetas dependiente de la dosis.

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

Los Compuestos ilustrativos y los Conjugados ilustrativos se pueden preparar usando los procedimientos sintéticos detallados a continuación en los Esquemas 5-16. Como se describe con mayor detalle a continuación, los Compuestos ilustrativos o los Conjugados ilustrativos se pueden preparar cómodamente usando un Enlazador que tiene un sitio reactivo para la unión al Fármaco y al Ligando. En un ejemplo, un Enlazador tiene un sitio reactivo que tiene un grupo electrófilo que reacciona con un grupo nucleófilo presente en una unidad de ligando, tal como aunque no de forma limitativa, a un anticuerpo. Los grupos nucleófilos útiles en un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleófilo de un anticuerpo reacciona con un grupo electrófilo de un Enlazador y constituye un enlace covalente con una unidad enlazadora. Los grupos electrófilos útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, grupos maleimida y haloacetamida. El grupo electrófilo proporciona un sitio cómodo para unión del anticuerpo.

En otro ejemplo, un Enlazador tiene un sitio reactivo que tiene un grupo nucleófilo que es reactivo con un grupo electrófilo presente en un anticuerpo. Los grupos electrófilos de un anticuerpo útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, grupos carbonilo de aldehídos y acetonas. El heteroátomo de un grupo nucleófilo de un Enlazador puede reaccionar con un grupo electrófilo de un anticuerpo y formar un enlace covalente con el anticuerpo. Los grupos nucleófilos de un Enlazador incluyen, aunque no de forma limitativa, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato, y arilhidrazida. El grupo electrófilo de un anticuerpo proporciona un sitio cómodo para su unión con un Enlazador.

Los grupos funcionales de ácido carboxílico y los grupos funcionales de cloroformiato son también sitios reactivos para un Enlazador ya que pueden reaccionar con grupos amino secundarios de un Fármaco para formar un enlace amida. También útil como sitio reactivo es un grupo funcional de carbonato de un Enlazador, tal como aunque no de forma limitativa carbonato de p-nitrofenilo, que puede reaccionar con un grupo amino de un Fármaco, tal como, aunque no de forma limitativa, N-metil valina, para formar un enlace carbamato. Normalmente, los fármacos basados en péptidos se pueden preparar formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptido. Dichos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schrörler y K. Lubke, "The Peptides", volumen 1, págs. 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos.

La síntesis de una unidad ensanchadora ilustrativa que tiene un grupo maleimida electrófilo se ilustra más adelante en los Esquemas 8-9. Los métodos sintéticos generales útiles para la síntesis de un Enlazador se describen en el Esquema 10. El Esquema 11 muestra la construcción de un Enlazador que tiene un grupo val-cit, un grupo maleimida electrófilo y un grupo Separador autoimolable de PAB. El Esquema 12 representa gráficamente la síntesis de un Enlazador que tiene un grupo phe-lys, un grupo maleimida electrófilo, con y sin el grupo Separador autoimolable de PAB. El Esquema 13 presenta un detalle general para la síntesis de un Compuesto de fármaco-enlazador, mientras que el Esquema 14 presenta una ruta alternativa para preparar un Compuesto de fármaco-enlazador. El Esquema 15 representa gráficamente la síntesis de un enlazador ramificado que contiene un grupo BHMS. El Esquema 16 detalla la unión de un anticuerpo con el Compuesto de fármaco-enlazador para formar un Conjugado de fármaco-enlazador-anticuerpo, y el Esquema 14 ilustra la síntesis de los Conjugados de fármaco-enlazador-anticuerpo que tienen, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, 2 o 4 fármacos por anticuerpo.

Como se describe con mayor detalle a continuación, los Conjugados ilustrativos se preparan cómodamente usando un Enlazador que tiene dos o más sitios reactivos para la unión al Fármaco y al Ligando. En un ejemplo, un Enlazador tiene un sitio reactivo que tiene un grupo electrófilo que reacciona con un grupo nucleófilo presente en una unidad de ligando, tal como un anticuerpo. Los grupos nucleófilos útiles en un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleófilo de un anticuerpo reacciona con un grupo electrófilo de un Enlazador y constituye un enlace covalente con una unidad enlazadora. Los grupos electrófilos útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, grupos maleimida y haloacetamida. El grupo electrófilo proporciona un sitio cómodo para unión del anticuerpo.

En otro ejemplo, un Enlazador tiene un sitio reactivo que tiene un grupo nucleófilo que reacciona con un grupo electrófilo presente en un Ligando, tal como un anticuerpo. Los grupos electrófilos de un anticuerpo útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, grupos carbonilo de aldehídos y acetonas. El heteroátomo de un grupo nucleófilo de un Enlazador puede reaccionar con un grupo electrófilo de un anticuerpo y formar un enlace covalente con el anticuerpo. Los grupos nucleófilos de un Enlazador incluyen, aunque no de forma limitativa, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato, y arilhidrazida. El grupo electrófilo de un anticuerpo proporciona un sitio cómodo para su unión con un Enlazador.

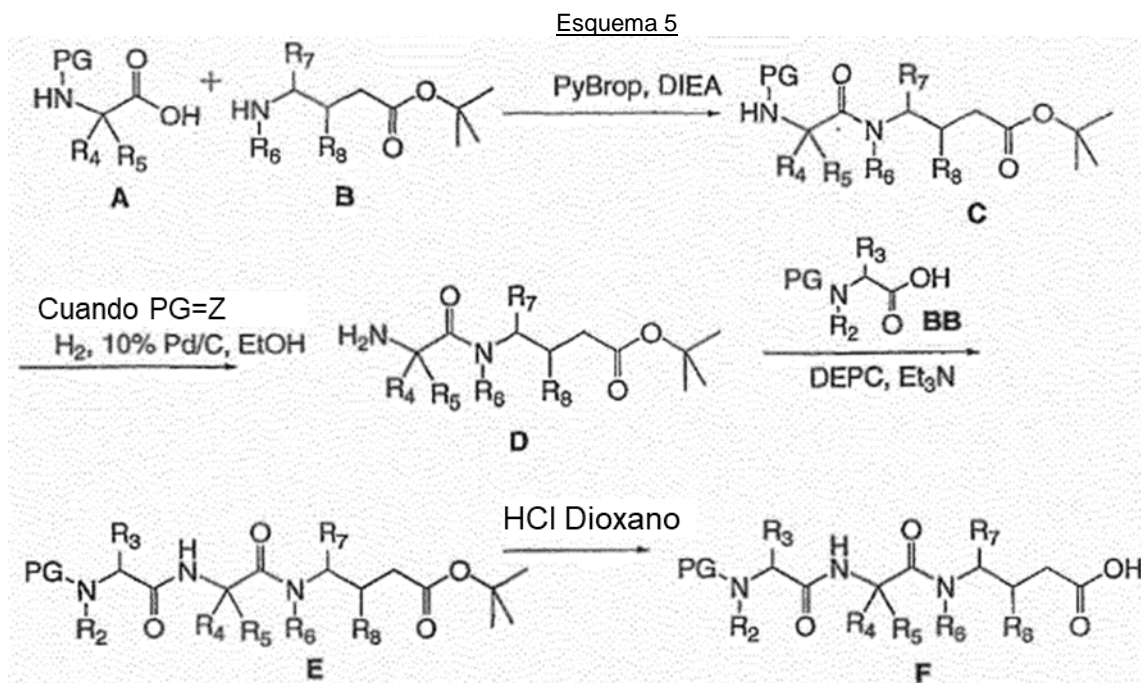
#### 4.6.1 SÍNTESIS DE RESTOS DE FÁRMACO

Normalmente, los fármacos basados en péptidos se pueden preparar formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptido. Dichos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lubke, "The Peptides", volumen 1, págs. 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 generales de: patente de Estados Unidos n.º 5635483; patente de Estados Unidos n.º 5780588; Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; y Pettit y col. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863.

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

El Esquema 5 ilustra la síntesis de una unidad de tripéptido F en el extremo N que es un intermedio útil para la síntesis de compuestos de fármaco de Fórmula **1b**.



Como se ilustra en el Esquema 5, un aminoácido protegido **A** (donde PG representa un grupo protector de amina,  $R^4$  se selecciona entre hidrógeno, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_8$ , carbociclo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ , -O-(alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_8$ ), -arilo, alquilarilo, alquilo-(carbociclo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ ), heterociclo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ , alquil-(heterociclo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ ) en la que  $R^5$  se selecciona entre H y metilo; o  $R^4$  y  $R^5$  juntos, tienen la fórmula  $-(\text{CR}^a\text{R}^b)_n-$  en la que  $R^a$  y  $R^b$  se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_8$  y carbociclo  $\text{C}_3\text{-C}_8$  y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6 y forma un anillo con el átomo de carbono al que están unidos) se acopla con el *t*-butil éster **B** (donde  $R^6$  se selecciona entre -H y -alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_8$ ; y  $R^7$  se selecciona entre hidrógeno, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_8$ , carbociclo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ , -O-(alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_8$ ), -arilo, alquilarilo, alquilo-(carbociclo  $\text{C}_3\text{-C}_8$ ), heterociclo  $\text{C}_3\text{-C}_8$  y alquil-(heterociclo  $(\text{C}_3\text{-C}_8)$ ) en condiciones de acoplamiento adecuadas, por ejemplo, en presencia de  $\text{PyBrop}$  y diisopropiletilamina, o mediante el uso de DCC (véase, por ejemplo, Miyazaki, K. et. al. *Chem. Pharm. Bull.* 1995, 43(10), 1706-1718).

Los grupos protectores PG adecuados, y los métodos sintéticos adecuados para proteger un grupo amino con un grupo protector son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Greene, T.W. y Wuts, P.G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2.<sup>a</sup> edición, 1991, John Wiley & Sons. Los aminoácidos protegidos ilustrativos A son

PG-Ile y, particularmente, PG-Val, mientras que otros aminoácidos protegidos incluyen, aunque de forma no limitativa: PG-ciclohexilglicina, PG-ciclohexilalanina, PG-ácido aminociclopropano-1-carboxílico, PG-ácido aminoisobutírico, PG-fenilalanina, PG-fenilglicina, y PG-*tert*-butilglicina. Z es un grupo protector ilustrativo. Fmoc es un grupo protector ilustrativo. Un *t*-butil éster **B** ilustrativo es dolaisoleuina *t*-butil éster.

5 El dipéptido **C** se puede purificar, por ejemplo, usando cromatografía, y posteriormente desprotegerse, por ejemplo, usando H<sub>2</sub> y Pd al 10 % en C en etanol cuando PG es benciloxicarbonilo, o usando dietilamina para la eliminación de un grupo protector de Fmoc. La amina resultante **D** forma rápidamente un enlace peptídico con un aminoácido **BB** (el que R<sup>1</sup> se selecciona entre -H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbocicilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>; y R<sup>2</sup> se selecciona entre -H y -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> juntos, tienen la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>- en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6 y forman un anillo con el átomo de nitrógeno al que están unidos; y R<sup>3</sup> se selecciona entre hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, alquilarilo, alquilo-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y -alquil-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>). *N,N*-Dialquil aminoácidos son aminoácidos ilustrativos para **BB**, tal como la *N,N*-dimetilvalina comercialmente disponible. Otros *N,N*-dialquilaminoácidos se pueden preparar mediante bis-alkilación reductora usando procedimientos conocidos (véase, por ejemplo, Bowman, R.E, Stroud, H.H J. Chem. Soc., 1950, 1342-1340). Fmoc-Me-L-Val y Fmoc-Me-L-glicina son dos aminoácidos ilustrativos **BB** útiles para la síntesis de N-monoalquil derivados. La amina **D** y el aminoácido **BB** reaccionan para proporcionar el tripéptido **E** usando el reactivo de acoplamiento DEPC con trietilamina como base. El grupo protector del extremo C de **E** se desprotegerse a continuación usando HCl para proporcionar el compuesto tripéptido de fórmula **F**.

La metodología de acoplamiento con DEPC ilustrativa y la metodología de acoplamiento con PyBrop mostradas en el Esquema 5 se detallan a continuación en el Procedimiento General A y el Procedimiento General B, respectivamente. La metodología ilustrativa para la desprotección de una amina Z-prottegida mediante hidrogenación catalítico se detalla a continuación en el Procedimiento general C.

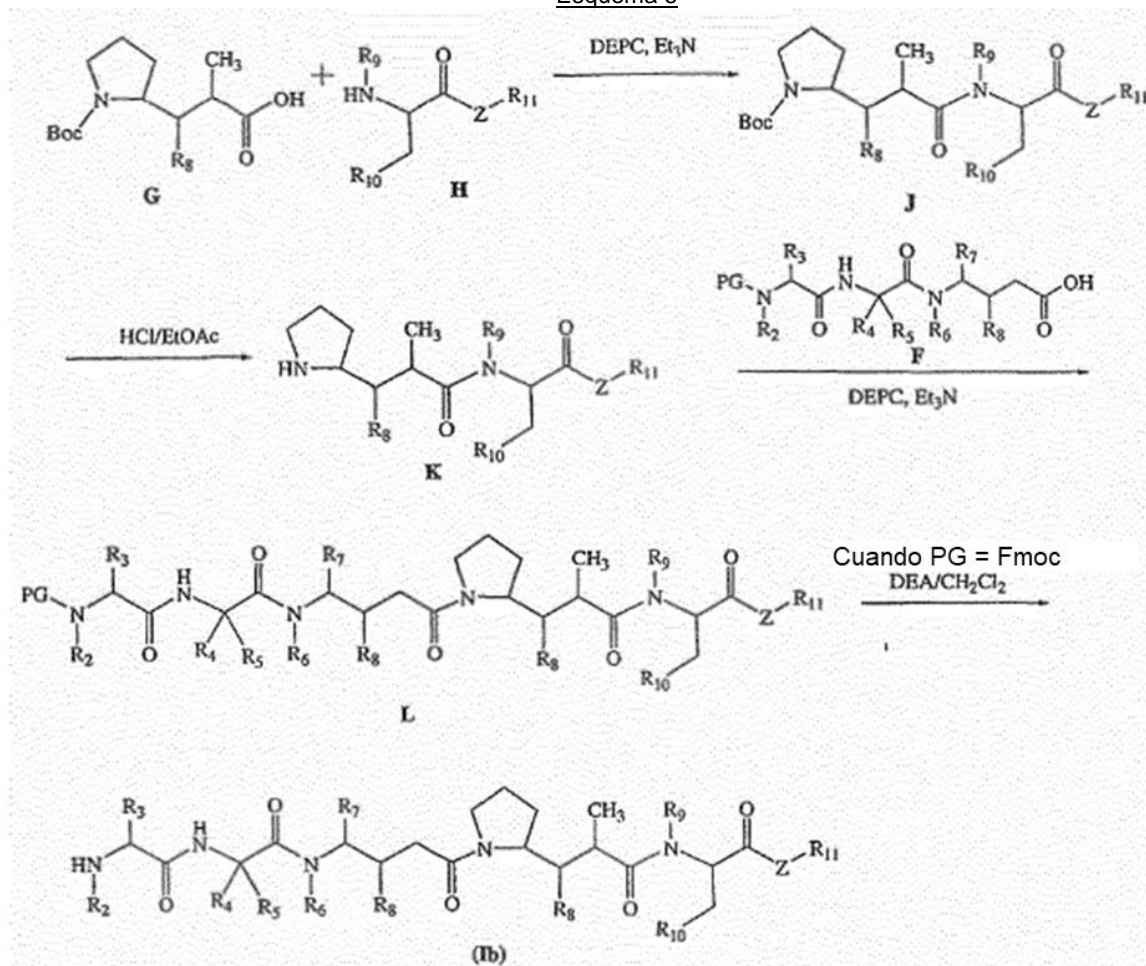
**Procedimiento General A: Síntesis de péptidos usando DEPC.** El aminoácido *N*-prottegido o *N,N*-disustituido o péptido **D** (1,0 eq.) y una amina **BB** (1,1 eq.) se diluyeron con un disolvente orgánico aprótico, tal como diclorometano(0,1 a 0,5 M). A continuación se añadió una base orgánica tal como trietilamina o diisopropiletilamina (1,5 eq.), seguido por DEPC (1,1 eq.). La solución resultante se agitó, preferentemente bajo atmósfera de argón, durante hasta 12 mientras se controlaba por HPLC o TLC. El disolvente se retiró al vacío a temperatura ambiente, y el producto en bruto se purificó usando, por ejemplo, HPLC o cromatografía en columna ultrarrápida (columna de gel de sílice). Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron al vacío para proporcionar el tripéptido **E** que se secó a vacío durante la noche.

**Procedimiento General B: Síntesis de péptidos usando PyBrop.** El aminoácido **B** (1,0 eq.), que tiene opcionalmente un grupo protector de carboxilo, se diluyó con un disolvente orgánico aprótico tal como diclorometano o DME para proporcionar una solución con una concentración entre 0,5 y 1,0 mM, a continuación se añadió diisopropiletilamina (1,5 eq.). Se añadió el aminoácido protegido con Fmoc o Z **A** (1,1 eq.) en forma sólida en una porción, a continuación se añadió PyBrop (1,2 eq.) a la mezcla resultante. La reacción se siguió mediante TLC o HPLC, seguido por un procedimiento de elaboración similar al descrito en el Procedimiento general A.

**Procedimiento General C: Eliminación de Z mediante hidrogenación catalítica.** El aminoácido o péptido C protegido con Z se diluyó con etanol para proporcionar una solución de una concentración comprendida entre 0,5 y 1,0 mM en un recipiente adecuado, tal como un matraz de fondo redondo de paredes gruesas. Se añadió paladio al 10 % sobre carbono (5-10 % p/p) y la mezcla de reacción se puso bajo una atmósfera de hidrógeno. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC y por lo general se completó en 1-2 h. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho prelavado de celite, y el celite se volvió a lavar con un disolvente orgánico polar, tal como metanol después de la filtración. La solución de eluyente se concentró al vacío para proporcionar un residuo que se diluyó con un disolvente orgánico, preferentemente tolueno. A continuación, el disolvente orgánico se eliminó al vacío para proporcionar la amina desprotegida **C**.

El Esquema 6 muestra un método útil para fabricar un dipéptido en el extremo C de fórmula **K** y un método para acoplar el dipéptido de fórmula **K** con el tripéptido de fórmula **F** para fabricar compuestos de Fórmula **Ib**.

Esquema 6



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

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

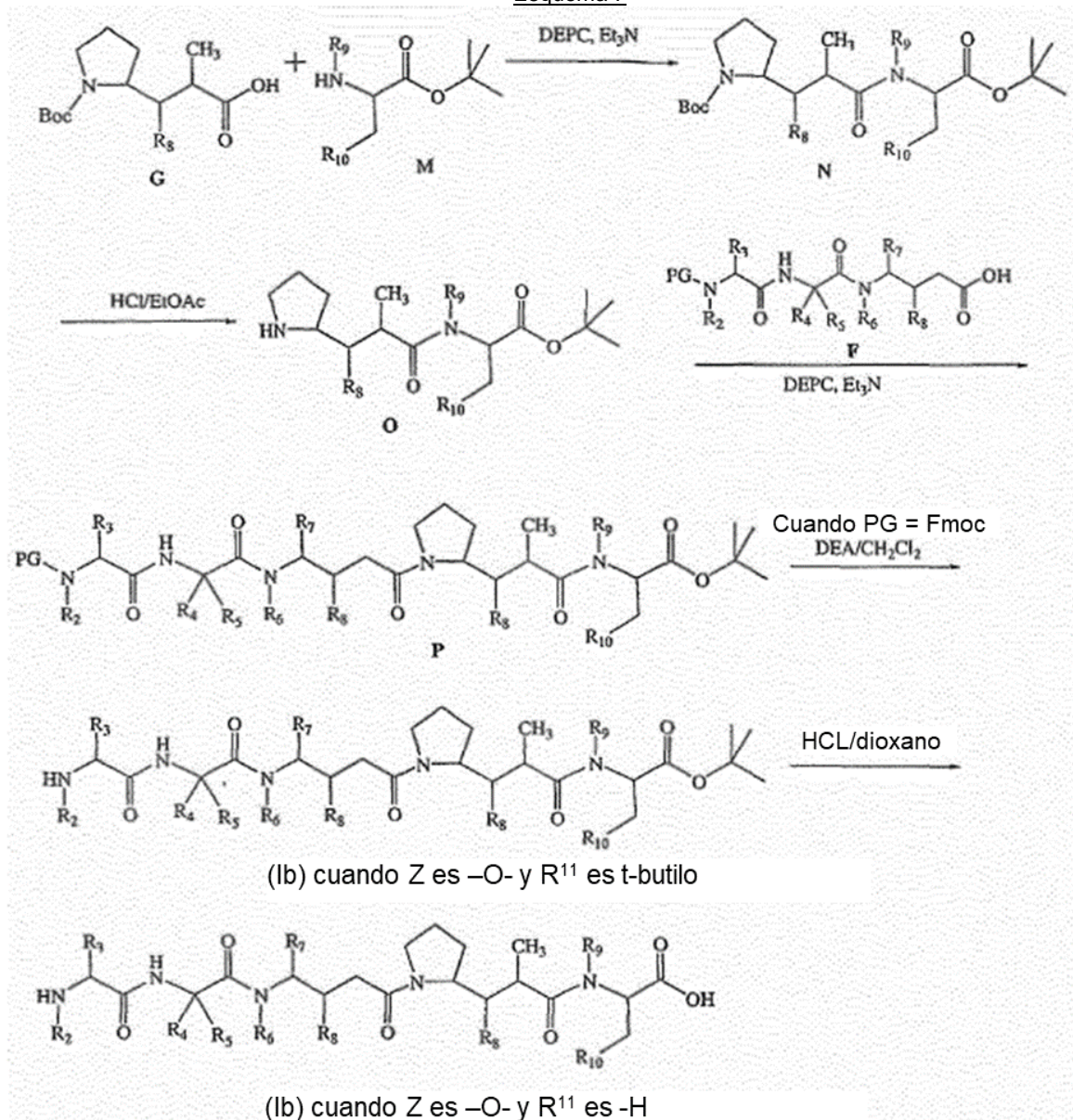
**Procedimiento General D: Síntesis de fármaco.** Una mezcla del dipéptido **K** (1,0 eq.) y el tripéptido **F** (1 eq.) se diluye con un disolvente orgánico aprótico, tal como diclorometano, para formar una solución 0,1 M, después un ácido fuerte, tal como ácido trifluoroacético (1/2 v/v) se añadió a lo anterior y la mezcla resultante se agitó bajo atmósfera de nitrógeno durante dos horas a 0 °C. La reacción se puede controlar usando TLC o, preferentemente, HPLC. El disolvente se retiró al vacío y el residuo resultante se secó azeotrópicamente dos veces, preferentemente usando tolueno. El residuo resultante se secó con alto vacío durante 12 h y después se diluyó con un disolvente orgánico aprótico, tal como diclorometano. A continuación se añadió una base orgánica tal como trietilamina o diisopropilamina (1,5 eq.), seguido por bien PyBrop (1,2 eq.) o DEPC (1,2 eq.) dependiendo de la funcionalidad química del resto. La mezcla de reacción se controló mediante TLC o HPLC y tras su finalización, la reacción se sometió a un procedimiento de elaboración similar o idéntico al descrito en el Procedimiento General A.

25 **Procedimiento General E: Eliminación de Fmoc usando dietilamina.** Un Fármaco **L** protegido con Fmoc se diluyó con un disolvente orgánico aprótico tal como diclorometano y a la solución resultante se añadió dietilamina (1/2 v/v). El progreso de la reacción se controló mediante TLC o HPLC y normalmente se completa en unas 2 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo resultante se secó azeotrópicamente, preferentemente usando tolueno, después se secó con alto vacío para proporcionar el Fármaco **Ib** que tiene un grupo amino desprotegido.

30 El Esquema 7 muestra un método útil para preparar derivados de MMAF de Fórmula (Ib).



Esquema 7



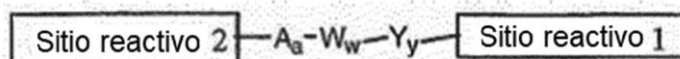
5 El dipéptido O puede prepararse fácilmente por condensación del aminoácido modificado Boc-Dolaprina G (véase, por ejemplo, Pettit, G.R., et al. *Synthesis*, 1996, 719-725), con un aminoácido protegido de fórmula M usando agentes de condensación bien conocidos para la química de péptidos, tal como, por ejemplo, DEPC en presencia de trietilamina, como se muestra en los Esquemas 5 y 6.

10 El dipéptido de fórmula O se puede acoplar a continuación con un tripéptido de fórmula F usando el Procedimiento general D para preparar los compuestos de MMAF protegidos con Fmoc de fórmula P que posteriormente se pueden desproteger usando el Procedimiento general E para proporcionar compuestos de fármaco MMAF de fórmula (Ib).

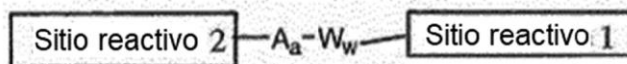
Por tanto, los métodos anteriores son útiles para preparar Fármacos como se describe en el presente documento.

#### 4.6.2 SÍNTESIS DE ENLAZADOR DE FÁRMACO

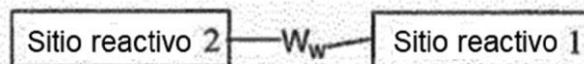
15 Para preparar un Compuesto de fármaco-enlazador, el Fármaco se hace reaccionar con un sitio reactivo del Enlazador. En general, el Enlazador puede tener la estructura:



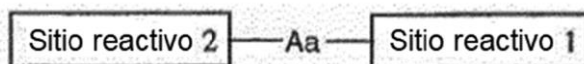
donde están presentes tanto una Unidad separadora (-Y-) como una Unidad ensanchadora (-A-). Como alternativa, el Enlazador puede tener la estructura:



5 en la que la Unidad separadora (-Y-) está ausente. El Enlazador puede también tener la estructura:



10 en la que tanto la unidad ensanchadora (-A-) como la Unidad separadora (-Y-) están ausentes. El Enlazador puede también tener la estructura:

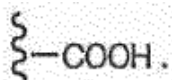


15 en la que tanto la unidad de Aminoácido (W) como la Unidad separadora (Y) están ausentes.

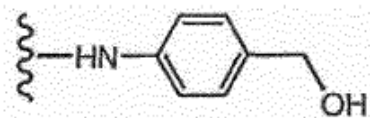
20 En general, un Enlazador adecuado tiene una Unidad de aminoácido unida a una Unidad ensanchadora opcional y una Unidad separadora opcional. El Sitio reactivo 1 está presente en el extremo de la Unidad separadora y el Sitio reactivo 2 está presente en el extremo de la Unidad ensanchadora. Si no hay Unidad separadora, entonces el Sitio reactivo 1 está presente en el extremo C de la Unidad de aminoácido.

25 En un ejemplo, el Sitio reactivo n.º 1 es reactivo con un átomo de nitrógeno del Fármaco, mientras que el Sitio reactivo n.º 2 es reactivo con un grupo sulfhidrido del Ligando. Los Sitios reactivos 1 y 2 pueden ser reactivos con diferentes grupos funcionales.

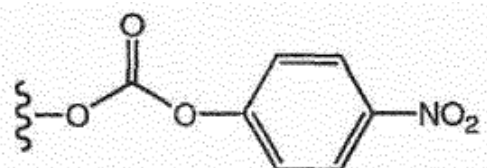
En un ejemplo, el Sitio reactivo n.º 1 es.



30 En otro ejemplo, el Sitio reactivo n.º 1 es

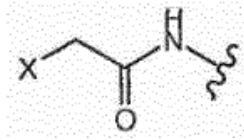


35 En otro ejemplo más, el Sitio reactivo n.º 1 es un carbonato de p-nitrofenilo que tiene la fórmula



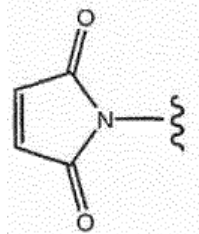
40 En un ejemplo, el Sitio reactivo n.º 2 es un grupo aceptor de tiol. Los grupos aceptores de tiol adecuados incluyen grupos haloacetamida que tienen la fórmula





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

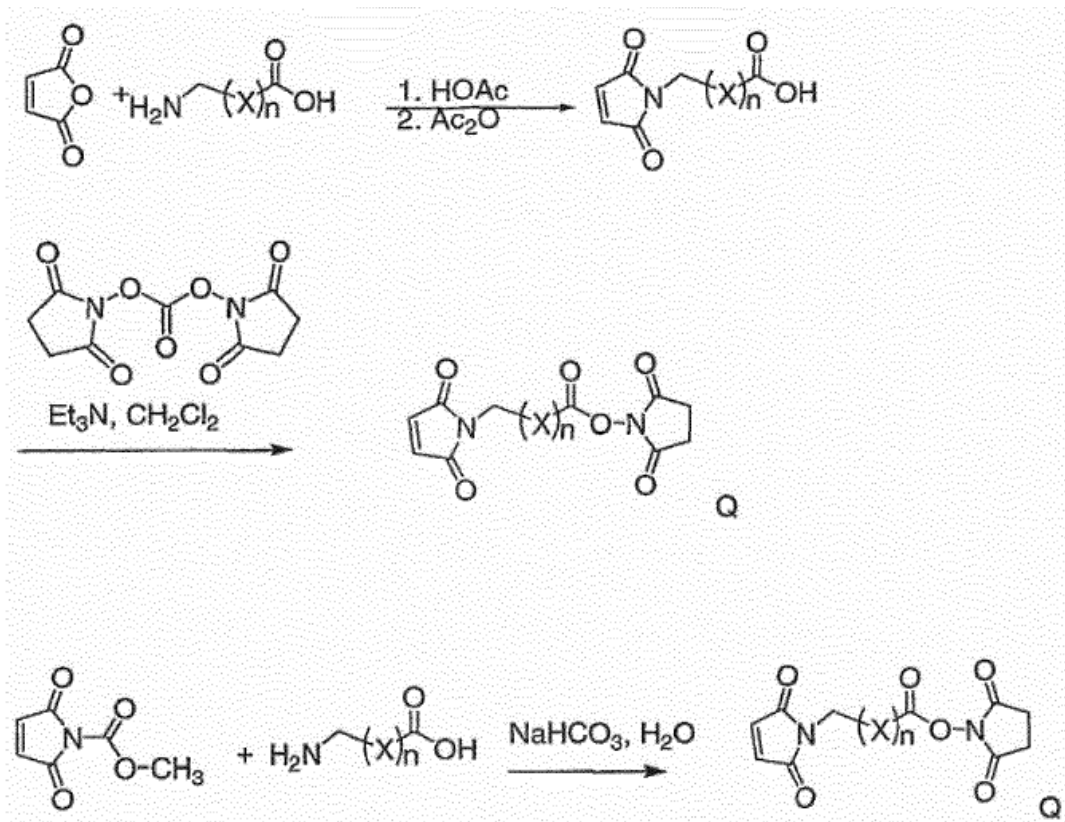
5



Los Enlazadores útiles se pueden obtener de fuentes comerciales, tales como Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), o prepararse como se resume en los Esquemas 8-10 siguientes.

10

Esquema 8

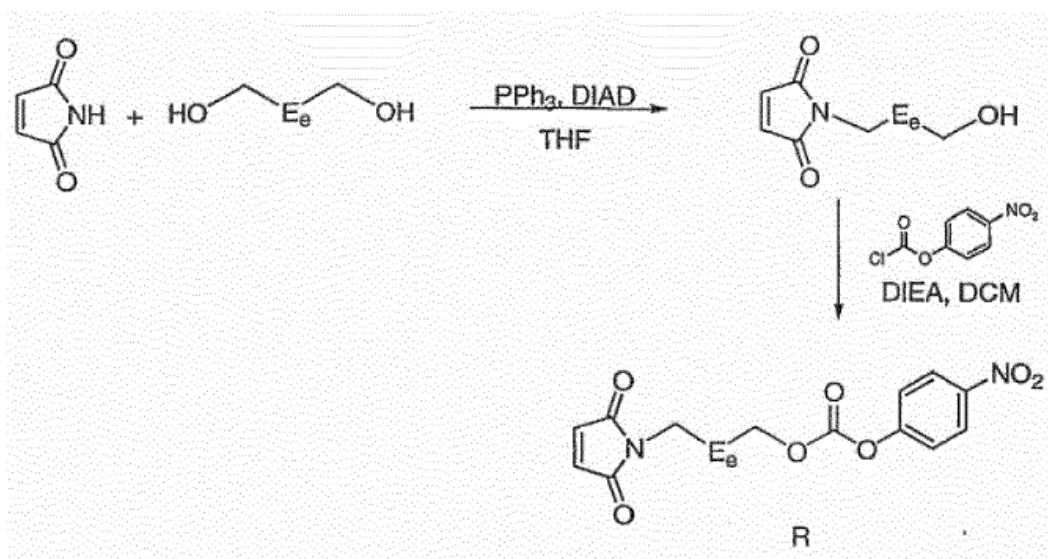


15 en la que X es CH<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-; y n es un número entero comprendido entre cualquiera de 0-10 cuando X es CH<sub>2</sub>-; o 1-10 cuando X es -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-.

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

20

Esquema 9



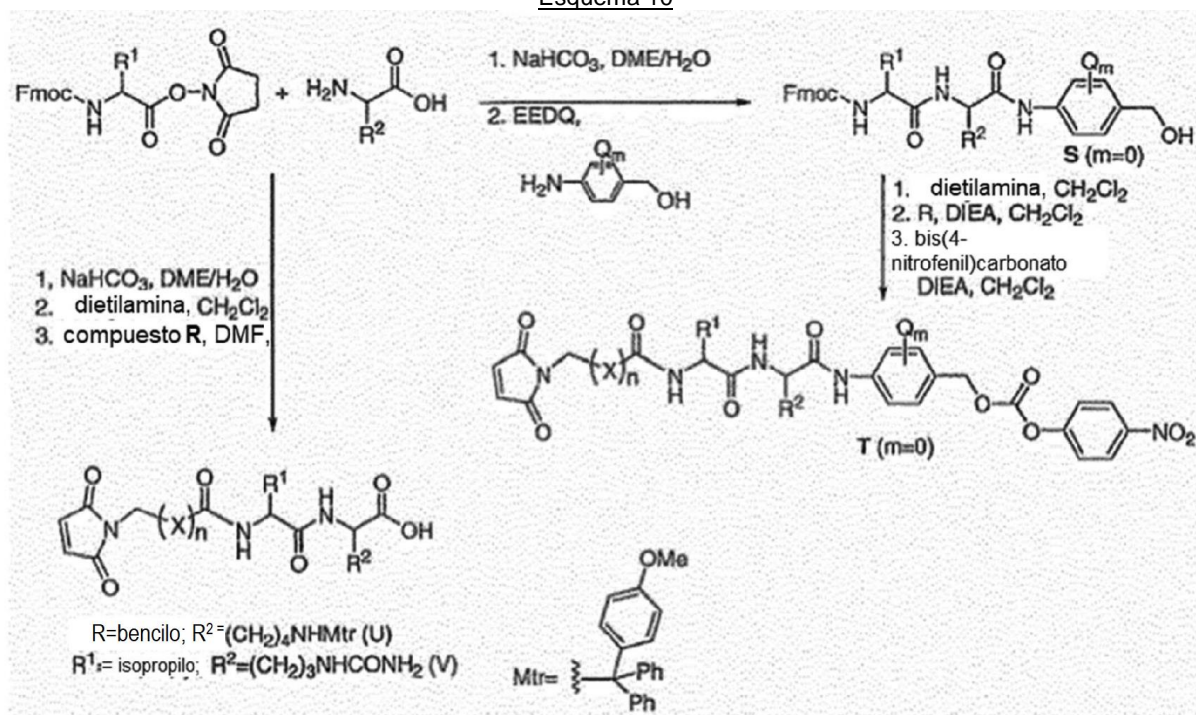
5

en la que E es CH<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>; y e es un número entero comprendido de 0-8;

Como alternativa, las unidades ensanchadoras PEG-maleimida y PEG-haloacetamida se pueden preparar como se describe en Frisch, et al, Bioconjugate Chem. 1996, 7, 1 80-186. El Esquema 10 ilustra una síntesis general de una Unidad enlazadora ilustrativa que contiene un Grupo ensanchador de maleimida y opcionalmente un Separador autoinmolable de p-aminobencilo.

10

Esquema 10



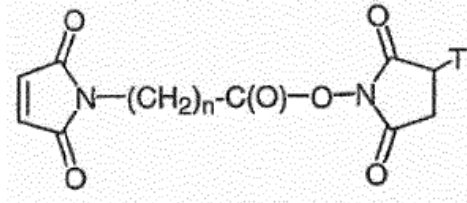
15

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

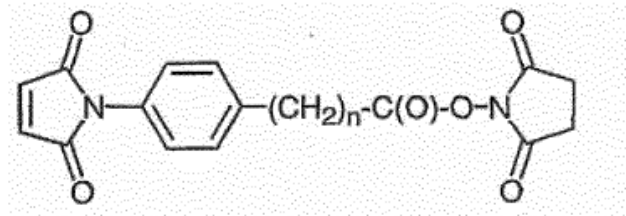
20

Las Unidades ensanchadoras se pueden incorporar al Enlazador usando los intermedios comerciales de Molecular Biosciences (Boulder, CO) descritos a continuación usando técnicas conocidas de síntesis orgánica. Las Unidades

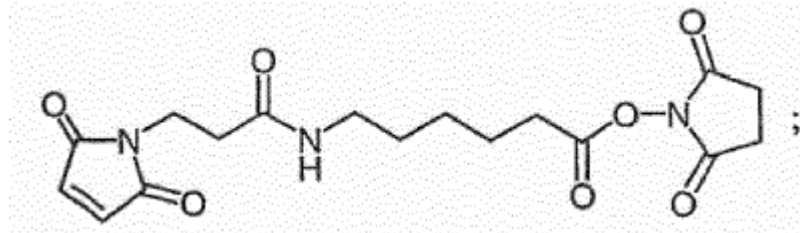
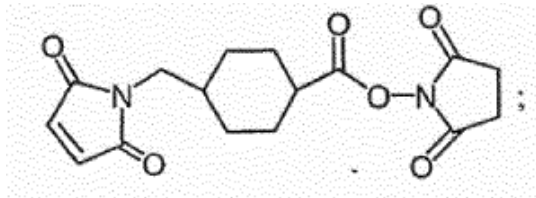
ensanchadoras de fórmula (Va) se pueden introducir en un Enlazador por reacción de los siguientes intermedios con el extremo N de una Unidad de aminoácido, como se representa gráficamente en los Esquemas 11 y 12:



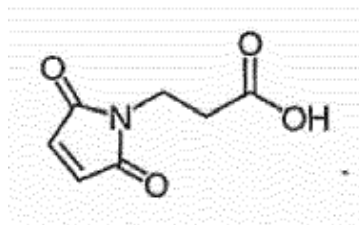
5 donde n es un número entero comprendido entre 1-10 y T es -H o -SO<sub>3</sub>Na;



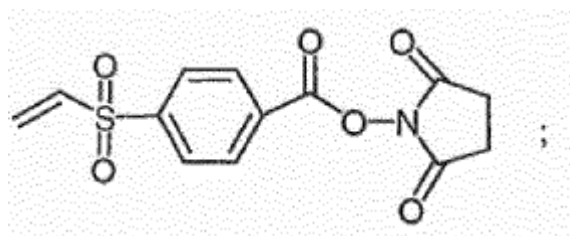
10 donde n es un número entero comprendido entre 0-3;

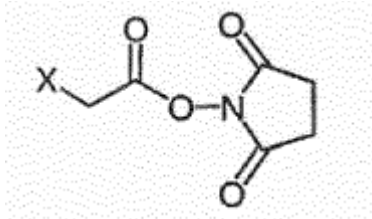
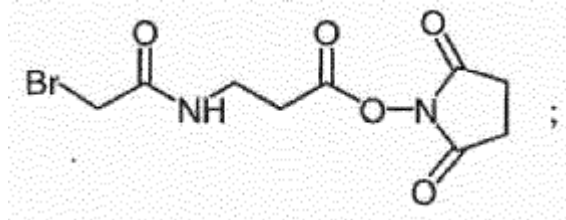
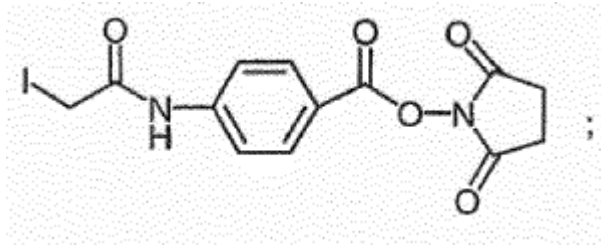


15 y



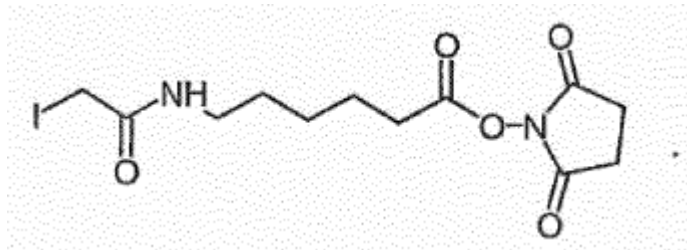
20 Las Unidades ensanchadoras de fórmula (IIIb) se pueden introducir en un Enlazador por reacción de los siguientes compuestos intermedios con el extremo N de la unidad de aminoácido:





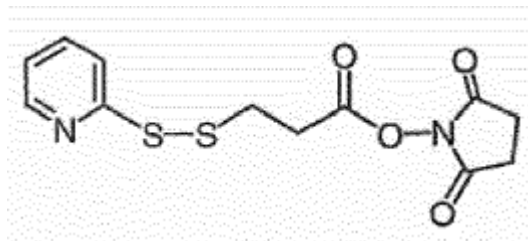
5

donde X es -Br o -I; y



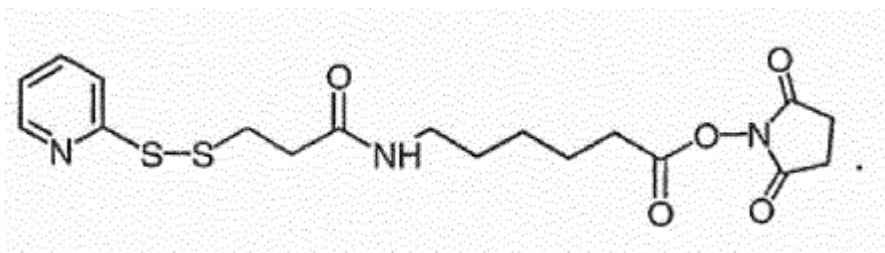
10

Las Unidades ensanchadoras de formula (IV) se pueden introducir en un Enlazador por reacción de los siguientes compuestos intermedios con el extremo N de la unidad de aminoácido:



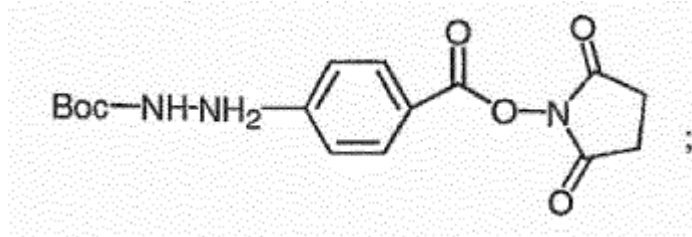
15

y

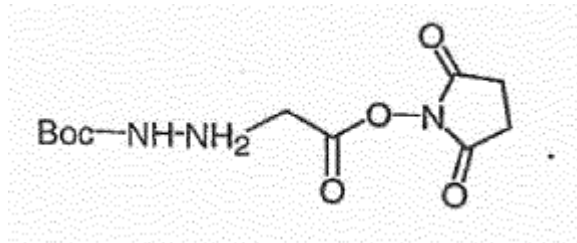


20 las Unidades ensanchadoras de formula (Va) se pueden introducir en un Enlazador por reacción de los siguientes

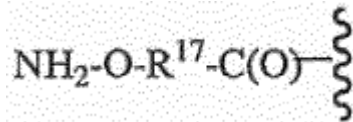
compuestos intermedios con extremo N de la unidad de aminoácido:



5 y

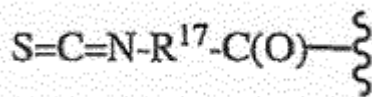


10 Otras Unidades ensanchadoras útiles se pueden sintetizar de acuerdo con procedimientos conocidos. Las Unidades ensanchadoras de aminooxi de la fórmula que se muestra a continuación se pueden preparar tratando haluros de alquilo con N-Boc-hidroxilamina de acuerdo con los procedimientos descritos en Jones, D.S. et al., Tetrahedron Letters, 2000,41 (10), 1531-1533; y Gilon, C. et al., Tetrahedron, 1967, 23(11), 4441-4447.



15 en la que -R<sup>17</sup>- se selecciona entre -alquileo -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> -carbociclo -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-, -arileno-, -alquileo-arileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -arileno-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquileo-, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-, y r es un número entero comprendido de 1-10;

20 Las Unidades ensanchadoras de isotiocianato de la fórmula que se muestra a continuación se pueden preparar a partir de cloruros del ácido isotiocianatocarboxílico como se describe en Angew. Chem., 1975, 87(14):517.

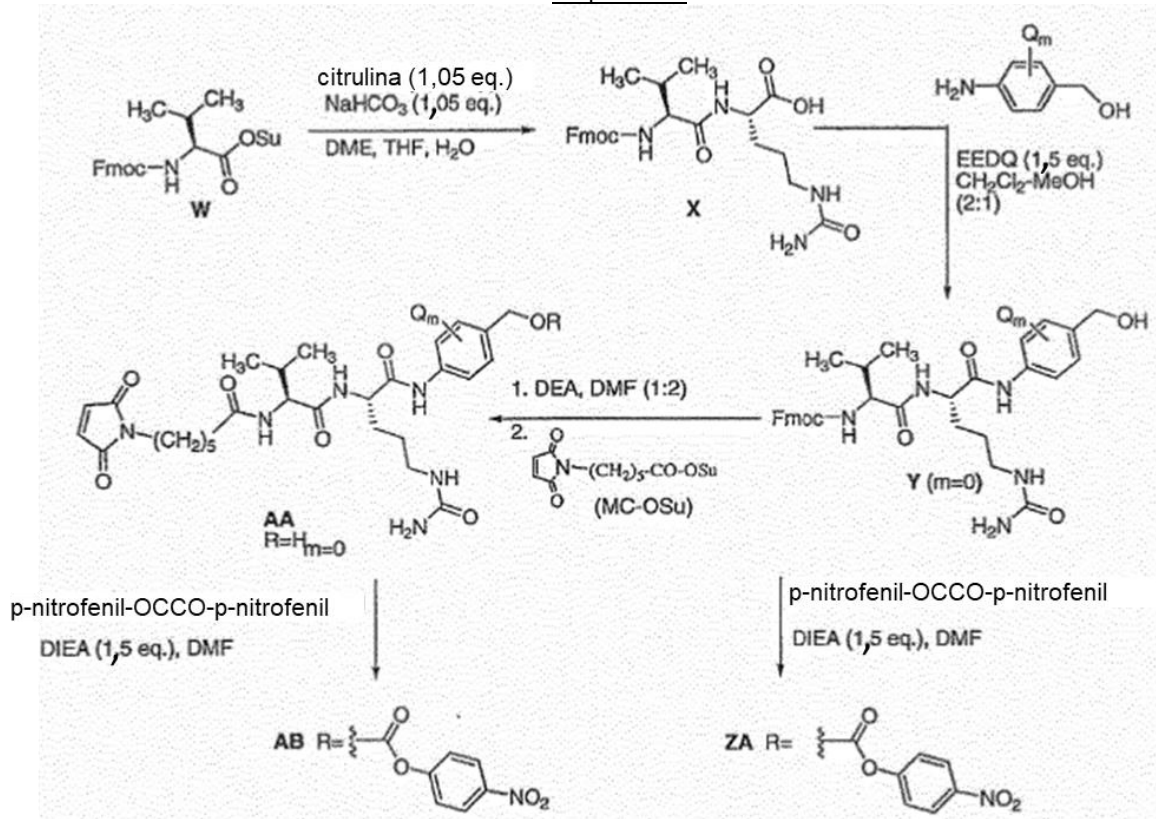


25 en la que -R<sup>17</sup>- es como se describe en el presente documento.

El Esquema 11 muestra un método para obtener un Enlazador dipéptido val-cit que tiene una Unidad ensanchadora de maleimida y opcionalmente una Unidad separadora autoinmolable de p-aminobencilo.

30

Esquema 11

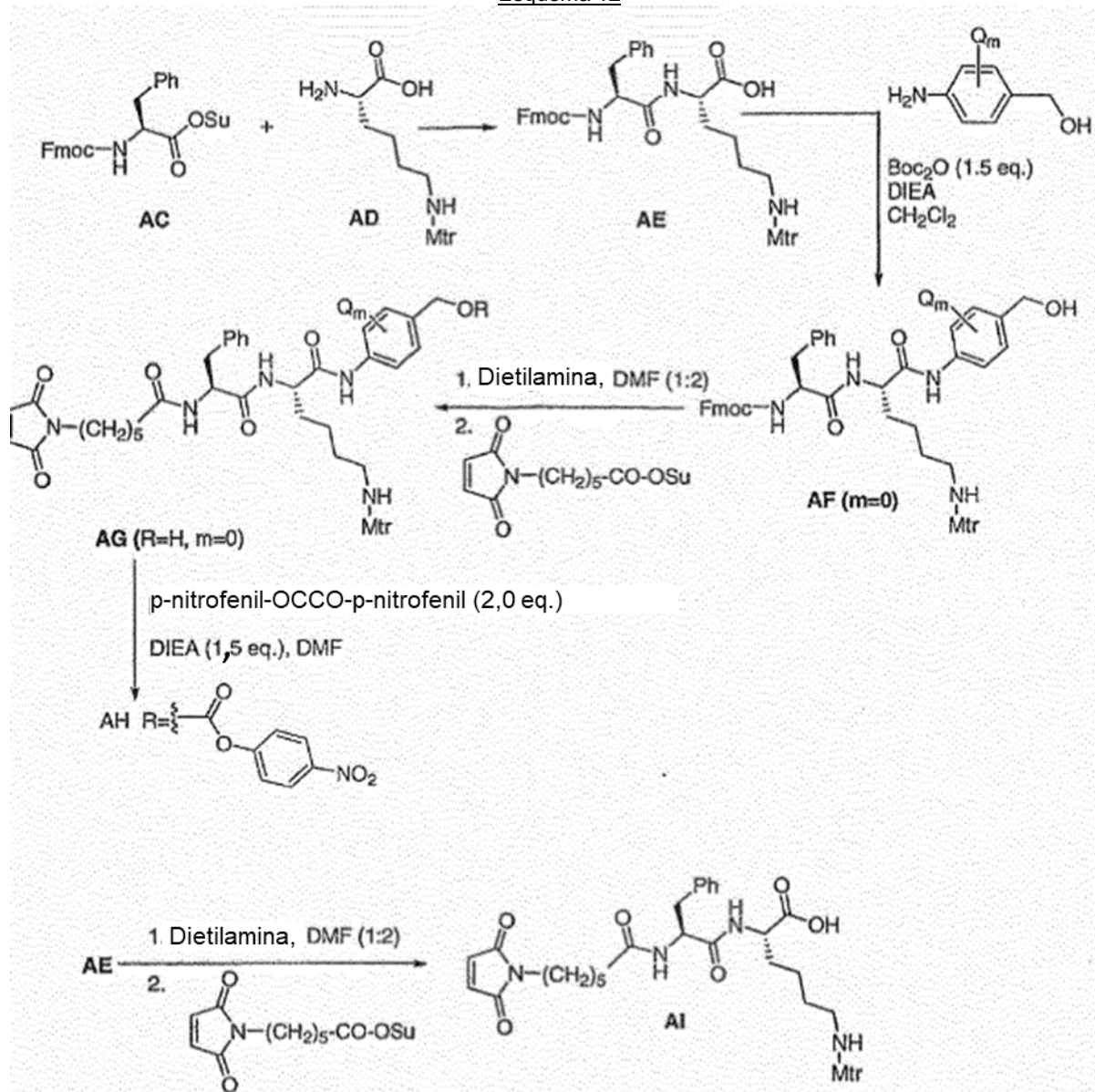


5 en la que Q es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero comprendido de 0-4.

10 El Esquema 12 ilustra la síntesis de una Unidad enlazadora del dipéptido phe-lys(Mtr) que tiene una Unidad ensanchadora de maleimida y una Unidad separadora autoinmolable de p-aminobencilo. El material de partida AD (lys(Mtr)) está comercialmente disponible (Bachem, Torrance, CA) o se puede preparar de acuerdo con Dubowchik, et al. Tetrahedron Letters (1997) 38:5257-60.



Esquema 12

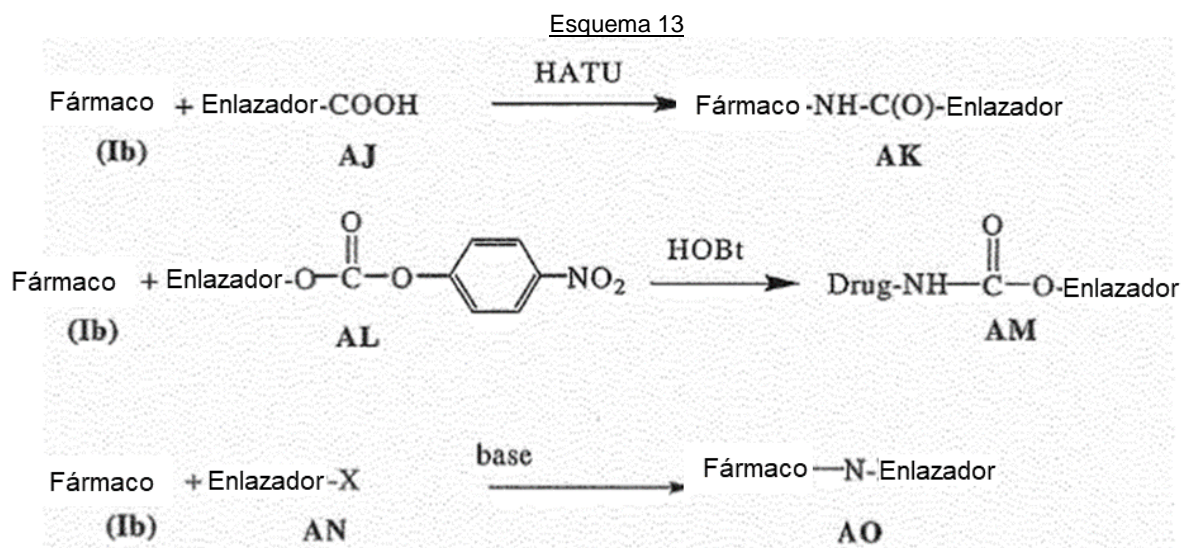


5 en la que Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero comprendido de 0-4.

10 Como se muestra en el Esquema 13, un Enlazador se puede hacer reaccionar con un grupo amino de un Compuesto de fármaco de Fórmula (Ib) para formar un Compuesto de fármaco-enlazador que contiene un grupo amida o carbamato, que une la Unidad de fármaco a la Unidad enlazadora. Cuando el Sitio reactivo n.º 1 es un grupo ácido carboxílico, como en el Enlazador **AJ**, la reacción de acoplamiento se puede llevar a cabo usando HATU o PyBrop y una base de amina adecuada, dando como resultado un Compuesto de fármaco-enlazador **AK**, que contiene un enlace amida entre la Unidad de fármaco y la Unidad enlazadora. Cuando el Sitio reactivo n.º 1 es un carbonato, como en el Enlazador **AL**, el Enlazador se puede acoplar al Fármaco usando HOBt en una mezcla de DMF/piridina para proporcionar un Compuesto de fármaco-enlazador **AM**, que contiene un enlace carbamato entre la Unidad de fármaco y la Unidad enlazadora.

20 Como alternativa, cuando el Sitio reactivo n.º 1 es un buen grupo saliente, tal como en el Enlazador **AN**, el Enlazador se puede acoplar con un grupos amina de un Fármaco mediante un proceso de sustitución nucleófila para proporcionar un a Compuesto de fármaco-enlazador que tiene un enlace amina (**AO**) entre la Unidad de fármaco y la Unidad enlazadora.

Los métodos ilustrativos útiles para unir un Fármaco a un Ligando para formar un Compuesto de fármaco-enlazador se representan gráficamente en el Esquema 13 y se detallan en los Procedimientos generales G-H.



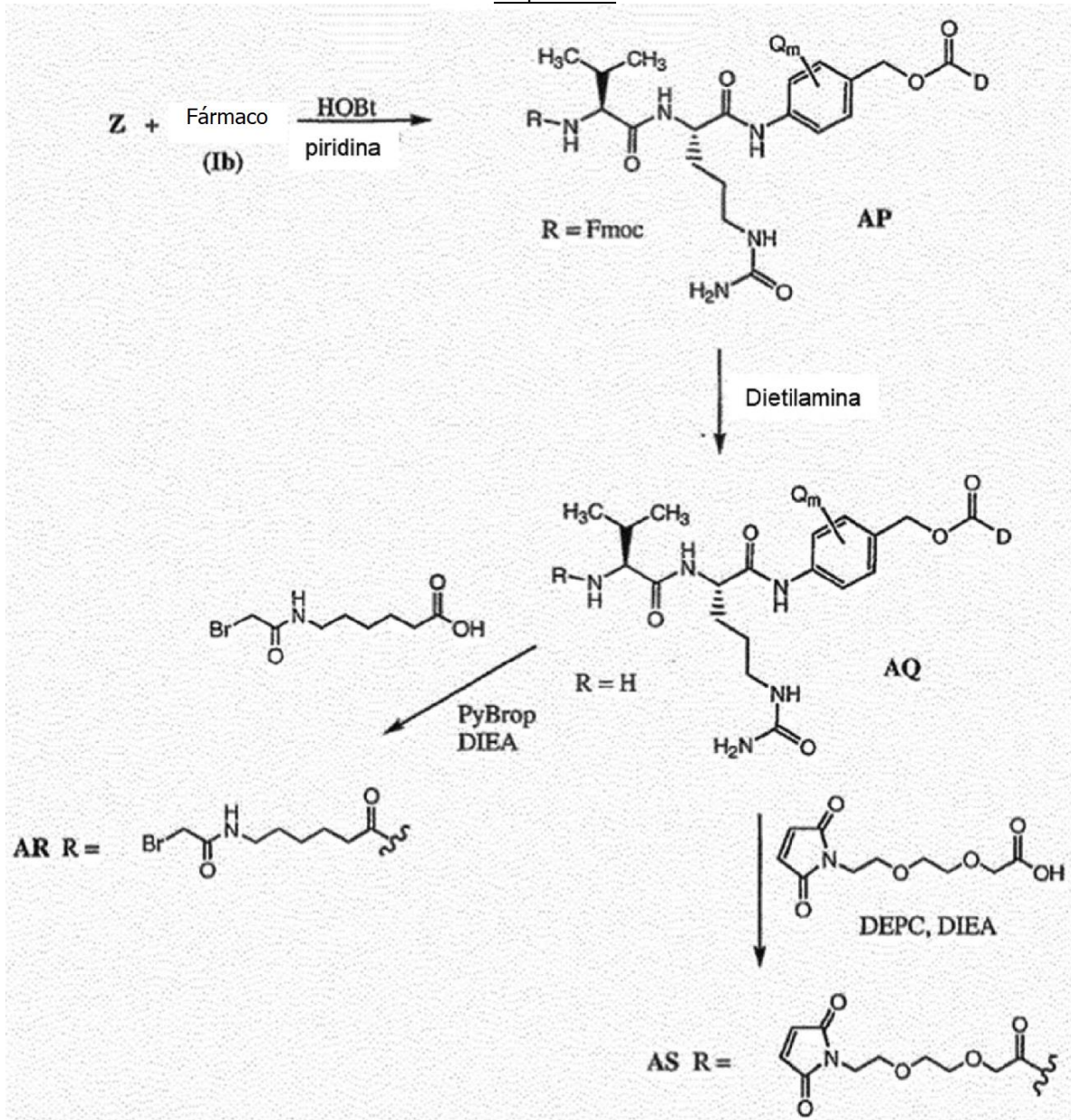
5 **Procedimiento General G: Formación de la amida usando HATU.** Un Fármaco (Ib) (1,0 eq.) y un Enlazador N-  
 10 protegido que contiene un Sitio reactivo de ácido carboxílico (1,0 eq.) se diluyen con un disolvente orgánico  
 adecuado, tal como diclorometano, y la solución resultante se trató con HATU (1,5 eq.) y una base orgánica,  
 preferentemente piridinina (1,5 eq.). La mezcla de reacción se dejó en agitación bajo atmósfera inerte,  
 preferentemente argón, durante 6 h, tiempo durante el cual la mezcla de reacción se controló mediante HPLC. La  
 mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se purificó mediante HPLC para proporcionar la amida de  
 fórmula AK.

15 **Procedimiento H: Formación de carbamato usando HOBt.** Una mezcla de un Enlazador AL que tiene un Sitio  
 reactivo de carbonato de p-nitrofenilo (1,1 eq.) y Fármaco (Ib) (1,0 eq.) se diluyó con un disolvente orgánico aprótico,  
 tal como DMF, para proporcionar una solución que tiene una concentración de 50-100 mM, y la solución resultante  
 se trató con HOBt (2,0 eq.) y se puso bajo atmósfera inerte, preferentemente argón. La mezcla de reacción se dejó  
 20 agitando durante 15 min, a continuación una base orgánica, tal como piridinina (1/4 v/v), se añadió a lo anterior y el  
 progreso de la reacción se controló mediante HPLC. El Enlazador se consumió normalmente en unas 16 h. A  
 continuación, la mezcla de reacción se concentró al vacío, y el residuo resultante se purificó usando, por ejemplo,  
 HPLC para producir el carbamato AM.

25 Un método alternativo para preparar el Compuesto de fármaco-enlazador se detalla en el Esquema 14. Usando el  
 método del Esquema 14, el Fármaco se une a una Unidad enlazadora parcial (ZA, por ejemplo), que no tiene una  
 Unidad ensanchadora unida. Esto proporciona el intermedio AP, que tiene una Unidad de aminoácido que tiene un  
 extremo N protegido con Fmoc. A continuación, el grupo Fmoc se elimina y el intermedio de amina resultante AQ  
 se une a continuación a una Unidad ensanchadora mediante una reacción de acoplamiento catalizada usando PyBrop o  
 DEPC. La construcción de Compuestos de fármaco-enlazador que contienen bien una Unidad ensanchadora de  
 bromoacetamida AR o una Unidad ensanchadora de PEG maleimida AS se ilustra en el Esquema 14.



Esquema 14

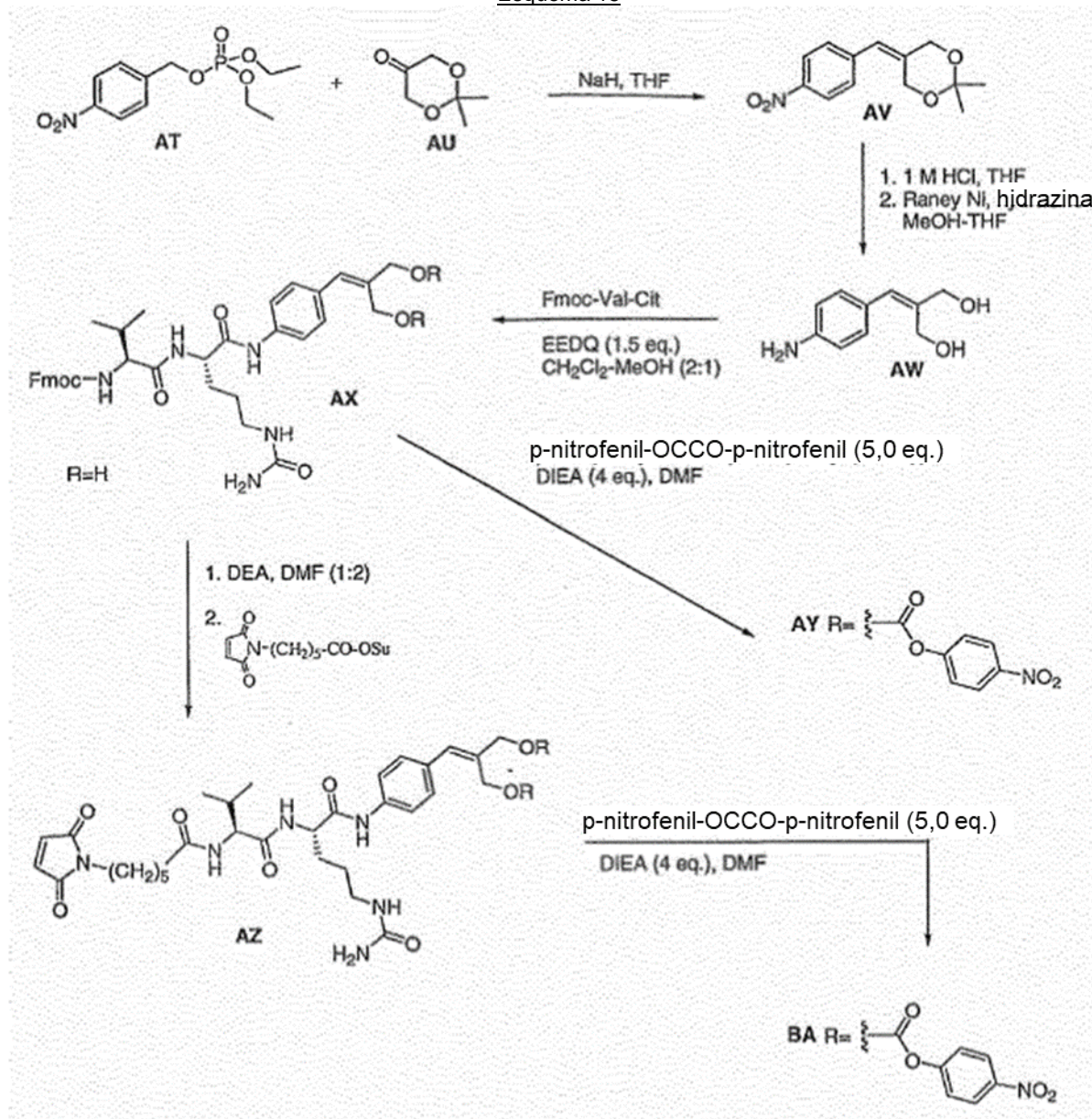


5 en la que Q es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero comprendido de 0-4.

La metodología útil para preparar una Unidad enlazadora que contiene una unidad separadora ramificada se muestra en el Esquema 15.

10

Esquema 15



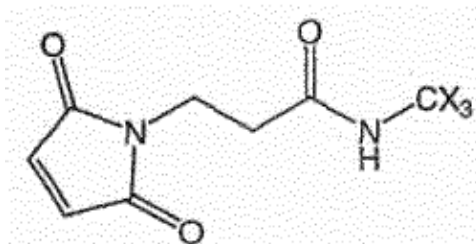
El Esquema 15 ilustra la síntesis de un enlazador dipéptido val-cit que tiene una Unidad ensanchadora de maleimida y una unidad de bis(4-hidroximetil)estireno (BHMS). La síntesis del intermedio BHMS (**AW**) se ha mejorado a partir de los procedimientos anteriores de la bibliografía (véase la publicación internacional n.º WO 9813059 de Firestone et al., y Crozet, M.P.; Archaimbault, G.; Vanelle, P.; Nougier, R. *Tetrahedron Lett.* (1985) 26:5133-5134) y utiliza como materiales de partida, el (4-nitrobenzyl)fosfonato de dietilo (**AT**) comercial y la 2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-ona (**AU**) comercial. Los enlazadores **AY** y **BA** se pueden preparar a partir del intermedio **AW** usando la metodología descrita en el Esquema 9.

#### 4.6.3 ENLAZADORES DENDRÍTICOS

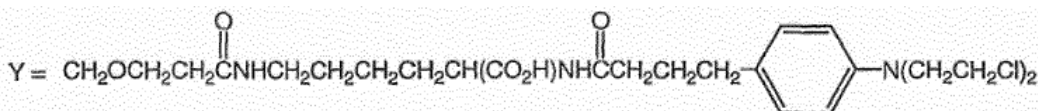
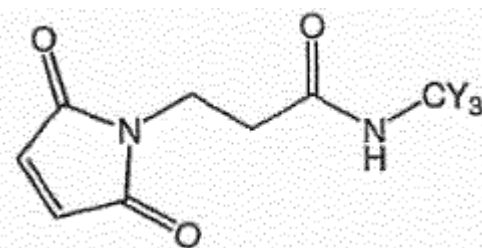
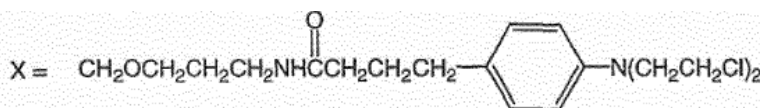
El enlazador puede ser un enlazador de tipo dendrítico para la unión covalente de más de un resto de fármaco mediante un resto enlazador ramificado multifuncional con un Ligando, tal como aunque no de forma limitativa, a un anticuerpo (Sun et al. (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215; Sun et al. (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768). Los enlazadores dendríticos pueden aumentar la relación molar de fármaco a anticuerpo, es decir la carga, que se relaciona con la potencia del Conjugado de fármaco-enlazador-ligando. Por tanto, cuando un anticuerpo que tiene una cisteína diseñada mediante ingeniería genética tiene solamente un grupo tiol reactivo en la cisteína, gran cantidad de restos de fármaco se pueden unir mediante un enlazador dendrítico.

Las siguientes realizaciones ilustrativas de reactivos enlazadores dendríticos permiten que hasta nueve reactivos

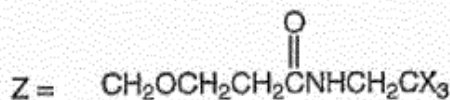
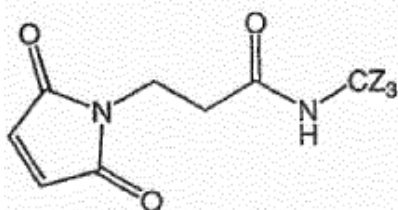
nucleófilos de restos de fármaco se conjuguen por reacción con los grupos funcionales de mostaza de cloroetilnitrógeno:



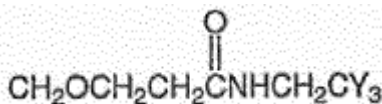
5



10



o



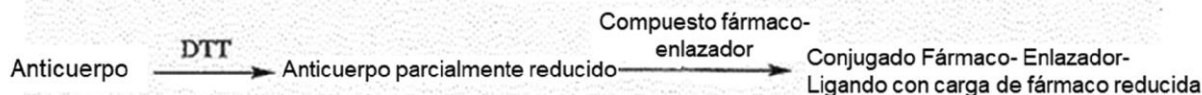
15

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

El Esquema 16 ilustra metodología útil para preparar conjugados de fármaco-enlazador que tienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 fármacos por anticuerpo. Un anticuerpo se trata con un agente reductor, tal como ditioneitol (DTT) para reducir todo o parte de los restos disulfuro de cisteína para formar grupos tiol de cisteína fuertemente nucleófilos (-CH<sub>2</sub>SH). El anticuerpo parcialmente reducido puede seguidamente reaccionar con compuestos de fármaco-enlazador, o reactivos enlazadores, con grupos funcionales electrófilos tales como maleimida o α-halocarbonilo, de acuerdo con el procedimiento de conjugación de la página 766 de Klussman et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773.

25

Esquema 16



Por ejemplo, un anticuerpo, por ejemplo, AC10, disuelto en una solución de borato de sodio 500 mM y cloruro de sodio 500 mM a pH 8,0, se trata con un exceso de ditiotreitolo 100 mM (DTT). Tras una incubación a 37°C durante aproximadamente 30 minutos, el tampón se intercambiò por elución en resina Sephadex G25 y se eluyó con PBS con DTPA 1 mM. El valor tiol/Ab se comprobó determinando la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia de la solución medida a 280 nm y de la concentración de tiol determinada por reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido disuelto en PBS se enfrió sobre hielo. El enlazador de fármaco, por ejemplo, MC-val-cit-PAB-MMAE en DMSO, disuelto en acetonitrilo y agua a concentración conocida, se añadió al anticuerpo reducido enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añadió un exceso de maleimida para desactivar la reacción y proteger todos los grupos tiol del anticuerpo sin reaccionar. La mezcla de reacción se concentró mediante ultrafiltración centrífuga y el ADC, por ejemplo, AC10-MC-vc-PAB-MMAE, se purificó y desaló por elución a través de resina G25 en PBS, se filtró a través de filtros de 0,2 µm en condiciones estériles, y se congeló para su almacenamiento.

Se preparó varios conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC), con varios enlazadores, y los restos de fármaco, MMAE y MMAF. La siguiente tabla es un grupo ilustrativo de ADC que se preparó según el protocolo del Ejemplo 27, y se caracterizó mediante HPLC y ensayo de carga de fármaco.

Diana (Antígeno)	ADC	cantidad aislada (mg)	relación fármaco/Ab
0772P	16E12-MC-vc-PAB-MMAE	1,75	4
0772P	11D10-MC-vc-PAB-MMAE	46,8	4,4
0772P	11D10-MC-vc-PAB-MMAF	54,5	3,8
Brevican	Brevican-MC-MMAF	2	6
Brevican	Brevican-MC-vc-MMAF	2	6
Brevican	Brevican-MC-vc-PAB-MMAF	1,4	6
CD21	CD21-MC-vc-PAB-MMAE	38,1	4,3
CD21	CD21-MC-vc-PAB-MMAF	43	4,1
CRIPTO	11F4-MC-vc-PAB-MMAF	6	4,8
CRIPTO	25G8-MC-vc-PAB-MMAF	7,4	4,7
E16	12G12-MC-vc-PAB-MMAE	2,3	4,6
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAE	2,9	4,6
E16	12B9-MC-vc-PAB-MMAE	1,4	3,8
E16	12B9-MC-vc-PAB-MMAE	5,1	4
E16	12G12-MC-vc-PAB-MMAE	3	4,6
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAE	4,8	4,1
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAF	24,7	4,4
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAE	29,9	7,1
EphB2R	2H9-MC-fk-PAB-MMAE	25	7,5
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAE	175	4,1
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAF	150	3,8
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAF	120	3,7
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAE	10,7	4,4
IL-20Ra	IL20Ra-fk-MMAE	26	6,7
IL-20Ra	IL20Ra-vc-MMAE	27	7,3
EphB2	IL8-MC-vc-PAB-MMAE	251	3,7
MDP	MDP-vc-MMAE	32	
MPF	19C3-vc-MMAE	1,44	6,5
MPF	7D9-vc-MMAE	4,3	3,8
MPF	19C3-vc-MMAE	7,9	3
MPF	7D9-MC-vc-PAB-MMAF	5	4,3
Napi3b	10H1-vc-MMAE	4,5	4,6
Napi3b	4C9-vc-MMAE	3,0	5,4



Napi3b	10H1-vc-MMAE	4,5	4,8
Napi3b	10H1-vc-MMAF	6,5	4
NCA	3E6-MC-fk-PAB-MMAE	49,6	5,4
NCA	3E6-MC-vc-PAB-MMAE	56,2	6,4
PSCA	PSCA-fk-MMAE	51,7	8,9
PSCA	PSCA-vc-MMAE	61,1	8,6
Napi3b	10H1-MC-vc-PAB-MMAE	75	4,2
Napi3b	10H1-MC-vc-PAB-MMAF	95	4,4
Napi3b	10H1-MC-MMAF	92	4
EphB2R	2H9-MC-vc-PAB-MMAE	79	5
EphB2R	2H9-MC-MMAF	92	4,9
0772P	11D10(Fc quimera)-MC-vc-PAB-MMAE	79	4,3
0772P	11D10(quimera) MC-vc-PAB- MMAF	70	4,5
0772P	HD10(Fc quimera)-MC-MMAF	23	4,5
Brevican	6D2-MC-vc-PAB-MMAF	0,3	4,5
Brevican	6D2-MC-MMAF	0,36	4,5
EphB2R	2H9(Fc quimera)-MC-vc-PAB-MMAE	1983	4,3
E16	12B9-MC-vc-PAB-MMAE	14,1	4,6
E16	12B9-MC-vc-PAB-MMAF	16,4	4,5
E16	12G12-MC-vc-PAB-MMAE	10,5	4,1
E16	12G12-MC-vc-PAB-MMAF	10,2	3,8
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAE	58,6	3,8
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAF	8	3,1
0772P	11D10(Fc quimera)-MC-vc-PAB-MMAE	340	3,9
Steap1	(Steap1-92)-MC-vc-PAB-MMAE	3,5	4
Steap1	(Steap1-92)-MC-vc-PAB-MMAF	4,7	4
Steap1	(Steap1-120)-MC-vc-PAB-MMAE	2	4
Steap1	(Steap1-120)-MC-vc-PAB-MMAF	2,3	4
E16	3B5-MC-vc-PAB-MMAF	52,2	4,5

#### **4.7 COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN**

- 5 También se describe una composición que incluye una cantidad eficaz de un Compuesto Ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo y un transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por comodidad, las Unidades de fármaco y los Compuestos de fármaco-enlazador se pueden denominar como Compuestos ilustrativos, mientras que los Conjugados de fármaco-ligando y los Conjugados de fármaco-enlazador-ligando se pueden denominar como Compuestos ilustrativos. Las composiciones son adecuadas para su administración veterinaria o humana.
- 10 Las actuales composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma que permita que la composición se administre a un paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en la forma de un sólido, líquido o gas (aerosol). Las rutas de administración típicas incluyen, sin limitación, oral, tópica, administración parenteral, sublingual, rectal, vaginal, ocular, intratumoral, e intranasal. La administración parenteral incluye inyecciones subcutáneas, intravenosa, intramuscular, inyección intraesternal o técnicas de infusión. Las composiciones pueden administrarse por vía parenteral. Como alternativa, los Compuestos ilustrativos y/o los Conjugados ilustrativos o composiciones se pueden administrar por vía intravenosa.
- 15 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de tal manera que permitan a un Compuesto ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo estar biodisponible tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones pueden tener la forma de una o más dosis unitarias, donde por ejemplo, un comprimido puede ser un dosis unitaria simple, y un recipiente de un Compuesto ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo en forma de aerosol puede tener una pluralidad de dosis unitarias.
- 20 Los materiales utilizados en la preparación de las composiciones farmacéuticas pueden no ser tóxicos en las cantidades usadas. Será evidente para una persona normalmente experta en la materia que la dosificación óptima del principio o principios activos en las composición farmacéutica dependerá de varios factores. Los factores relevantes incluyen, sin limitación, el tipo de animal (por ejemplo, ser humano), la forma concreta del Compuesto ilustrativo o Conjugado ilustrativo, la manera de administración, y la composición empleada.
- 25
- 30 El transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable puede estar en forma de partículas, de forma que las

composiciones están, por ejemplo, en forma de comprimidos o polvo. El(Los) transportador(es) puede ser líquido, siendo las composiciones, por ejemplo, un jarabe oral o un líquido inyectable. Además, el(los) transportador(es) puede ser gaseoso o particulado, con el fin de proporcionar una composición en aerosol útil en, por ejemplo, administración inhalatoria.

5 Cuando se pretende para la administración oral, la composición está preferentemente en forma sólida o líquida, donde las formas semisólidas, semilíquidas, en suspensión y en gel se incluyen en las formas consideradas en el presente documento ya sea como sólido o como líquido.

10 Como una composición sólida para la administración oral, la composición puede formularse en un polvo, gránulos, comprimido formado por compresión, píldora, una cápsula, gomas de mascar, oblea o las formas similares. Dicha composición sólida contiene normalmente uno o más diluyentes inertes. Además, pueden estar presentes uno o más de los siguientes: aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina, o gelatina; excipientes tales como almidón, lactosa o dextrinas, agentes disgregantes tales como ácido alginico, alginato de sodio, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio o Sterotex; agente deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agente edulcorantes tales como sacarosa o sacarina, un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja, y un agente colorante.

20 Cuando la composición está en la forma de una cápsula, por ejemplo, una cápsula de gelatina, esta puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un transportador líquido tal como polietilenglicol, ciclodextrina o un aceite graso.

25 La composición puede estar en la forma de o un líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser útil para la administración oral o para la administración mediante inyección. Cuando se pretende para la administración oral, una composición puede comprender uno o más de un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y un potenciador del aroma. En una composición para su administración mediante inyección se puede incluir, uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, un tampón, estabilizante y agente isotónico.

30 Las composiciones líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir también uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferentemente suero salino fisiológico, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos tales como monoglicéridos o diglicéridos sintéticos que pueden servir como medio disolvente o de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, ciclodextrina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminatetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. La composición parenteral se pueden introducir en una ampolla, una jeringa desechable o un vial multidosis hecho de vidrio, plástico u otro material. El suero salino fisiológico es un adyuvante ilustrativo. Una composición inyectable es, preferentemente, estéril.

40 La cantidad de Compuesto ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo que es eficaz en el tratamiento de un trastorno o dolencia concreto dependerá de la naturaleza del trastorno o dolencia, y se puede determinar mediante técnicas clínicas normalizadas. Además, se pueden utilizar de manera opcional ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se empleará en las composiciones dependerá también de la ruta de administración, y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y deberá decidirse de acuerdo con el criterio del especialista a cargo del tratamiento y de las circunstancias del paciente.

50 Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de un Compuesto ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo de tal manera que se obtenga una dosificación adecuada. Normalmente, esta cantidad es al menos aproximadamente un 0,01 % de un Compuesto ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo en peso de la composición. Cuando se pretende para la administración oral, esta cantidad puede variarse para comprender de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 80 % en peso de la composición. Las composiciones orales pueden comprender de aproximadamente 4 % a aproximadamente 50 % del Compuesto ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo en peso de la composición. Asimismo, las presentes composiciones se pueden preparar de forma que una dosis unitaria parenteral contiene de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 2 % en peso del Compuesto ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo.

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

65 En general, la dosificación de un Compuesto ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo administrada a un paciente suele estar entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 2000 mg/kg de peso corporal del animal. La

dosificación administrada a un paciente puede estar entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del animal, o la dosificación administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 250 mg/kg del peso corporal del animal, o la dosificación administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del animal, o la dosificación administrada está entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del animal.

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

En ejemplos específicos, puede ser deseable administrar uno o más Compuesto ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo o composiciones localmente en el área en necesidad de tratamiento. Esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante una cirugía; aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito para heridas después de la cirugía; mediante inyección; mediante un catéter; mediante un supositorio; o mediante un implante, siendo el implante un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. En un ejemplo, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de un cáncer, tumor o tejido neoplásico o preneoplásico. En otro ejemplo, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de una manifestación de una enfermedad autoinmunitaria.

En determinados casos, puede ser deseable introducir uno o más Compuestos ilustrativos y/o Conjugados ilustrativos o composiciones en el sistema nervioso central mediante cualquier ruta adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal. La inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya.

Se puede emplear también la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente aerosolizante, o mediante perfusión en un tensoactivo pulmonar de fluorocarbono o sintético.

En otro ejemplo más, los Compuestos ilustrativos y/o Conjugados ilustrativos o composiciones pueden administrarse en un sistema de liberación controlada, tales como aunque no de forma limitativa, una bomba o bien se pueden utilizar diferentes materiales poliméricos. En otro ejemplo más, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca de la diana del Compuesto ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo o composiciones, por ejemplo, el cerebro, requiriendo de esta manera solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, citada anteriormente, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). Se pueden utilizar otros sistemas de liberación controlada descritos en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

El término "transportador" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente, en el que se administra el Compuesto ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo. Dichos transportadores farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los portadores pueden ser suero salino, goma de acacia, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Además, se pueden usar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. En un ejemplo, cuando se administran a un paciente, el Compuesto ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo o composiciones y los transportadores farmacéuticamente aceptables son estériles. El agua es un transportador ilustrativo cuando los Compuestos ilustrativos y/o Conjugados ilustrativos se administran por vía intravenosa. Se pueden emplear también soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como transportadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los transportadores farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes, tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Las presentes composiciones, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH.

Las presentes composiciones pueden tener la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, aglomerados, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación continua, supositorios, emulsiones, aerosoles, pulverizados, suspensiones, o cualquier otra forma adecuada para su uso. Otros ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.

Los Compuestos ilustrativos y/o Conjugados ilustrativos se pueden formular de acuerdo con los procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a animales, especialmente seres humanos. Normalmente, los portadores o vehículos para administración intravenosa son

soluciones acuosas estériles tamponadas. Si es necesario, las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Las composiciones para administración intravenosa pueden comprender opcionalmente un anestésico local tal como lignocaina para disminuir el dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se suministran tanto por separado o se mezclan conjuntamente en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o sobrecillo que indica la cantidad de principio activo. Cuando el Compuesto ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar, por ejemplo, con un frasco para infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica o suero salino. Cuando el Compuesto ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo se va a administrar mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril o suero salino para que los componentes se mezclen antes de la administración.

Las composiciones para la administración oral pueden estar en la forma de comprimidos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos, polvos, emulsiones, cápsulas, jarabes o elixires, por ejemplo. Las composiciones administradas por vía oral pueden contener opcionalmente uno o más agentes, por ejemplo, agentes edulcorantes tales como fructosa, aspartame o sacarina; agentes aromatizantes tales como menta piperita, aceite de gaulteria o cereza; agentes colorantes; y agentes conservantes, para proporcionar una preparación farmacéutica agradable al paladar. Por otra parte, cuando están en forma de comprimido o píldora, las composiciones pueden revestirse para retrasar la disgregación y la absorción en el tracto gastrointestinal proporcionando por tanto una acción sostenida durante un periodo prolongado de tiempo. Las membranas selectivamente permeables que rodean un compuesto impulsor osmóticamente activo también son adecuadas para compuestos de la invención administrados por vía oral. En estas últimas plataformas, el fluido del entorno que rodea la cápsula se absorbe por el compuesto impulsor, que se hincha para desplazar el agente o composición de agente a través de una apertura. Estas plataformas de suministro pueden proporcionar un perfil de liberación de orden prácticamente cero en oposición a los perfiles enriquecidos de las formulaciones de liberación inmediata. Se puede usar también un material de retraso en el tiempo tal como monoestearato de glicerol o estearato de glicerol.

Se pueden pretender las composiciones para la administración tópica, en cuyo caso, el transportador puede estar en la forma de una solución, emulsión, pomada o base de gel. Si se pretenden para administración transdérmica, la composición puede estar en la forma de un parche transdérmico o un dispositivo de iontoforesis. Las formulaciones tópicas pueden comprender una concentración de un Compuesto ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 50 % p/v (peso por unidad de volumen de la composición), en otro aspecto, de 0,1 % a 10 % p/v.

Se puede pretender la composición para la administración rectal, en la forma, por ejemplo, de un supositorio que se funde en el recto y libera ilustrativo el Compuesto ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo.

La composición puede incluir varios materiales que modifican la forma fisiológica de una forma farmacéutica sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que constituyen una envoltura de revestimiento alrededor de los principios activos. Los materiales forman la envoltura de revestimiento son normalmente inertes, y se pueden seleccionar entre, por ejemplo, azúcar, laca, y otros agentes de revestimiento entéricos. Como alternativa, los principios activos se pueden incluir en una cápsula de gelatina.

Las composiciones pueden consistir en dosis unitarias gaseosas, por ejemplo, pueden estar en la forma de un aerosol. El término aerosol se utiliza para indicar diversos sistemas que varían desde aquellos de naturaleza coloidal a sistemas que consisten en envases presurizados. La administración puede ser mediante un gas licuado o comprimido o mediante un sistema de bomba adecuado que dispense los principios activos.

Tanto si están en forma sólida, líquida o gaseosa, las presentes composiciones pueden incluir un agente farmacológico utilizado en el tratamiento del cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa.

#### 4.8 USOS TERAPÉUTICOS DE LOS CONJUGADOS ILUSTRATIVOS

Los Compuestos ilustrativos y los Conjugados ilustrativos son útiles para tratar el cáncer, una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad infecciosa en un paciente.

##### 4.8.1 TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Los Compuestos ilustrativos y/o Conjugados ilustrativos son útiles para inhibir la multiplicación de una célula tumoral o una célula cancerosa, produciendo la apoptosis en una célula tumoral o cancerosa, o para tratar el cáncer en un paciente. Los Compuestos ilustrativos y/o Conjugados ilustrativos se pueden usar de acuerdo con ello en varios escenarios para el tratamiento de cánceres animales. Los Conjugados de fármaco-enlazador-ligando se pueden utilizar para suministrar un fármaco o unidad de fármaco a una célula tumoral o célula cancerosa. Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, en una realización, la Unidad de ligando de un Conjugado ilustrativo se une a o se asocia con una célula cancerosa o un antígeno asociado a una célula tumoral, y el Conjugado ilustrativo se puede capturar (internalizar) en el interior de una célula tumoral o una célula cancerosa mediante endocitosis mediada por receptor. El antígeno puede unirse a una célula tumoral o célula cancerosa o puede ser una proteína de la matriz



- extracelular asociada con la célula tumoral o célula cancerosa. Una vez dentro de la célula, una o más secuencias específicas de péptido dentro de la Unidad enlazadora se escinden hidrolíticamente mediante una o más proteasas asociadas a una célula tumoral o célula cancerosa, dando como resultado la liberación de un Fármaco o Compuesto de fármaco-enlazador. El Fármaco o Compuesto de fármaco-enlazador liberado queda libre, a continuación, para migrar al interior de la célula e inducir actividades citotóxicas o citostáticas. Como alternativa, el Fármaco o Unidad de fármaco se escinde del Compuesto ilustrativo fuera de la célula tumoral o célula cancerosa, y el Fármaco o Compuesto de fármaco-enlazador posteriormente penetra en la célula.
- 5
- En un ejemplo, la unidad de ligando se une a la célula tumoral o célula cancerosa.
- 10
- En otro ejemplo, la unidad de ligando se une a un antígeno de una célula tumoral o célula cancerosa que se encuentra en la superficie de la célula tumoral o célula cancerosa.
- 15
- En otro ejemplo, La unidad de ligando se une a un antígeno de una célula tumoral o célula cancerosa que es una proteína de la matriz extracelular asociada con la célula tumoral o célula cancerosa.
- 20
- La especificidad de la unidad de ligando por una célula tumoral o célula cancerosa concreta puede ser importante para determinar los tumores o cánceres que se tratan de la manera más eficaz. Por ejemplo, los Conjugados ilustrativos que tienen una Unidad de ligando BR96 pueden ser útiles para tratar carcinomas positivos para antígenos entre los que se incluyen los de pulmón, mama, colon, ovario, y páncreas. Los Conjugados ilustrativos que tienen una Unidad de ligando contra CD30 o CD40 pueden ser útiles para tratar neoplasias hematológicas.
- 25
- Otros tipos de cánceres particulares que se pueden tratar con los Conjugados ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, los descritos en la Tabla 3.

TABLA 3

Tumores sólidos, incluyendo, pero sin limitación:  
 fibrosarcoma  
 mixosarcoma  
 Tumores sólidos, incluyendo, pero sin limitación:  
 liposarcoma  
 condrosarcoma  
 sarcoma osteogénico  
 cordoma  
 angiosarcoma  
 endoteliosarcoma  
 linfangiosarcoma  
 linfangioendoteliosarcoma  
 sinovioma  
 mesotelioma  
 tumor de Ewing  
 leiomiomasarcoma  
 rabdomiosarcoma  
 cáncer de colon  
 cáncer colorrectal  
 cáncer de riñón  
 cáncer de páncreas  
 cáncer de hueso  
 cáncer de mama  
 cáncer de ovario  
 cáncer de próstata  
 cáncer de esófago  
 cáncer de estómago  
 cáncer oral  
 cáncer nasal  
 cáncer de garganta  
 carcinoma de células escamosas  
 carcinoma de células basales  
 adenocarcinoma  
 carcinoma de las glándulas sudoríparas  
 carcinoma de las glándulas sebáceas  
 carcinoma papilar  
 adenocarcinomas papilares  
 cistadenocarcinoma  
 carcinoma medular

carcinoma broncogénico  
carcinoma de células renales  
hepatoma  
carcinoma del conducto biliar  
coriocarcinoma  
seminoma  
carcinoma embrionario  
tumor de Wilms  
cáncer de cuello de útero  
cáncer de útero  
cáncer de testículos  
carcinoma de pulmón microcítico  
carcinoma de vejiga  
cáncer de pulmón  
carcinoma epitelial  
Tumores sólidos, incluyendo, pero sin limitación:  
glioma  
glioblastoma multiforme  
astrocitoma  
meduloblastoma  
craneofaringioma  
ependimoma  
pinealoma  
hemangioblastoma  
neuroma acústico  
oligodendroglioma  
meningioma  
cáncer de piel  
melanoma  
neuroblastoma  
retinoblastoma

cánceres transmitidos por la sangre, incluyendo, pero sin limitación:

leucemia linfoblástica aguda "LLA"  
leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B  
leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T  
leucemia mielobástica aguda "LMA"  
leucemia promielocítica aguda "LPA"  
leucemia monoblástica aguda aguda  
leucemia eritroleucémica  
leucemia megacarioblástica aguda  
leucemia mielomonocítica aguda  
leucemia no linfocítica aguda  
leucemia aguda no diferenciada  
leucemia mielocítica crónica "LMC"  
leucemia linfocítica crónica "LLC"  
mieloma múltiple con leucemia de células pilosas

leucemias aguda y crónica:

leucemias linfoblásticas mielógenas linfocíticas mielocíticas

Linfomas:

enfermedad de Hodgkin y no de Hodgkin  
Linfoma

mieloma múltiple  
macroglobulinemia de Waldenstrom  
enfermedad de la cadena pesada  
policitemia vera

Los Conjugados ilustrativos proporcionan direccionamiento al tumor o al cáncer específico de la conjugación, reduciendo de esta manera la toxicidad general de este compuesto. Las Unidades enlazadoras estabilizan los Conjugados ilustrativos en la sangre, pero se pueden escindir por las proteasas específicas de tumor en el interior de

la célula, liberando el fármaco.

#### 4.8.2 TERAPIA MULTIMODAL PARA EL CÁNCER

- 5 Los cánceres, incluyendo, aunque no de forma limitativa, un tumor, metástasis, u otra enfermedad o trastorno caracterizado por un crecimiento celular incontrolado, se pueden tratar o prevenir mediante la administración de un Conjugado ilustrativo y/o un Compuesto ilustrativo.

10 En el presente documento se describen métodos para tratar o prevenir el cáncer, que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado ilustrativo y un agente quimioterapéutico. En un ejemplo, el agente quimioterapéutico es uno para el que se ha descubierto que, como tratamiento contra el cáncer, no genera resistencia. En otro ejemplo, el agente quimioterapéutico es uno para el que se ha descubierto que, como tratamiento contra el cáncer, genera resistencia. Los Conjugados ilustrativos pueden administrarse a un paciente que ha experimentado también cirugía como tratamiento para el cáncer.

15 En un ejemplo, el método de tratamiento adicional es la radioterapia.

20 En un ejemplo específico, el Conjugado ilustrativo se administra concurrentemente con el agente quimioterapéutico o con radioterapia. En otro ejemplo específico, el agente quimioterapéutico o la radioterapia se administra antes o posteriormente a la administración de un Conjugado ilustrativo, por ejemplo al menos un hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes, o varios meses (por ejemplo, hasta tres meses) ante o después de la administración de un Conjugado ilustrativo.

25 Se puede administrar un agente quimioterapéutico durante una serie de sesiones. Se puede administrar una cualquiera de una combinación de agentes quimioterapéuticos relacionados en la Tabla 4. Con respecto a la radiación, se puede usar cualquier protocolo de radioterapia dependiendo del cáncer que se va a tratar. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, se puede administrar radiación de rayos x; en particular, Se pueden usar megatensiones de alta energía (radiación de más de 1 MeV de energía) para los tumores profundos, y se pueden usar haces de electrones y ortotensiones de radiación de rayos X para los cánceres de piel. Los radioisótopos que emiten rayos gama, tales como los isótopos radiactivos de radio, cobalto, y otros elementos, también se pueden administrar.

35 Adicionalmente, los métodos para el tratamiento del cáncer con un Compuesto ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo se describen como alternativa a la quimioterapia o radioterapia, donde la quimioterapia o la radioterapia se ha demostrado que es, o que puede ser, tóxica, por ejemplo, da como resultado efectos secundarios inaceptables o insoportables, para el sujeto que se está tratando. El animal que se está tratando puede, opcionalmente, tratarse con otro tratamiento contra el cáncer como la cirugía, radioterapia o quimioterapia, dependiendo de qué tratamiento se considera aceptable o soportable.

40 Los Compuestos ilustrativos y/o Conjugados ilustrativos también se pueden usar de forma *in vitro* o *ex vivo*, tal como en el tratamiento de determinados cánceres, incluyendo, pero sin limitación, leucemias y linfomas, implicando dicho tratamiento trasplantes de citoblastos autólogos. Esto puede implicar un procedimiento multietapa en el que citoblastos hematopoyéticos autólogos del animal se recogen y limpian de todas las células cancerosas, a continuación se erradica la población de células de médula ósea restante del animal mediante la administración de una dosis elevada de un Compuesto ilustrativo y/o Conjugado ilustrativo con o sin radioterapia de dosis elevadas acompañante y el injerto de citoblastos se infunde posteriormente en el animal. A continuación, se proporciona tratamiento de soporte mientras se restaura la función de la médula ósea y se recupera el animal.

#### 4.8.3 TERAPIA MULTIFÁRMACO PARA EL CÁNCER

50 Se divulgan métodos para tratar el cáncer que incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado ilustrativo y otro agente terapéutico que es un agente anticanceroso. Los agentes antineoplásicos adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, metotrexato, taxol, L-asparaginasa, mercaptopurina, tioguanina, hidroxiurea, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, cisplatino, carboplatino, mitomicina, dacarbazina, procarbazona, topotecán, mostazas nitrogenadas, cytoxan, etopósido, 5-fluorouracilo, BCNU, irinotecán, camptotecinas, bleomicina, doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, asparaginasa, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel y docetaxel. En un aspecto, el agente antineoplásico incluye, aunque no de forma limitativa, un fármaco relacionado en la Tabla 4.

60

TABLA 4

Agentes alquilantes	
mostazas de nitrógeno:	ciclofosfamida ifosfamida trofosfamida clorambucilo melfalán
Agentes alquilantes	
Nitrosoureas:	carmustina (BCNU) lomustina (CCNU)
Alquilsulfonatos	busulfán
	treosulfano
Triazenos:	dacarbazina
Compuestos que contienen platino:	cisplatino carboplatino
Alcaloides vegetales	
alcaloides de vinca:	vincristina vinblastina vindesina vinorelbina
Taxoides:	paclitaxel docetaxol
Inhibidores de la topoisomerasa del ADN	
Epipodofilinas:	etopósido tenipósido topotecán 9-aminocamptotequina camptotecina crisnatol
mitomicinas:	mitomicina C
antimetabolitos	
antifolatos:	
inhibidores de DHFR:	metotrexato trimetrexato
Inhibidores de la IMP deshidrogenasa:	ácido micofenólico tiazofurina ribavirina EICAR
inhibidores de la ribonucleótido reductasa:	hidroxiurea deferoxamina
análogos de pirimidina:	
Análogos de uracilo	5-fluorouracilo
	floxuridina doxifluridina ratitrexed
análogos de citosina	citarabina (ara C) citosina arabinósido fludarabina

análogos de purina:	mercaptipurina tioguanina
tratamientos hormonales:	
Antagonistas de receptores:	
Antiestrógenos	tamoxifeno raloxifeno megestrol
agonistas de LHRH:	goserelina acetato de leuprólido
antiandrógenos:	flutamida bicalutamida
Retinoides/Deltoides	
análogos de la vitamina D3:	EB 1089 CB 1093 KH 1060
tratamientos fotodinámicos:	vertoporfina(BPD-MA) ftalocianina fotosensibilizador Pc4 demetoxi-hipocrelina A (n.º 2BA-2-DMHA)
Citoquinas:	interferón- $\alpha$ Interferón- $\gamma$ factor de necrosis tumoral
Otros:	Gemcitabina Velcade Revamid Talamid
inhibidores de la isoprenilación:	lovastatina
Neurotoxinas dopaminérgicas:	ion de 1-metil-4-fenilpiridinio
inhibidores del ciclo celular:	estaurosporina
Actinomicinas:	Actinomicina D
	dactinomicina
Bleomicinas:	bleomicina A2 bleomicina B2 peplomicina
Antraciclina:	daunorrubicina doxorrubicina (adriamicina) idarrubicina epirubicina pirarrubicina zorubicina mitoxantrona
inhibidores de MDR:	verapamilo
Inhibidores de la Ca <sup>2+</sup> ATPasa:	tapsigargina

#### 4.8.4 TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS

5 Los Conjugados ilustrativos son útiles para destruir o inhibir la replicación de una célula que produce una enfermedad autoinmunitaria o para tratar una enfermedad autoinmunitaria. Los Conjugados ilustrativos se pueden usar de acuerdo con ello en varios escenarios para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un paciente. Los Conjugados de fármaco-enlazador-ligando se pueden utilizar para administrar un fármaco a una célula

- diana. Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, el Conjugado de fármaco-enlazador-ligando se pueden asociar con el antígeno en la superficie de una célula diana, y el Conjugado ilustrativo se captura posteriormente al interior de la célula diana mediante endocitosis mediada por receptor. Una vez dentro de la célula, una o más secuencias específicas de péptido de la Unidad enlazadora se escinden hidrolítica o enzimáticamente, dando como resultado la liberación de un Fármaco. El Fármaco liberado queda libre para migrar al citosol e inducir actividades citotóxicas o citostáticas. En un ejemplo alternativo, el Fármaco o se escinde del Compuesto ilustrativo fuera de la célula diana, y el Fármaco posteriormente penetra en la célula.
- 5
- En un ejemplo, la Unidad de ligando se une a un antígeno autoinmunitario. En un aspecto, el antígeno se encuentra en la superficie de una célula implicada en una dolencia autoinmunitaria.
- 10
- En otro ejemplo, la unidad de ligando se une a un antígeno autoinmune que se encuentra en la superficie de una célula.
- 15
- En un ejemplo, el Ligando se une a linfocitos activados que están asociados con la patología autoinmune.
- En un ejemplo adicional, los Conjugados ilustrativos destruyen o inhiben la multiplicación de células que producen un anticuerpo autoinmunitario asociado con una enfermedad autoinmunitaria concreta.
- 20
- Los tipos concretos de enfermedades autoinmunitarias que se pueden tratar con los Conjugados ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, trastornos relacionados con linfocitos Th2 (por ejemplo, dermatitis atópica, asma atópica, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica, y enfermedad de injerto frente a hospedador); trastornos relacionados con linfocitos Th1 (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjogren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, y tuberculosis); trastornos relacionados con linfocitos B activados (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide, y diabetes de tipo I); y los descritos en la Tabla 5.
- 25

TABLA 5

Hepatitis crónica activa  
 Enfermedad de Addison  
 Alveolitis alérgica  
 Reacción alérgica  
 Rinitis alérgica  
 Síndrome de Alport  
 Anafilaxia  
 Espondilitis anquilosante  
 Síndrome antifosfolípidos  
 Artritis  
 Ascariasis  
 Aspergilosis  
 Alergia atópica  
 Dermatitis atópica  
 Rinitis atópica  
 Enfermedad de Behcet  
 Pulmón de Bird-Fancier  
 Asma bronquial  
 Síndrome de Caplan  
 Cardiomiopatía  
 Enfermedad celíaca  
 Enfermedad de Chagas  
 Glomerulonefritis crónica  
 Síndrome de Cogan  
 Enfermedad por crioaglutininas  
 Infección por rubeola congénita  
 Síndrome CREST enfermedad de Crohn  
 Crioglobulinemia  
 Síndrome de Cushing  
 Dermatomiositis  
 Lupus discoide  
 Síndrome de Dressler  
 Síndrome de Eaton-Lambert  
 Infección por Ecovirus  
 Encefalomielitis  
 Oftalmopatía endocrina  
 Infección por el virus Epstein-Barr

Náusas equinas  
Eritematosi  
Síndrome de Evan  
Síndrome de Felty  
Fibromialgia  
Ciclitis de Fuch  
Atrofia gástrica  
Alergia gastrointestinal  
Arteritis de células gigantes  
Glomerulonefritis  
Síndrome de Goodpasture  
Enfermedad de injerto frente a hospedador  
Enfermedad de Grave  
Enfermedad de Guillain-Barre  
Tiroiditis de Hashimoto  
Anemia hemolítica  
Púrpura de Henoch-Schonlein  
Atrofia idiopática de las glándulas suprarrenales  
Fibrosis pulmonar idiopática  
Nefropatía de IgA  
Enfermedad inflamatoria del intestino  
Diabetes mellitus insulinodependiente  
Artritis juvenil  
Diabetes mellitus juvenil  
Síndrome de Lambert-Eaton  
Laminitis  
Liquen plano  
Hepatitis lupoide  
Lupus  
Linfopenia  
Enfermedad de Meniere  
Enfermedad del tejido conectivo mixto  
Esclerosis múltiple  
Miastenia grave  
Anemia perniciosa  
Síndromes poliglandulares  
Demencia presenil  
Agammaglobulinemia primaria  
Cirrosis biliar primaria  
Psoriasis  
Artritis psoriática  
Fenómeno de Raynaud  
Aborto recurrente  
Síndrome de Reiter  
Fiebre reumática  
Artritis reumatoide  
síndrome de Sampler  
Esquistosomiasis  
Síndrome de Schmidt  
Escleroderma  
Síndrome de Shulman  
Síndrome de Sjorgen  
Síndrome de Stiff-Man  
Oftalmia simpática  
Lupus sistémico eritematoso  
Arteritis de Takayasu  
Arteritis temporal  
Tiroiditis  
Trombocitopenia  
Tirototoxicosis  
Necrosis epidérmica tóxica  
Resistencia a la insulina de tipo B  
Diabetes mellitus Tipo 1  
Colitis ulcerosa  
Uveitis  
vitiligo

Macroglobulemia de Waldenstrom, Granulomatosis de Wegener

4.8.5 TERAPIA MULTIFÁRMACO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS

5 Se describen métodos para tratar una enfermedad autoinmunitaria que incluyen la administración a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un Conjugado ilustrativo y otro agente terapéutico conocido para el tratamiento de una enfermedad autoinmune. En un ejemplo, el agente de la enfermedad autoinmunitaria incluye, aunque no de forma limitativa, los agentes relacionados en la Tabla 6.

10 Tabla 6

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

4.8.6 TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

15 Los Conjugados ilustrativos son útiles para destruir o inhibir la multiplicación de una célula que produce una enfermedad infecciosa o para tratar una enfermedad infecciosa. Los Conjugados ilustrativos se pueden usar de acuerdo con ello en varios escenarios para el tratamiento de una enfermedad infecciosa en un paciente. Los Conjugados de fármaco-enlazador-ligando se pueden utilizar para administrar un fármaco a una célula diana. En un ejemplo, la Unidad de ligando se une a la célula de la enfermedad infecciosa.

20 En un ejemplo, los Conjugados ilustrativos destruyen o inhiben la multiplicación de células que producen una enfermedad infecciosa concreta.

Los tipos concretos de enfermedades infecciosas que se pueden tratar con los Conjugados ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, los descritos en la Tabla 7.

25

TABLA 7

Enfermedades bacterianas:  
 Difteria  
 Tosferina  
 Bacteremia oculta  
 Infección del tracto urinario  
 Gastroenteritis  
 Celulitis  
 Epiglotitis  
 Traqueítis  
 Hipertrofia de adenoides  
 Absceso retrofaríngeo  
 Impétigo  
 Ectima  
 Neumonía  
 Endocarditis  
 Artritis séptica



Pneumocócica  
Peritonitis  
Bacteremia  
Meningitis  
Meningitis purulenta aguda  
Uretritis  
Cervicitis  
Proctitis  
Faringitis  
Salpingitis  
Epididimitis  
Gonorrea  
Sífilis  
Listeriosis  
Ántrax  
Nocardiosis  
Salmonella  
Fiebre tifoidea  
Disentería  
Conjuntivitis  
Sinusitis

Enfermedades bacterianas:  
Brucelosis  
Tularemia  
Cólera  
Peste bubónica Tétanos  
Enteritis necrosante  
Actinomicosis  
Infecciones anaerobias mixtas  
Sífilis  
Fiebre recurrente  
Leptospirosis  
Enfermedad de Lyme  
Fiebre por mordedura de rata  
Tuberculosis  
Linfoadenitis  
Lepra  
Clamidia  
Neumonía por clamidia  
Tracoma  
Conjuntivitis por inclusión

Enfermedades fúngicas sistémicas:  
Histoplasmosis  
Coccidiodomicosis  
Blastomicosis  
Esporitricosis  
Criptococosis  
Candidiasis sistémica  
Aspergilosis  
Mucormicosis  
Micetoma  
Cromomicosis

Enfermedades por rickettsia:  
Tifus  
Fiebre con manchas de las Montañas Rocosas  
Erliquiosis  
Rickettsiosis transmitida por la pulga oriental de la rata  
Viruela por Rickettsia  
Fiebre Q  
Bartonelosis

Enfermedades parasíticas:  
Malaria  
Babesiosis  
Enfermedad del sueño africana  
Enfermedad de Chagas  
Leishmaniasis

Fiebre Dum-Dum  
Toxoplasmosis  
Meningoencefalitis  
Queratitis  
Entamebiasis  
Enfermedades parasíticas:  
Giardiasis  
Criptosporidiasis  
Isosporiasis  
Ciclosporiasis  
Microsporidiosis  
Ascariasis  
Tricuriasis  
Anquilostomiasis  
Estrongiloidiasis  
Larva Migrans ocular  
Triquinosis  
Dracunculiasis  
Filariasis linfática  
Loiasis  
Oncocercosis  
Dirofilariasis  
Esquistosomiasis  
Picadura de notonéctido  
paragonimiasis  
Clonorquiasis  
Fascioliasis  
Fasciolopsiasis  
Opistorquiasis  
Infección por cestodos  
Hidatiasis  
Enfermedad hidatídica alveolar  
Enfermedades víricas:  
Sarampión  
Panencefalitis esclerosante subaguda  
Resfriado común  
Paperas  
Rubeola  
Roseola  
Eritema infeccioso  
Viruela aviar  
Infección por virus sincitial respiratorio  
Laringotraqueobronquitis  
Bronquiolitis  
Mononucleosis infecciosa  
Poliomelitis  
Herpangina  
Fiebre aftosa humana  
Enfermedad de Bornholm  
Herpes genital  
Verrugas genitales  
Meningitis aséptica  
Miocarditis  
Pericarditis  
Gastroenteritis  
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)  
Enfermedades víricas:  
Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)  
Síndrome de Reye  
Síndrome de Kawasaki  
Gripe  
Bronquitis  
Neumonía atípica  
Síndrome paragripal  
Fiebre faringoconjuntival aguda  
Queratoconjuntivitis epidémica

Virus del herpes simple 1 (VHS-1)  
 Virus del herpes simple 2 (VHS-2)  
 Herpes zoster  
 Infección por citomegalovirus  
 Rabia  
 Leucoencefalopatía multifocal progresiva  
 Kuru  
 Insomnio familiar fatal  
 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob  
 Enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker  
 Paraparesis espástica tropical  
 Encefalitis equina occidental  
 Encefalitis de California  
 Encefalitis de San Luis  
 Fiebre amarilla  
 Dengue  
 Coriomeningitis linfocítica  
 Fiebre de Lassa hemorrágica  
 Fiebre Síndrome pulmonar por hantavirus  
 Infecciones por el virus Marburg  
 Infecciones por el virus del Ébola  
 Viruela

4.8.7 TERAPIA MULTIFÁRMACO PARA ENFERMEDADES INFECCIOSAS

5 Se describen métodos para tratar una enfermedad infecciosa que incluyen la administración a un paciente que lo necesita un Conjugado ilustrativo y otro agente terapéutico que es un agente dirigido contra enfermedades infecciosas. En un ejemplo, el agente de la enfermedades antiinfecciosa es, aunque no de forma limitativa,, los agentes relacionados en la Tabla 8.

TABLA 8

10

Antibióticos de  $\beta$ -lactamas:  
 Penicilina G  
 Penicilina V  
 Cloxacilina  
 Dicloxacilina  
 Metecilina  
 Nafcilina  
 Oxacilina  
 Ampicilina  
 Amoxicilina  
 Antibióticos de  $\beta$ -lactamas:  
 Bacampicilina  
 Azlocilina  
 Carbenicilina  
 Mezlocilina  
 Piperacilina  
 Ticarcilina  
 Aminoglicósidos:  
 Amikacina  
 Gentamicina  
 Kanamicina  
 Neomicina  
 Netilmicina  
 Estreptomina  
 Tobramicina  
 Macrólidos:  
 Azitromicina  
 Claritromicina  
 Eritromicina  
 Lincomicina  
 Clindamicina  
 Tetraciclinas:  
 Demeclociclina  
 Doxiciclina

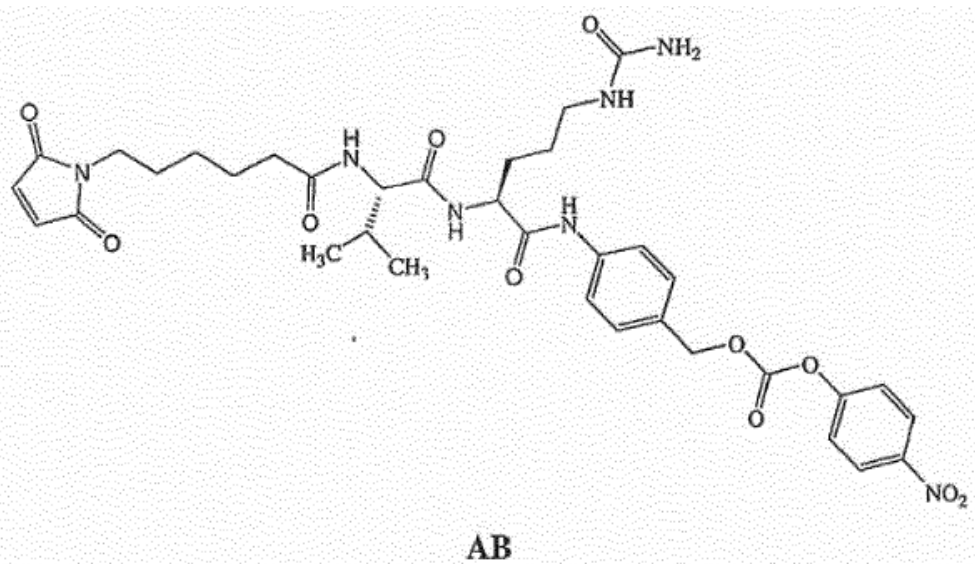
Minociclina  
Oxitetraciclina  
Tetraciclina  
Quinolonas:  
Cinoxacina  
Ácido nalidíxico  
Fluoroquinolonas:  
Ciprofloxacina  
Enoxacina  
Grepafloxacina  
Levofloxacina  
Lomefloxacina  
Norfloxacina  
Ofloxacina  
Esparfloxacina  
Trovafoxicina  
Polipéptidos:  
Bacitracina  
Colistina  
Polimixina B  
Sulfonamidas:  
Sulfisoxazol  
Sulfametoxazol  
Sulfadiazina  
Sulfametizol  
Sulfacetamida  
Diversos  
Agentes antibacterianos:  
Trimetoprim  
Sulfametazol  
Cloranfenicol  
Vancomicina  
Metronidazol  
Quinupristina  
Dalfopristina  
Rifampina  
Espectinomicina  
Nitrofurantoina  
Agentes antiviricos:  
Agentes antiviricos generales:  
Idoxuradina  
Vidarabina  
Trifluridina  
Aciclovir  
Famciclovir  
Penciclovir  
Valaciclovir  
Ganciclovir  
Foscarnet  
Ribavirina  
Amantadina  
Rimantadina  
Cidofovir  
Antisentido  
Oligonucleótidos  
Inmunoglobulinas  
Interferones  
Fármacos para la infección por VIH:  
Tenofovir  
Emtricitabina  
Zidovudina  
Didanosina  
Zalcitabina  
Estavudina  
Lamivudina  
Nevirapina

Delavirdina  
Saquinavir  
Ritonavir  
Indinavir  
Nelfinavir

## 5. Ejemplos

### Ejemplo 1 - Preparación del compuesto AB

5



10 Fmoc-val-cit-PAB-OH (14,61 g, 24,3 mmol, 1,0 eq., patente de Estados Unidos n.º 6214345 de Firestone et al.) se diluyó con DCM (120 ml, 0,2 M) y a esta solución se añadió dietilamina (60 ml). La reacción se controló mediante HPLC, y se descubrió que se había completado en 2 h. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se precipitó usando acetato de etilo (aprox. 100 ml) con sonicación durante 10 min. Se añadió éter (200 ml) y el precipitado se sonicó durante 5 min más. La solución se dejó reposar durante 30 min sin agitación, y después se filtró y se secó a alto vacío para proporcionar Val-cit-PAB-OH, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento: 8,84 g (96 %). Val-cit-PAB-OH (8,0 g, 21 mmol) se diluyó con DMF (110 ml) y la solución

15 resultante se trató con MC-OSu (Willner et al., (1993) Bioconjugate Chem. 4:521; 6,5 g, 21 mmol, 1,0 eq.). Según el HPLC, la reacción se había completado después de 2 h. La mezcla de reacción se concentró y el aceite resultante se precipitó usando acetato de etilo (50 ml). Después de sonicar durante 15 min, se añadió éter (400 ml) y la mezcla se sonicó adicionalmente hasta que todas las partículas grandes se hubieron roto. A continuación, la solución se filtró y el sólido se secó para proporcionar un intermedio sólido de color crema. Rendimiento: 11,63 g (96 %); ES-MS  $m/z$  757,9 [M-H]

20

25 Fmoc-val-cit-PAB-OH (14,61 g, 24,3 mmol, 1,0 eq., patente de Estados Unidos n.º 6214345 de Firestone et al.) se diluyó con DCM (120 ml, 0,2 M) y a esta solución se añadió dietilamina (60 ml). La reacción se controló mediante HPLC y se descubrió que se había completado en 2 h. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se precipitó usando acetato de etilo (aprox. 100 ml) con sonicación durante 10 min. Se añadió éter (200 ml) y el precipitado se sonicó durante 5 min más. La solución se dejó reposar durante 30 min sin agitación, y después se filtró y se secó a alto vacío para proporcionar Val-cit-PAB-OH, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento: 8,84 g (96 %). Val-cit-PAB-OH (8,0 g, 21 mmol) se diluyó con DMF (110 ml) y la solución

30 resultante se trató con MC-OSu (Willner et al., (1993) Bioconjugate Chem. 4:521; 6,5 g, 21 mmol, 1,0 eq.). Según el HPLC, la reacción se había completado después de 2 h. La mezcla de reacción se concentró y el aceite resultante se precipitó usando acetato de etilo (50 ml). Después de sonicar durante 15 min, se añadió éter (400 ml) y la mezcla se sonicó adicionalmente hasta que todas las partículas grandes se hubieron roto. A continuación, la solución se filtró y el sólido se secó para proporcionar un intermedio sólido de color crema. Rendimiento: 11,63 g (96 %); ES-MS  $m/z$  757,9 [M-H].

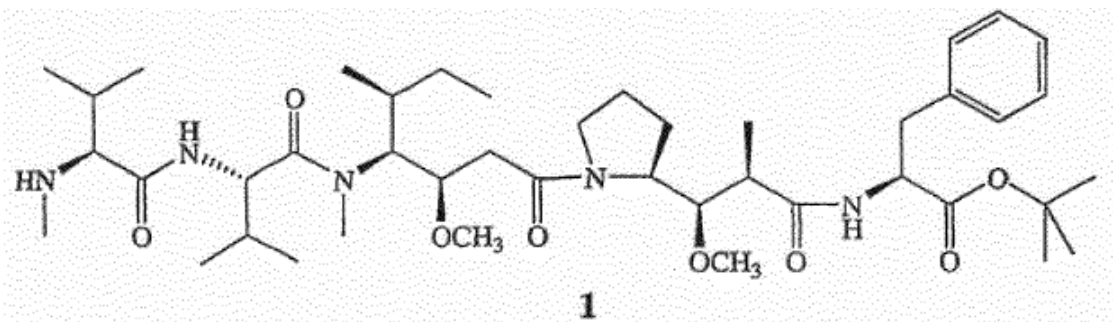
35

El intermedio sólido de color crema (8,0 g, 14,0 mmol) se diluyó con DMF (120 ml, 0,12 M) y a la solución resultante se añadió bis(4-nitrofenil)carbonato (8,5 g, 28,0 mmol, 2,0 eq.) y D3EA (3,66 ml, 21,0 mmol, 1,5 eq.). Según el HPLC, la reacción se había completado en 1 h. La mezcla de la reacción se concentró para proporcionar un aceite que se precipitó con EtOAc, y después se trituró con EtOAc (aprox. 25 ml). El soluto se precipitó adicionalmente con

40 éter (aprox. 200 ml) y se trituró durante 15 min. El sólido se filtró y se secó con alto vacío para proporcionar el Compuesto **AB** que tenía una pureza del 93 % según HPLC y se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Rendimiento: 9,7 g (94 %).

Ejemplo 2 - Preparación del compuesto 1



5

La sal de HCl de fenilalanina *t*-butil éster (868 mg, 3 mmol), *N*-Boc-Dolaproína (668 mg, 1 eq.), DEPC (820  $\mu$ l, 1,5 eq.), y DIEA (1,2 ml) se diluyeron con diclorometano (3 ml). Después de 2 horas (h) a temperatura ambiente (aproximadamente 28 grados Celsius), la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (20 ml), se lavó sucesivamente con una solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 10 ml), solución acuosa saturada de NaCl (2 x 10 ml). La capa orgánica se separó y se concentró. El residuo resultante se resuspendió en acetato de etilo y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en acetato de etilo. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el dipéptido en forma de un sólido de color blanco: 684 mg (46 %). ES-MS  $m/z$  491,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

10

15

Para la escisión selectiva de Boc en presencia del *t*-butil éster, el dipéptido anterior (500 mg, 1,28 mmol) se diluyó con dioxano (2 ml). se añadió HCl 4 M en dioxano (960  $\mu$ l, 3 eq.), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Una desprotección de Boc casi completa se observó mediante RP-HPLC con una cantidad mínima de escisión del *t*-butil éster. La mezcla se enfrió en un baño de hielo, y se añadió trietilamina (500  $\mu$ l). Después de 10 min, la mezcla se retiró del baño de refrigeración, se diluyó con diclorometano (20 ml), se lavó sucesivamente con solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 10 ml), solución acuosa saturada de NaCl (2 x 10 ml). La capa orgánica se concentró para dar una espuma de color amarillo: 287 mg (57 %). El intermedio se usó sin purificación adicional.

20

25

El tripéptido Fmoc-Meval-val-dil-O-*t*-Bu (preparado como se describe en el documento WO 02/088172, titulado "*Penfapeptide Compounds and Uses Related Thereto*"; 0,73 mmol) se trató con TFA (3 ml), diclorometano (3 ml) durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a sequedad, el residuo se evaporó simultáneamente con tolueno (3 x 20 ml), y se secó al vacío durante una noche. El residuo se diluyó con diclorometano (5 ml) y se añadió al dipéptido desprotegido (287 mg, 0,73 mmol), seguido por DIEA (550  $\mu$ l, 4 eq.), DEPC (201  $\mu$ l, 1,1 eq.). Después de 2 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (50 ml), se lavó sucesivamente con una solución acuosa de ácido cítrico al 10 % (2 x 20 ml), solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 10 ml), solución acuosa saturada de NaCl (10 ml). La capa orgánica se separó y se concentró. El residuo resultante se resuspendió en acetato de etilo y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en acetato de etilo. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar Fmoc-Meval-val-dil-dap-phe-O-*t*-Bu en forma de un sólido de color blanco: 533 mg (71 %).  $R_f$  0,4 (EtOAc). ES-MS  $m/z$  1010,6  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

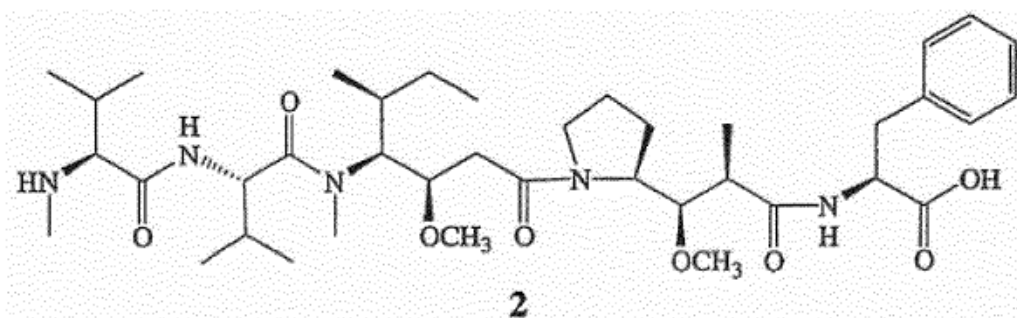
30

35

El producto (200 mg, 0,2 mmol) se diluyó con diclorometano (3 ml), dietilamina (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Los disolventes se eliminaron para proporcionar un aceite que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice con un gradiente en etapas de MeOH 0-10 % en diclorometano para proporcionar el Compuesto 1 en forma de un sólido de color blanco: 137 mg (87 %).  $R_f$  0,3 (MeOH 10 % en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). ES-MS  $m/z$  788,6  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

40

Ejemplo 3 - Preparación del compuesto 2

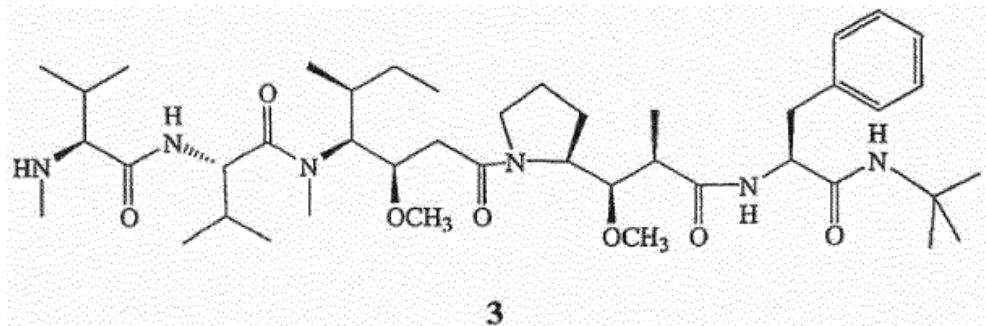


45

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

5

#### Ejemplo 4 - Preparación del compuesto 3

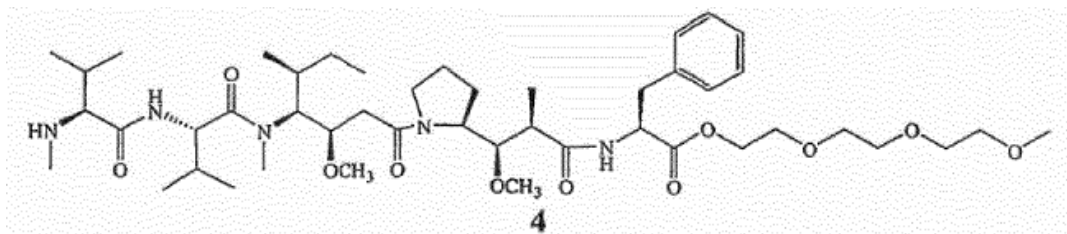


10 Fmoc-Meval-val-dil-dap-phe-O-*t*-Bu (Ejemplo 2, 50 mg) se trató con HCl 4 M en dioxano (4 ml) durante 16 h a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó, y el residuo se secó al vacío durante una noche para proporcionar 50 mg de un intermedio sólido higroscópico de color blanco

15 El intermedio sólido de color blanco (20 mg, 0,02 mmol) se diluyó con diclorometano (1 ml); se añadió DEPC (5  $\mu$ l, 0,03 mmol, 1,5 eq.) seguido por DIEA (11  $\mu$ l, 0,06 mmol, 3 eq.), y *t*-butilamina (3,2  $\mu$ l, 0,03 mmol, 1,5 eq.). Después de 2 h a temperatura ambiente, según la RP-HPLC, la reacción estaba incompleta. Se añadieron más DEPC (10  $\mu$ l) y *t*-butilamina (5  $\mu$ l) y la reacción se agitó durante 4 h más. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (15 ml), se lavó sucesivamente con agua (5 ml), solución ac de HCl 0,1 M (10 ml), solución acuosa saturada de NaCl (10 ml). La capa orgánica se separó y se concentró. El residuo resultante se diluyó con diclorometano y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida con un gradiente en etapas de MeOH al 0-5 % en diclorometano. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el intermedio protegido con Fmoc en forma de un sólido de color blanco: 7,3 mg (36 %).  $R_f$  0,75 (MeOH 10 % en  $CH_2Cl_2$ ).

25 El intermedio protegido con Fmoc se diluyó con diclorometano (0,5 ml) y se trató con dietilamina (0,5 ml) durante 3 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a sequedad. El producto se aisló mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice con un gradiente en etapas de MeOH 0-10 % en diclorometano para proporcionar el Compuesto 3 en forma de un sólido de color blanco: 4 mg (70 %).  $R_f$  0,2 (MeOH 10 % en  $CH_2Cl_2$ ). ES-MS  $m/z$  787  $[M+H]^+$ , 809  $[M+Na]^+$ .

#### 30 Ejemplo 5 - Preparación del compuesto 4



35 Boc-L-Fenilalanina (265 mg, 1 mmol, 1 eq.) y trietilenglicol monometil éter (164  $\mu$ l, 1 mmol, 1 eq.) se diluyeron con diclorometano (5 ml). Después, se añadió DCC (412 mg, 2 mmol, 2 eq.), seguido de DMAP (10 mg). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El precipitado se separó por filtración. El disolvente se retiró al vacío, el residuo se diluyó con acetato de etilo, y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice en acetato de etilo. Las fracciones que contenían producto se combinaron, se concentraron y se secaron al vacío para proporcionar un sólido de color blanco: 377 mg (91 %).  $R_f$  0,5 (EtOAc). ES MS  $m/z$  434  $[M+H]^+$ .

40

La eliminación del grupo protector Boc se llevó a cabo por tratamiento del material anterior en dioxane (10 ml) con HCl 4 M en dioxano (6 ml) durante 6 h a temperatura ambiente. El disolvente se retiró al vacío, el residuo se secó al vacío para proporcionar un sólido de color blanco.

45 La sal de HCl del Fenilalanina-trietilenglicol monometil éter éster (236 mg, 0,458 mmol, 1 eq.) y AT- Boc-Dolaproína (158 mg, 0,55 mmol, 1,2 eq.) se diluyeron con diclorometano (3 ml). DEPC (125  $\mu$ l, 1,5 eq.) y se añadió a la mezcla seguido por DIEA (250  $\mu$ l, 3 eq.). Después de 2 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con

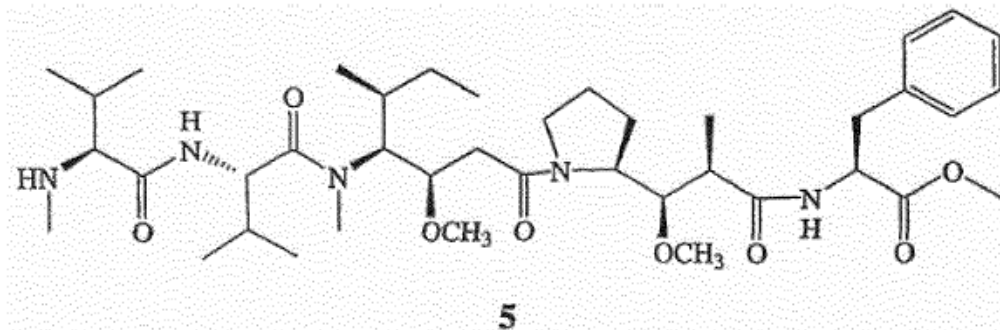
acetato de etilo (30 ml), se lavó sucesivamente con una solución acuosa de  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 10 ml), solución acuosa de ácido cítrico al 10 % (2 x 10 ml) y solución acuosa de  $\text{NaCl}$  (10 ml). La capa orgánica se separó y se concentró. El residuo resultante se resuspendió en acetato de etilo y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice en acetato de etilo. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el intermedio en forma de una espuma de color blanco: 131 mg (50 %).  $R_f$  0,25 (EtOAc). ES-MS  $m/z$  581,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

La desprotección de Boc se realizó en diclorometano (2 ml), TFA (0.5 ml) a temperatura ambiente durante 2 h. El disolvente se eliminó al vacío y el residuo se evaporó simultáneamente con tolueno (3 x 25 ml), después se secó al vacío para proporcionar 138 mg de la sal del dipéptido de TFA.

Fmoc-Meval-val-dil-OH (Ejemplo 2, 147 mg, 0,23 mmol, 1 eq.), y la sal del dipéptido TFA (138 mg) se diluyeron con diclorometano (2 ml). Se añadió DEPC (63  $\mu\text{l}$ , 1,5 eq.) a la mezcla, seguido por DIEA (160  $\mu\text{l}$ , 4 eq.). Después de 2 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (30 ml), se lavó sucesivamente con una solución acuosa de ácido cítrico al 10 % (2 x 20 ml), solución acuosa saturada de  $\text{NaCl}$  (20 ml). La capa orgánica se separó y se concentró. El residuo resultante se resuspendió con diclorometano y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida con un gradiente en etapas de MeOH al 0-5 % en diclorometano. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar una espuma de color blanco: 205 mg (81 %).  $R_f$  0,4 (MeOH 10 % en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). ES-MS  $m/z$  1100,6  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 1122,4  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

El grupo protector Fmoc se eliminó por tratamiento con dietilamina (2 ml) en diclorometano (6 ml). Después de 6 h a temperatura ambiente, el disolvente se eliminó al vacío, el producto se aisló mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice en un gradiente en etapas de MeOH 0-10 % en diclorometano. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron. Tras la evaporación en diclorometano/hexano, 1:1, el compuesto 4 se obtuvo en forma de una espuma de color blanco: 133 mg (80 %).  $R_f$  0,15 (MeOH 10 % en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). ES-MS  $m/z$  878,6  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### Ejemplo 6 - Preparación del compuesto 5

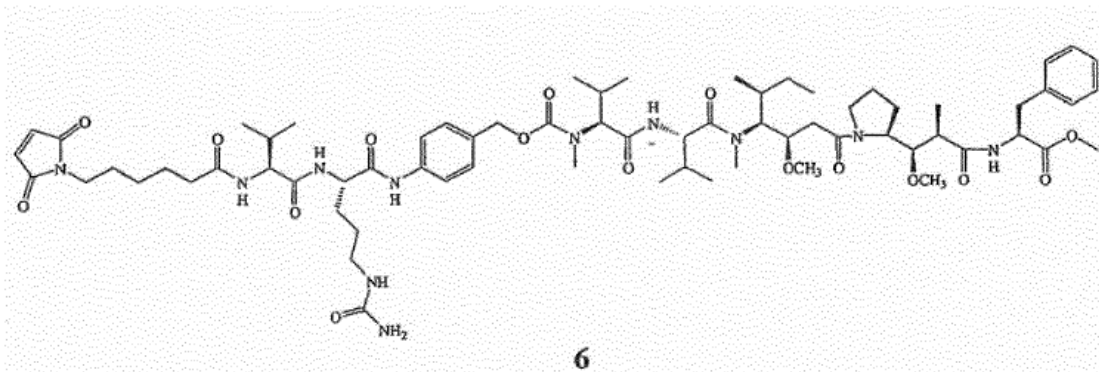


Fmoc-Meval-val-dil-OH (Ejemplo 2, 0,50 g, 0,78 mmol) y dap-phe-OMe-HCl (0,3 g, 0,78 mmol, preparado de acuerdo con Pettit, G.R., et al Anti-Cancer Drug Design 1998, 13, 243-277) se disolvieron en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml) seguido por la adición de diisopropiletilamina (0,30 ml, 1,71 mmol, 2,2 eq.). Se añadió DEPC (0,20 ml, 1,17, 1,5 eq.) y el contenido se guardó bajo Ar. La reacción se completó de acuerdo con el HPLC en 1 h. La mezcla se concentró hasta obtener un aceite que se purificó mediante cromatografía en  $\text{SiO}_2$  (columna 300 x 25 mm) y se eluyó con 100 % EtOAc. El producto se aisló en forma de un sólido de color blanco espumoso. Rendimiento: 0,65 g (87 %). ES-MS  $m/z$  968,35  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 991,34  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; UV  $\lambda_{\text{max}}$  215,265 nm.

El péptido protegido con Boc (0,14 g, 0,14 mmol) en cloruro de metileno (5 ml) se trató con dietilamina (2 ml) y el contenido se guardó a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción, completa según el HPLC, se concentró hasta dar un aceite, se capturó en 2 ml de DMSO y se inyectó en una columna de HPLC preparativa ( $\text{C}_{12}$ -RP, 5  $\mu\text{m}$ , 100 Å, gradiente lineal de MeCN en agua (que contenía TFA al 0,1 %) 10 a 100 % en 40 min seguido por 20 min a 100 %, a un caudal de 25 ml/min). Las fracciones que contenían el producto se evaporaron para proporcionar un polvo de color blanco para la sal de trifluoroacetato. Rendimiento: 0,126 g (98 %).  $R_f$  0,28 (100 % EtOAc); ES-MS  $m/z$  746,59  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 768,51  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; UV  $\lambda_{\text{max}}$  215 nm.

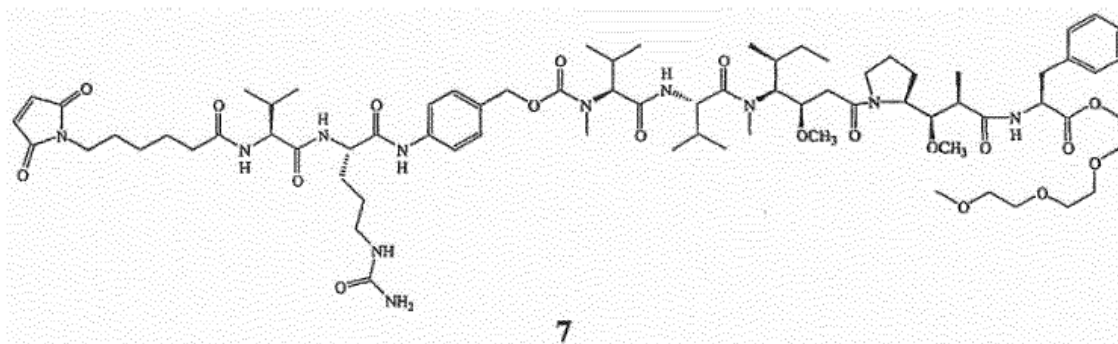


## Ejemplo 7 - Preparación del compuesto 6

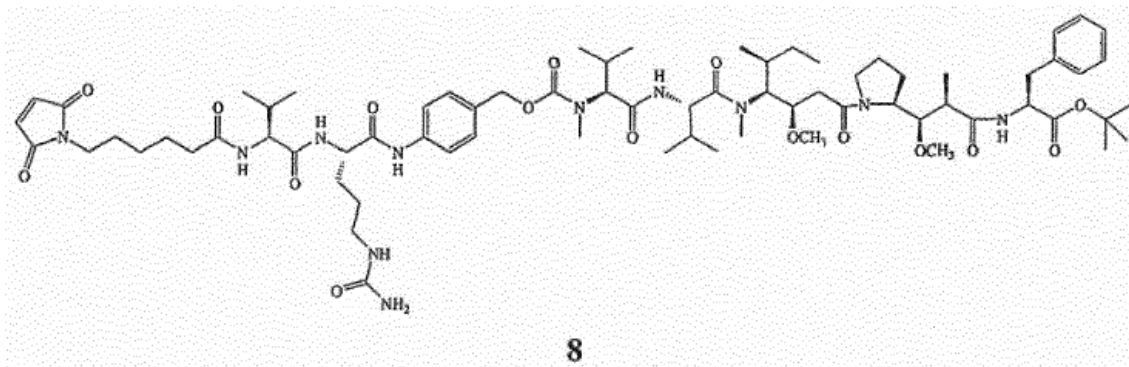


- 5 La sal de trifluoroacetato del Compuesto **5** (0,11 g, 0,13 mmol), Compuesto **AB** (0,103 g, 0,14 mmol, 1,1 eq.) y HOBt (3,4 mg, 26  $\mu$ mol, 0,2 eq.) se suspendieron en DMF/piridina (2 ml/0,5 ml, respectivamente). Se añadió diisopropiletilamina (22,5  $\mu$ l, 0,13 mmol, 1,0 equiv.) y la solución de color amarillo se agitó bajo atmósfera de argón. Después de 3 h, se añadió 1,0 eq. adicional de DIEA. Después de 24 horas, 0,5 eq. del enlazador activado se incluyó en la mezcla de reacción. Después de 40 h en total, la reacción se completó. El contenido se evaporó, se capturó en DMSO y se inyectó en una columna de HPLC prep (C<sub>12</sub>-RP, 5  $\mu$ , 100 Å, gradiente lineal de MeCN en agua (que contenía TFA al 0,1 %) 10 a 100 % en 40 min seguido por 20 min a 100 %, a un caudal de 50 ml/min). Las fracciones deseadas se evaporaron para obtener el producto deseado en forma de un aceite de color amarillo. Cloruro de metileno (aprox. 2 ml) y un exceso de éter se añadieron para proporcionar el Compuesto 6 en forma de un precipitado de color blanco que se filtró y se secó. Rendimiento: 90 mg (52 %). ES-MS  $m/z$  1344,32 [M+H]<sup>+</sup>, 1366,29 [M+Na]<sup>+</sup>; UV  $\lambda_{\max}$  215, 248 nm.
- 10
- 15

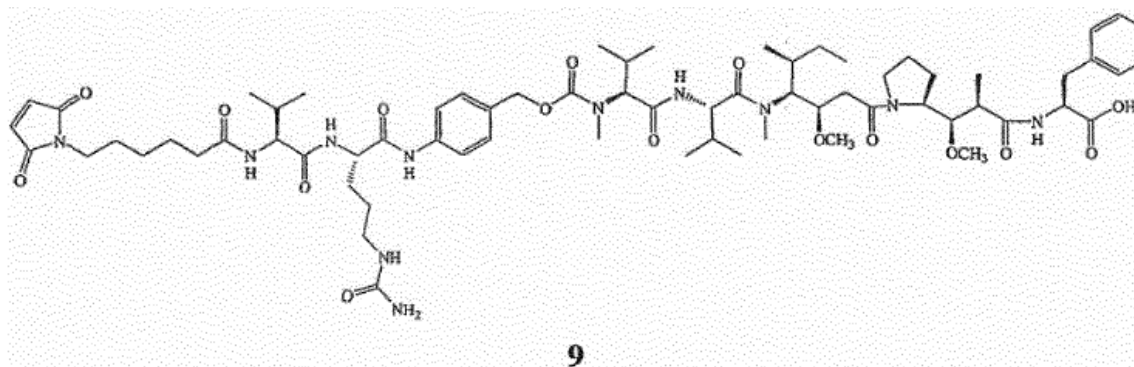
## Ejemplo 8 - Preparación del compuesto 7



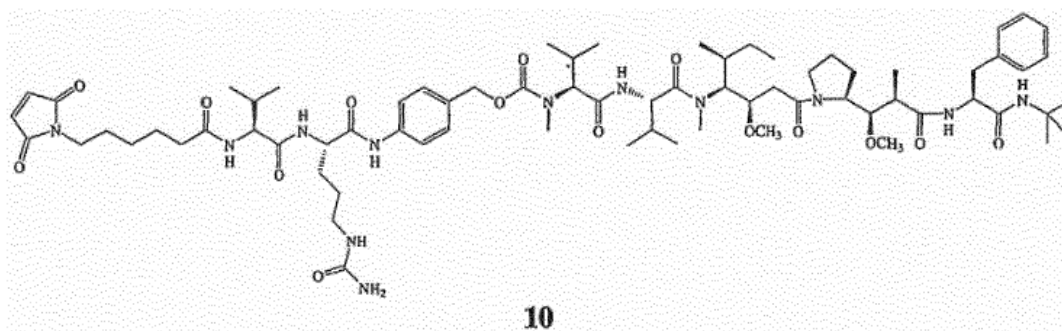
- 20 Compuesto **4** (133 mg, 0,15 mmol, 1 eq.), Compuesto **AB**, (123 mg, 0,167 mmol, 1,1 eq.), y HOBt (4 mg, 0,2 eq.) se diluyeron con DMF (1,5 ml). Después de 2 min, se añadió piridina (5 ml) y la reacción se controló mediante RP-HPLC. La reacción se mostró completada en aprox. 18 h. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (20 ml), se lavó sucesivamente con una solución acuosa de ácido cítrico al 10 % (2 x 10 ml), agua (10 ml), solución acuosa saturada de NaCl (10 ml). La capa orgánica se separó y se concentró. El residuo resultante se resuspendió con diclorometano y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida con un gradiente en etapas de MeOH al 0-10 % en diclorometano. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el Compuesto 7 en forma de una espuma de color blanco: 46 mg (21 %). R<sub>f</sub> 0,15 (MeOH 10 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). ES-MS  $m/z$  1476,94 [M+H]<sup>+</sup>.
- 25
- 30

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

- 5 Compuesto 1 (83 mg, 0,11 mmol), Compuesto **AB** (85 mg, 0,12 mmol, 1,1 eq.) y HOBt (2,8 mg, 21  $\mu$ mol, 0,2 eq.) se capturaron en DMF seco (1,5 ml) y piridina (0,3 ml) bajo atmósfera de argón. Después de 30 h, según HPLC, la reacción estaba prácticamente completa. La mezcla se evaporó, se capturó en una cantidad mínima de DMSO y se purificaron mediante HPLC-prep (columna C<sub>12</sub>-RP, 5  $\mu$ , 100 Å, gradiente lineal de MeCN en agua (que contenía TFA al 0,1 %) 10 a 100 % en 40 min seguido por 20 min a 100 %, a un caudal de 25 ml/min) para proporcionar el
- 10 Compuesto 8 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 103 mg (71 %). ES-MS  $m/z$  1387,06 [M+H]<sup>+</sup>, 1409,04 [M+Na]<sup>+</sup>; UV  $\lambda_{\max}$  205, 248 nm.

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

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

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

- 30 Compuesto 3 (217 mg, 0,276 mmol, 1,0 eq.), Compuesto **AB** (204 mg, 0,276 mmol, 1,0 eq.), y HOBt (11 mg, 0,0828 mmol, 0,3 eq.) se diluyeron con piridinina/DMF (6 ml). A esta mezcla se añadió DIEA (0,048 ml), y la mezcla

se agitó aprox. 16 h. Los compuestos volátiles se evaporaron al vacío. El residuo en bruto se purificó mediante Chromatotron® (cromatografía en capa fina radial) con un gradiente en etapas de (metanol al 0-5-10 % en DCM) para proporcionar MC-val-cit-PAB-MMAF *terc*-butil amida **10**. Rendimiento: 172 mg (45 %); ES-MS m/z 1386,33 [M+H]<sup>+</sup>, 1408,36 [M+Na]<sup>+</sup>; UV  $\lambda_{\max}$  215, 248 nm.

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

10 AC10, disuelto en una solución de borato de sodio 500 mM y cloruro de sodio 500 mM a pH 8,0, se trata con un exceso de ditioneitol 100 mM (DTT). Tras una incubación a 37°C durante aproximadamente 30 minutos, el tampón se intercambió por elución en resina Sephadex G25 y se eluyó con PBS con DTPA 1 mM. El valor tIol/Ab se comprobó determinando la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia de la solución medida a 280 nm y de la concentración de tIol determinada por reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido disuelto en PBS se enfrió sobre hielo.

15 El reactivo enlazador de fármaco, maleimidocaproil-monometil auristatina E, es decir, MC-MMAE, disueltos en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua a concentración conocida, y se añadió al anticuerpo AC10 muy frío en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añadió un exceso de maleimida para desactivar la reacción y proteger todos los grupos tIol del anticuerpo sin reaccionar. La mezcla de reacción se concentró mediante ultrafiltración centrífuga y AC10-MC-MMAE se purificó y desaló por elución a través de resina G25 en PBS, se filtró a través de  
20 filtros de 0,2  $\mu\text{m}$  en condiciones estériles, y se congeló para su almacenamiento.

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 16 - Determinación de la citotoxicidad de compuestos seleccionados

40 Se evaluó la actividad citotóxica de MMAF y los compuestos **1-5** en las líneas de células OVCAR-3 positivas para Lewis Y, se pueden evaluar las líneas de células H3396 de carcinoma de mama, L2987 de carcinoma de pulmón y LS174t de carcinoma de colon positivas para Lewis Y para la citotoxicidad. Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos **1-5**, se pueden sembrar las células a aproximadamente 5 - 10.000 por pocillo en 150  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo tratado con dosis graduadas de compuestos **1-5** por cuadruplicado al inicio del ensayo. Los ensayos de citotoxicidad se llevan a cabo habitualmente en las 96 horas posteriores a la adición de los compuestos de ensayo. Cincuenta  $\mu\text{l}$  de colorante resazurina se pueden añadir a cada pocillo en las últimas 4 a 6 horas de la incubación  
45 para evaluar las células viables al final del cultivo. Se puede determinar la reducción del colorante mediante espectrometría de fluorescencia utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 535nm y 590nm, respectivamente. Para análisis, se puede comparar la extensión de la reducción de la resazurina por las células tratadas con las células del control sin tratar.

50 Para los ensayos de exposición de 1 h se pueden someter a pulsos las células con el fármaco durante 1 h y a continuación lavarse; se puede determinar el efecto citotóxico tras 96 h de incubación.

EJEMPLO 17 - Datos de citotoxicidad *in vitro* para los compuestos seleccionados

55 La Tabla 10 muestra el efecto citotóxico de los conjugados cAC10 de los compuestos ds **7-10**, evaluados como se describe en el Procedimiento General I en una línea de células CD30+ Karpas 299. Se presentan los datos de dos experimentos separados. Se encontró que los conjugados cAC10 de los compuestos 7 y 9 eran ligeramente más activos que cAC10-val-cit-MMAE.

60

TABLA 10

Conjugado	Cl <sub>50</sub> (ng/ml)
cAC10-val-cit-MMAE	6
cAC10-7	1,0

cAC10-8	15
cAC10-9	0,5
cAC10-10	20

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

5 **Procedimiento General I - Determinación de la citotoxicidad.** Para evaluar la citotoxicidad de los conjugados  
 10 ilustrativos **7-10**, se sembraron las células a aproximadamente 5 - 10.000 por pocillo en 150 µl de medio de cultivo  
 tratado a continuación con dosis graduadas de los conjugados ilustrativos **7-10** por cuadruplicado al inicio del  
 ensayo. Los ensayos de citotoxicidad se llevan a cabo habitualmente en las 96 horas posteriores a la adición de los  
 compuestos de ensayo. Cincuenta µl de colorante resazurina se pueden añadir a cada pocillo en las últimas 4 a 6  
 horas de la incubación para evaluar las células viables al final del cultivo. Se determinó la reducción del colorante  
 mediante espectrometría de fluorescencia utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 535nm y 590nm,  
 respectivamente. Para análisis, se comparó la extensión de la reducción de resazurina por las células tratadas con la  
 de las células del control sin tratar.

#### 15 Ejemplo 18- Ensayos de proliferación celular *in vitro*

Se puede medir la eficacia de ADC mediante un ensayo de proliferación celular que utiliza el siguiente protocolo  
 (Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Mendoza et al. (2002) Cancer Res. 62:5485-5488):

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

#### 30 Ejemplo 19 - Aclaramiento del plasma en ratas

Se estudió la farmacocinética del aclaramiento del plasma de los conjugados de anticuerpo fármaco y los  
 anticuerpos totales en ratas Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, 250-275 g cada una). Se dosificaron los  
 animales mediante inyección en bolo en la vena de la cola (IV Empujar). Se recogieron aproximadamente 300 µl de  
 35 sangre completa mediante una cánula en la yugular, o mediante una varilla en la cola, en recipientes con  
 anticoagulante de litio/heparina en cada punto temporal: 0 (predosis), 10, y 30 minutos; 1, 2, 4, 8, 24 y 36 horas; y 2,  
 3, 4, 7, 14, 21, 28 días después de la dosis. Se midieron los anticuerpos totales mediante ELISA - ECD/GxhuFc-  
 HRP. Se midió el conjugado de anticuerpo fármaco mediante ELISA - MMAE/MMAF/ECD-Bio/SA-HRP.

#### 40 Ejemplo 20 - Aclaramiento del plasma en monos

La farmacocinética del aclaramiento en plasma de los conjugados anticuerpo fármaco y los anticuerpos totales se  
 pueden estudiar en macacos. La Figura 12 muestra un estudio en dos etapas del aclaramiento de la concentración  
 en plasma después de la administración de H-MC-vc-MMAE a macacos a diferentes dosis: 0,5, 1,5, 2,5, y 3,0 mg/kg,  
 45 administrados en el día 1 y el día 21. Las concentraciones de anticuerpo total y ADC se midieron con el tiempo. (H =  
 Trastuzumab).

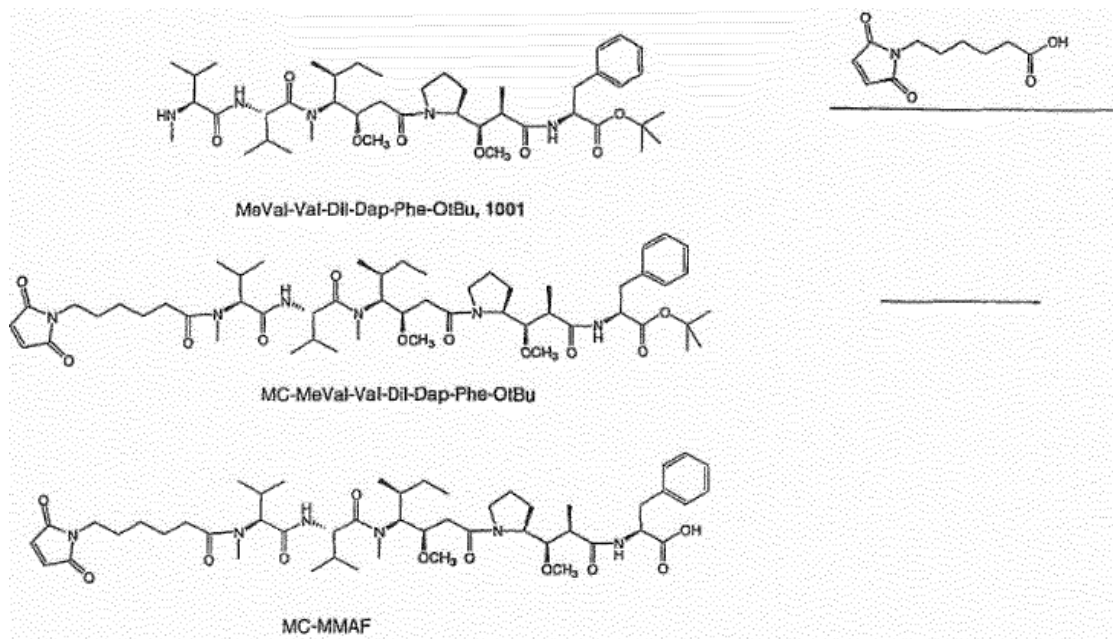
#### Ejemplo 21 - Eficacia *in vivo* sobre el volumen tumoral en explantes de ratones transgénicos

50 Los animales adecuados para los experimentos transgénicos se pueden obtener de fuentes comerciales  
 convencionales tales como Taconic (Gent, N.Y.). Muchas cepas son adecuadas, pero se prefieren ratones  
 FVB hembras debido a su elevada susceptibilidad a la formación de tumores. Los machos FVB se pueden utilizar  
 para el emparejamiento, y los machos CD.1 vasectomizados se pueden utilizar para estimular el pseudoembarazo.  
 Los ratones vasectomizados se pueden obtener de cualquier proveedor comercial. Las hembras fértiles se pueden  
 55 reproducir tanto con ratones FVB o con ratones heterocigóticos 129/BL6 x FVB p53. Los ratones con el alelo p53  
 heterocigótico se pueden utilizar para aumentar potencialmente la formación de tumores. Algunos tumores F1 son  
 cepas mixtas. Los tumores fundadores solamente pueden ser FVB.

Los animales que tienen tumores (propagados por aloinjerto a partir de ratones transgénicos Fo5 mmtv) se pueden  
 60 tratar con una dosis simple o múltiple mediante inyección IV de ADC. El volumen del tumor se puede evaluar en  
 varios puntos temporales después de la inyección.

## Ejemplo 22 - Síntesis de MC-MMAF mediante terc-butil éster

## Síntesis 1:



5

MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (compuesto 1, 128,6 mg, 0,163 mmol) se suspendió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0,500 ml). Se añadieron ácido 6-maleimidocaproico (68,9 mg, 0,326 mmol) y 1,3-diisopropilcarbodiimida (0,0505 ml, 0,326 mmol) seguido por piridina (0,500 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 1,0 h. El análisis de HPLC indicó el consumo completo de la compuesto de partida 1. Los compuestos orgánicos volátiles se evaporaron a presión reducida. Se aisló el producto mediante cromatografía en columna ultrarrápida, usando un gradiente en etapas metanol al 0 a 5 % en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se recuperaron un total de 96 mg de MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (12) puro (rendimiento del 60 %). ES-MS  $m/z$  981,26  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; 1003,47  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; 979,65  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

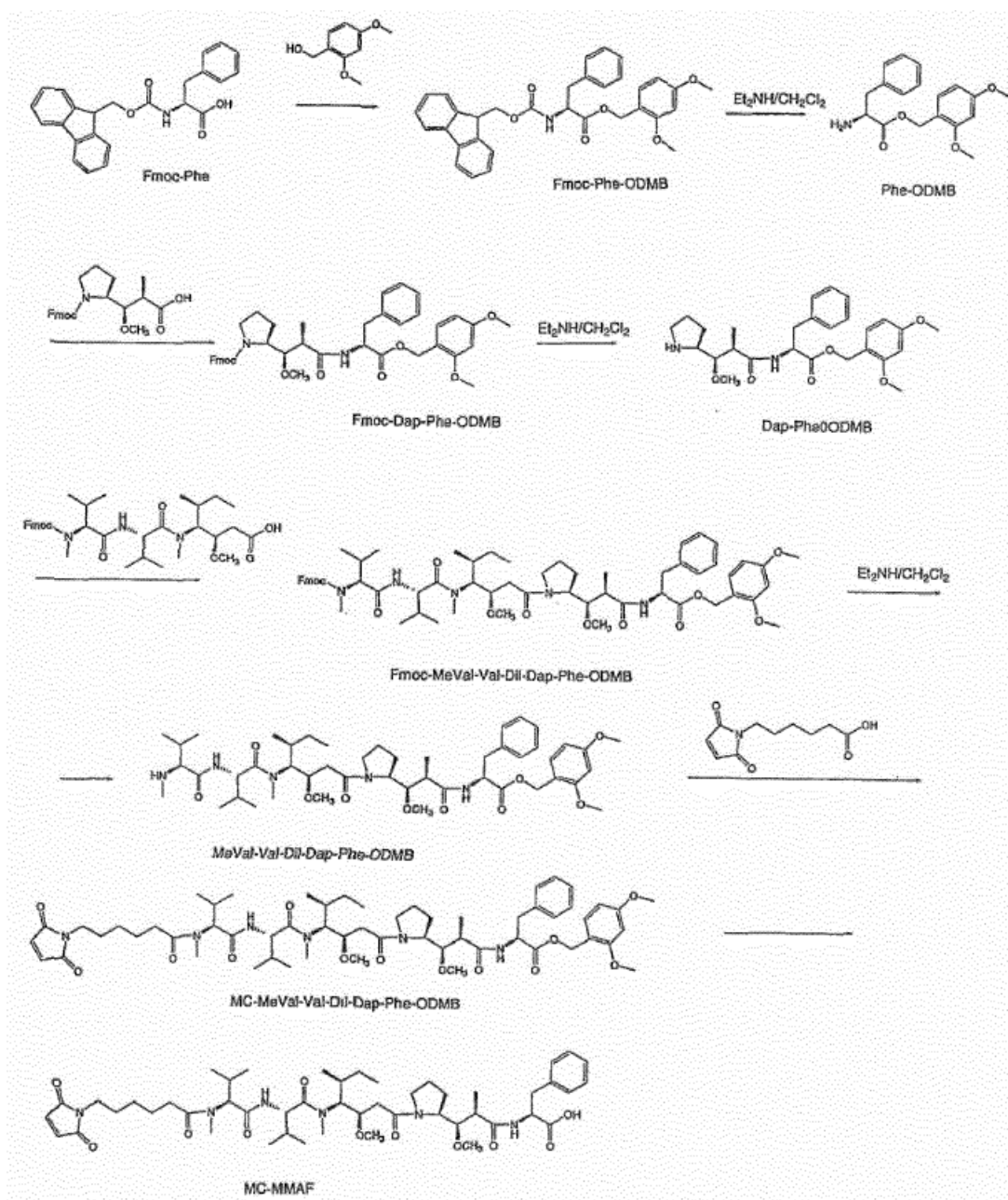
10

15 Se suspendió MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (Compuesto12, 74 mg, 0,0754 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2,0 ml) y TFA (1 ml) a temperatura ambiente. Después de 2,5 h, el análisis mediante HPLC indicó el consumo completo de materiales de partida. Los compuestos orgánicos volátiles se evaporaron a presión reducida y el producto se aisló mediante RP-HPLC preparatoria, utilizando una columna Phenomenex C<sub>12</sub> Synergi Max-RP 80Å (250 x 21,20 mm). Eluyente: gradiente lineal 10 % a 90 % de MeCN/0,05 % de TFA (ac) durante 30 minutos, a continuación isocrático 90 % de MeCN/0,05 % de TFA (ac) durante 20 minutos más. ES-EM  $m/z$  925,33  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; 947,30  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; 923,45  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

20

## Ejemplo 23a - Síntesis de MC-MMAF (11) mediante el dimetoxibencil éster

## 25 Síntesis 2:



#### Preparación de Fmoc-L-fenilalanina-2,4-dimetoxibencil éster (Fmoc-Phe-ODMB)

- 5 Un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 5 l se cargó con Fmoc-L-fenilalanina (200 g, 516 mmol Bachem), alcohol 2,4-dimetoxibencílico (95,4 g, 567 mmol, Aldrich), y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2,0 l). Se añadió t-butil acetal de N,N-dimetilformamida (155 ml, 586 mmol, Fluka) a la suspensión resultante durante 20 min bajo N<sub>2</sub>, que dio como resultado una solución transparente. La reacción se agitó a continuación a temperatura ambiente durante la noche, momento en el cual, el análisis por TLC (0,42, Heptano/EtOAc = 2:1) indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se
- 10 concentró a presión reducida para dar un aceite de color amarillo claro, que se volvió a disolver en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 ml) y se purificó mediante un lecho corto de gel de sílice (25 cm x 25 cm, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar una espuma incolora (250 g). Se añadió MeCN (1 l) a la espuma resultante, que disolvió totalmente el lote. A continuación se concentró hasta sequedad y se volvió a disolver en MeCN (1 l) y la suspensión resultante se agitó durante 1 h, se filtró, y la torta del filtro se enjuagó con MeCN (2 x 200 ml) para dar Fmoc-L-fenilalanina-2,4-dimetoxibencil éster en forma de
- 15 un sólido de color blanco (113,58 g, 41 %, 95,5 % ABC mediante el análisis de HPLC). Datos: HPLC.

#### Preparación de L-fenilalanina-2,4-dimetoxibencil éster (Phe-ODMB)

- 20 Un matraz de fondo redondeado de 500 ml se llenó con Fmoc-L-fenilalanina-2,4-dimetoxibencil éster (26,00 g),

48,3 mmol),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (150 ml) y dietilamina (75 ml, Acros). La mezcla se agitó a temperatura ambiente y la finalización se controló mediante HPLC. Después de 4 h, la mezcla se concentró (temperatura del baño  $< 30^\circ\text{C}$ ). El residuo se volvió a suspender en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 ml) y se concentró. Esto se repitió una vez. Al residuo se añadió MeOH (20 ml), lo que produjo la formación de un gel. Este residuo se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 ml), y el aceite turbio se dejó al vacío durante la noche. El residuo se suspendió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 ml), a continuación se añadió tolueno, (120 ml). La mezcla se concentró y el residuo se dejó al vacío durante la noche.

Datos: HPLC, RMN 1H.

#### 10 Preparación de Fmoc-Dolaproína (Fmoc-Dap)

Boc-Dolaproína (58,8 g, 0,205 mol) se suspendió en HCl 4 N en 1,4-dioxano (256 ml, 1,02 mol, Aldrich). Después de agitar durante 1,5 horas, el análisis de TLC indicó que la reacción se había completado (10 % de MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y la mezcla se concentró hasta casi sequedad. Se cargó más 1,4-dioxano (50 ml) y la mezcla se concentró hasta sequedad y se secó al vacío durante la noche. El sólido de color blanco resultante se disolvió en  $\text{H}_2\text{O}$  (400 ml) y se transfirió a un matraz de fondo redondeado de 3 bocas de 3 l con un agitador mecánico y una sonda de temperatura. Se añadió N,N-diisopropiletilamina (214,3 ml, 1,23 mol, Acros) durante un minuto, dando lugar a una exoterma desde 20,5 a 28,2  $^\circ\text{C}$  (interna). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió 1,4-dioxano (400 ml). Se añadió una solución de Fmoc-OSu (89,90 g, 0,267 mol, Advanced ChemTech) en 1,4-dioxano (400 ml) desde un embudo de adición durante 15 minutos, manteniendo la temperatura de reacción por debajo de 9  $^\circ\text{C}$ . La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 19 horas, tras lo cual, se concentró la mezcla mediante evaporación rotatoria en una suspensión acuosa (390 g). Se diluyó la suspensión con  $\text{H}_2\text{O}$  (750 ml) y  $\text{Et}_2\text{O}$  (750 ml), dando lugar a la formación de un precipitado copioso de color blanco. Las capas se separaron, manteniéndose los sólidos en la capa orgánica. La capa acuosa se acidificó utilizando HCl concentrado (30 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 500 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron con  $\text{MgSO}_4$ , se filtraron y se concentraron para dar 59,25 g de un aceite A de color amarillo. El extracto de  $\text{Et}_2\text{O}$  se extrajo una vez con una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (200 ml), manteniendo los sólidos en la capa acuosa. La suspensión acuosa se acidificó utilizando HCl concentrado (50 ml) y se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$  (50 ml) manteniendo los sólidos con la capa orgánica. La capa orgánica se filtró y se concentró para dar 32,33 g de un aceite B de color amarillo. Los dos aceites (A y B) se combinaron y se purificaron mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice eluyendo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3,5 l), a continuación 3 % de MeOH/  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (9 l) para dar 68,23 g de Fmoc-dolaproína como una espuma de color blanco (81 %, 97,5 % de pureza mediante HPLC (ABC)).

#### 35 Preparación de Fmoc-Dap-Phe-ODMB

Phe-ODMB en bruto (48,3 mmol) se suspendió en DMF anhidro (105 ml, Acros) durante 5 minutos y se añadió Fmoc-Dap (19,80 g, 48,3 mmol). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió TBTU (17,08 g, 53,20 mmol, Matrix Innovations). Se añadió N,N-diisopropiletilamina (25,3 ml, 145,0 mmol, Acros) mediante jeringuilla durante 3 min. Después 1 h, se retiró el baño de hielo y se dejó la mezcla calentar durante 30 min. Se vertió la mezcla en agua (1 l) y se extrajo con acetato de etilo (300 ml). Tras la separación, la capa acuosa se volvió a extraer con acetato de etilo (2 x 150 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (150 ml), se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ) y se filtraron (papel de filtro) para retirar los compuestos insolubles (los compuestos inorgánicos y algo de dibenzofulveno). Después de la concentración, el residuo (41 g) se absorbió sobre sílice (41 g) y se purificó mediante cromatografía (columna de 22 cm x 8 cm; Heptano al 65 % en EtOAc (2,5 l); Heptano al 33 % en EtOAc (3,8 l), para dar 29,4 g de producto en forma de una espuma de color blanco (86 %, 92 % de pureza mediante HPLC).

Datos: HPLC, RMN 1H, TLC (1:1 EtOAc/Heptano  $R_f = 0,33$ , tinción de rojo en vainillina).

#### 50 Preparación de Dap-Phe-ODMB

Un matraz de fondo redondeado de 1 l se cargó con Fmoc-Dap-Phe-ODMB (27,66 g),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (122 ml) y dietilamina (61 ml, Acros). La solución se agitó a temperatura ambiente y se controló la finalización mediante HPLC. Después de 7 h, la mezcla se concentró (temperatura del baño.  $<30^\circ\text{C}$ ). El residuo se suspendió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (300 ml) y se concentró. Esto se repitió dos veces. Al residuo se añadió MeOH (20 ml) y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (300 ml), y se concentró la solución. Se suspendió el residuo en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 ml) y tolueno (400 ml), se concentró, y el residuo se dejó al vacío durante la noche para dar un residuo de tipo crema.

Datos: HPLC, RMN 1H, MS.

#### 60 Preparación de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB

Se suspendió Dap-Phe-ODMB en bruto (39,1 mmol) en DMF anhidro (135 ml, Acros) durante 5 minutos y se añadió Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH (24,94 g, 39,1 mmol, véase el Ejemplo 2 para la preparación). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió TBTU (13,81 g, 43,0 mmol, Matrix Innovations). Se añadió N,N-diisopropiletilamina (20,5 ml, 117,3 mmol, Acros) mediante jeringuilla durante 2 minutos. Después de 1 hora, se retiró el baño de hielo y se dejó la mezcla calentar durante 30 min. Se vertió la mezcla en agua (1,5 l) y se extrajo con acetato de etilo

(480 ml). Después de reposar durante 15 minutos, las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (300 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (200 ml), se secaron ( $MgSO_4$ ) y se filtraron (papel de filtro) para retirar los compuestos insolubles (los compuestos inorgánicos y algo de dibenzofulveno). Después de la concentración, el residuo (49 g) se rascó del matraz y se absorbió sobre sílice (49 g) y se purificó mediante cromatografía (columna de 15 cm x 10 cm; EtOAc/Heptano 2:1 (3 l), EtOAc (5 l); fracciones de 250 ml) para dar 31,84 g de Fmoc-McVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB en forma de un espuma de color blanco (73 %, 93 % de pureza mediante HPLC (ABC)).

Datos: HPLC, TLC (EtOAc/heptano 2:1,  $R_f = 0,21$ , tinción de rojo en vainillina).

10 Preparación de MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB

Un matraz de fondo redondo de 1 l se cargó con Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (28,50 g),  $CH_2Cl_2$  (80 ml) y dietilamina (40 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche y después se concentró a presión reducida. El residuo se absorbió sobre gel de sílice (30 g) y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (columna de 15 cm x 8 cm diá.; MeOH al 2 % en DCM (2 l), MeOH al 3 % en DCM (1 l), MeOH al 6 % en DCM (4 l); fracciones de 250 ml) para dar 15,88 g de MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB como una espuma de color blanco (69 %, 96 % de pureza mediante HPLC (ABC)).

20 Datos: HPLC, TLC (MeOH al 6 % en DCM,  $R_f = 0,24$ , tinción de rojo en vainillina).

Preparación de MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB

Un matraz de fondo redondo de 50 ml se cargó con MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (750 mg, 0,85 mmol), DMF anhidro (4 ml), ácido maleimidocaproico (180 mg, 0,85 mmol), y TBTU (300 mg, 0,93 mmol, Matrix Innovations) a temperatura ambiente. Se añadió N,N-Diisopropiletilamida (450  $\mu$ l, 2,57 mmol) con una jeringuilla. Después de 1,5 horas, la mezcla se vertió en agua (50 ml) y se diluyó con acetato de etilo (30 ml). Se añadió NaCl para ayudar en la separación. Tras la separación de las capas, la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (25 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron ( $MgSO_4$ ), se filtraron y se concentraron. El aceite resultante (1 g) resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida [100 ml de gel de sílice; Heptano al 25 % en EtOAc (100 ml), Heptano al 10 % en EtOAc (200 ml), EtOAc(1,5 l) para dar MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (13) en forma de una espuma de color blanco (521 mg, 57 %, 94 % de pureza mediante HPLC (ABC)).

Datos: RMN  $^1H$ , HPLC.

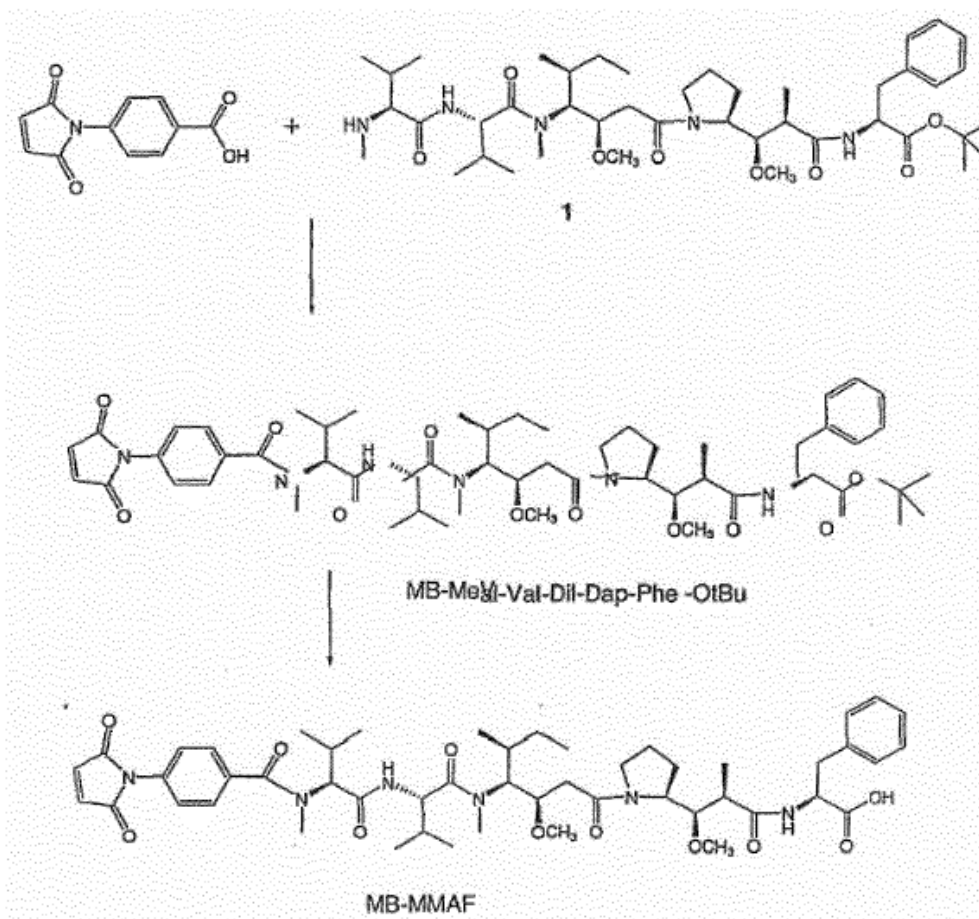
35 Preparación de MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OH (MC-MMAF) (11)

Un matraz de fondo redondo de 50 ml se cargó con MC-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-ODMB (Compuesto 13, 428 mg, 0,39 mmol) y se disolvió en TFA al 2,5 % en  $CH_2Cl_2$  (20 ml). La solución se volvió de color rosa-púrpura durante 2 min. La finalización se controló por HPLC y TLC (MeOH al 6 % en DCM, tinción con  $KMnO_4$ ). Después de 40 min, se añadieron tres gotas de agua y la mezcla turbia de color rosa púrpura se concentró para dar 521 mg de un residuo de color rosa. La purificación mediante cromatografía (IPA al 15 % en DCM) produjo 270 mg de MC-MMAF (73 %, pureza del 92 % según HPLC) en forma de un sólido de color blanco.

45

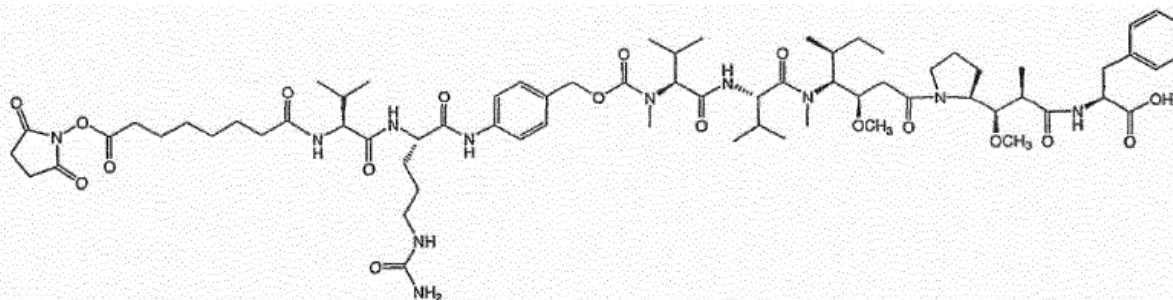


## Ejemplo 23b - Síntesis de un análogo de mc-MMAF



- 5 MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (compuesto 1,35 mg, 0,044 mmol) se suspendió en DMF (0,250 ml). Se añadieron ácido 4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-benzoico (11 mg, 0,049 mmol) y HATU (17 mg, 0,044 mmol) seguido por DIEA (0,031 ml, 0,17 mmol). Esta mezcla de reacción se dejó en agitación durante 2,0 h. El análisis de HPLC indicó el consumo completo de la compuesto de partida 1.
- 10 El producto se aisló mediante RP-HPLC preparativa, utilizando una columna Phenomenex C<sub>12</sub> Synergi Max-RP 80Å (250 x 21,20 mm). Eluyente: gradiente lineal 10 % a 80 % de MeCN/0,05 % de TFA (ac) durante 8 minutos, a continuación isocrático 80 % de MeCN/0,05 % de TFA (ac) durante 12 minutos más. Se aislaron un total de 20 mg de producto puro (14) (0,02 mmol, rendimiento del 46 %). ES-MS *m/z* 987,85 [M+H]<sup>+</sup>; 1019,41 [M+Na]<sup>+</sup>; 985,54 [M-H]<sup>-</sup>.
- 15 Se suspendió MB-MeVal-Val-Dil-Dap-Phe-OtBu (compuesto14, 38 mg, 0,0385 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 ml) y TFA (1 ml). La mezcla se agitó durante 2,0 h, y después los compuestos orgánicos volátiles se evaporaron a presión reducida. El producto se purificó mediante RP-HPLC preparativa, utilizando una columna Phenomenex C<sub>12</sub> Synergi Max-RP 80Å (250 x 21,20 mm). Eluyente: gradiente lineal 10 % a 80 % de MeCN/0,05 % de TFA (ac) durante 8 minutos, a continuación isocrático 80 % de MeCN/0,05 % de TFA (ac) durante 12 minutos más. Se aislaron un total de 14,4 mg de producto MB-MMAF (0,015 mmol, rendimiento del 40 %). ES-MS *m/z* 930,96 [M+H]<sup>+</sup> 952,98 [M+Na]<sup>+</sup>; 929,37 [M-H]<sup>-</sup>.
- 20



**Ejemplo 23d - Preparación del éster de succinimida de suberil-Val-Cit-PAB-MMAf (17)**5 **Compuesto 17**

Compuesto 1 (300 mg, 0,38 mmol), Fmoc-Val-Cit-PAB-pNP (436 mg, 0,57 mmol, 1,5 eq.) se suspendieron en piridinina anhidra, 5 ml. HOBt (10 mg, 0,076 mmol, 0,2 eq.) se añadió seguido por DIEA (199  $\mu$ l, 1,14 mmol, 3 eq.). La mezcla de reacción se sonicó durante 10 min, y a continuación se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Se retiró la piridina a presión reducida, el residuo se volvió a suspender en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La mezcla se separó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice con un gradiente en etapas de MeOH, del 0 al 10 %, en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Las fracciones que contenían producto se combinaron, se concentraron, se secaron al vacío durante la noche para dar 317 mg (rendimiento del 59 %) de Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF-OtBu. ES-MS  $m/z$  1415,8  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

15 Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF-OtBu (100 mg) se agitó con TFA al 20 % TFA en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml), durante 2 h. La mezcla se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 ml). La capa acuosa se lavó sucesivamente con agua (2 x 30 ml) y salmuera (1 x 30 ml). La fase orgánica se concentró, se cargó sobre un lecho de gel de sílice en MeOH al 10 % en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . El producto se eluyó con MeOH al 30 % en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Tras secar al vacío durante la noche, Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF se obtuvo en forma de un sólido de color blanco, 38 mg, 40 % de rendimiento. ES-MS  $m/z$  1357,7  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

20 Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF, 67 mg, se suspendió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 ml) dietilamina (2 ml) y DMF (2 ml). La mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se coevaporó con piridinina (2 ml), después con tolueno (2 x 5 ml), se secó al vacío. Val-Cit-PAB-MMAF se obtuvo en forma de un aceite de color pardo que se usó sin purificación adicional.

25 Todo el Val-Cit-PAB-MMAF preparado a partir de 67 mg de Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAF, se suspendió en piridina (2 ml), y se añadió a una solución de suberato de disuccinimidilo (74 mg, 0,2 mmol, 4 eq.), en piridina (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 3 horas, se añadió éter (20 ml). El precipitado se recogió, se lavó con más cantidad de éter. El sólido rojizo se suspendió en MeOH al 30 % en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se filtró a través de un lecho de gel de sílice con MeOH al 30 % en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como eluyente. El compuesto 17 se obtuvo en forma de un sólido de color blanco, 20 mg (29 % de rendimiento). ES-MS  $m/z$  1388,5  $[\text{M}-\text{H}]^-$

**Ejemplo 24 - Eficacia *in vivo* de los conjugados de anticuerpo y fármaco mcMMAF**

35 **Eficacia de cAC10-mcMMAF en xenoinjertos de Karpas-299ALCL:** Para evaluar la eficacia *in vivo* de cAC10-mcMMAF con un promedio de 4 restos de fármaco por anticuerpo (cAC10-mcF4), Las células Karpas-299 ALCL humanas se implantaron de forma subcutánea en ratones inmunodeficientes C.B-17 SCID (5 x 10<sup>6</sup> células por ratón). Los volúmenes tumorales se calcularon mediante la fórmula (0,5xLxW<sup>2</sup>), donde L y W son la longitud y las más corta de las dos mediciones bidimensionales. Cuando el volumen tumoral promedio de los animales del estudio alcanzó aproximadamente 100 mm<sup>3</sup> (intervalo 48-162) los ratones se dividieron en 3 grupos (5 ratones por grupo) y bien se dejaron sin tratamiento o recibieron una sola inyección intravenosa a través de la vena de la cola con 1 o 2 mg/kg de cAC10-mcF4 (Figura 1). Los tumores de los ratones no tratados crecieron rápidamente hasta un volumen promedio de >1.000 mm<sup>3</sup> en los 7 días desde el inicio de la terapia. Por el contrario, todos los tratados con cAC10-mcF4 mostraron una regresión rápida con 3/5 en el grupo 1 mg/kg y de 5/5 en el grupo de 2 mg/kg, consiguiendo una respuesta del tumor completa. Aunque el tumor en uno de los respondedores completo del grupo de 2 mg/kg presentó recidiva al cabo de aproximadamente 4 semanas, no hubo tumores detectables en los 4/5 respondedores restantes de este grupo y en los 3 respondedores completos del grupo de 1 mg/kg en las 10 semanas posteriores a la terapia.

50 **Eficacia de cBR96-mcMMAF en xenoinjertos de L2987 NSCLC:** cBR96 es un anticuerpo quimérico que reconoce el antígeno Le<sup>y</sup>. Para evaluar la eficacia *in vivo* de cBR96-mcMMAF con 4 fármacos por anticuerpo (cBR96-mcF4), fragmentos tumorales de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) L2987 se implantaron en ratones atímicos sin pelo. Cuando los tumores promediaron aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>, los ratones se dividieron en 3 grupos: sin tratar y 2 grupos de terapia. Para la terapia, como se muestra en la Figura 3a, los ratones recibieron cBR96-mcF4 bien a 3 o 10 mg/kg/inyección cada 4 días para un total de 4 inyecciones (q4dx4). Tal como se muestra en la Figura 3b, los ratones recibieron cBR96-mcF4 o un conjugado de control no unido, cAC10-mcF4, a 10 mg/kg/inyección cada 4 días

para un total de 4 inyecciones (q4dx4). Como se muestra en las Figuras 3a y 3b, BR96-mcF4 produjo un notable retraso en el crecimiento tumoral, en comparación con los controles.

La Figura 2 muestra un ensayo de eficacia *in vivo* de una sola dosis de cAC10-mcMMAF en L540CY subcutáneo. Para este estudio, se usaron 4 ratones en el grupo no tratado y 10 en cada grupo de tratamiento.

#### Ejemplo 25 - Eficacia *in vitro* de Conjugados de anticuerpo y fármaco MC-MMAF

*Actividad de conjugados de anticuerpo-fármaco cAC10 contra líneas de células CD30<sup>+</sup>*. Las Figuras 4a y 16b muestran curvas dosis-respuesta de un experimento representativo donde cultivos de Karpas 299 (linfoma anaplásico macrocítico) y L428 (linfoma de Hodgkin) se incubaron con cAC10-mcMMAF (Figura 4a) o cAC10-vcMMAF (Figura 4b) diluido en serie durante 96 horas. Los cultivos se marcaron durante 4 horas con resazurina 50  $\mu$ M [7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido] y se midió la fluorescencia. Los datos se redujeron en GraphPad Prism versión 4.00 usando un procedimiento de ajuste a la curva de 4 parámetros. Los valores de CI<sub>50</sub> se definieron como la concentración donde el crecimiento se reduce al 50 % en comparación con los cultivos de control sin tratar. Cada concentración se ensayó por cuadruplicado.

*Actividad de conjugados de anticuerpo-fármaco cBR96 contra líneas de células Le<sup>y+</sup>*. Las Figuras 5a y 5b muestran curvas dosis-respuesta de un experimento representativo donde cultivos de H3396 (carcinoma de mama) y L2987 (carcinoma de pulmón no microcítico) se incubaron con cBR96-mcMMAF (Figura 5a) o-vcMMAF (Figura 5b) diluido en serie durante 96 horas. Los cultivos se marcaron durante 4 horas con resazurina 50  $\mu$ M y se midió la fluorescencia. Los datos se redujeron en GraphPad Prism versión 4.00 usando un procedimiento de ajuste a la curva de 4 parámetros. Los valores de CI<sub>50</sub> se definieron como la concentración donde el crecimiento se reduce al 50 % en comparación con los cultivos de control sin tratar. Cada concentración se ensayó por cuadruplicado.

*Actividad de conjugados de anticuerpo-fármaco c1F6 contra líneas de células de carcinoma de células renales CD70<sup>+</sup>*. Las Figuras 6a y 6b muestran curvas dosis-respuesta de un experimento representativo donde cultivos de células Caki-1 y 786-0 se incubaron con c1F6-mcMMAF (Figura 6a) o-vcMMAF (Figura 6b) diluido en serie durante 96 horas. Los cultivos se marcaron durante 4 horas con resazurina 50  $\mu$ M y se midió la fluorescencia. Los datos se redujeron en GraphPad Prism versión 4.00 usando un procedimiento de ajuste a la curva de 4 parámetros. Los valores de CI<sub>50</sub> se definieron como la concentración donde el crecimiento se reduce al 50 % en comparación con los cultivos de control sin tratar. Cada concentración se ensayó por cuadruplicado.

#### Ejemplo 26 - Purificación de trastuzumab

Un vial que contenía 440 mg de HERCEPTIN® (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, patente de Estados Unidos N° 5821337) anticuerpo) se disolvió en 50 ml de tampón MES (MES 25 mM, NaCl 50 mM, pH 5,6) y se cargaron en una columna de intercambio catiónico (Sephacrose S, 15 cm x 1,7 cm) que se había equilibrado con el mismo tampón. A continuación se lavó con el mismo tampón (5 volúmenes de columna). Trastuzumab se eluyó aumentando la concentración de NaCl del tampón hasta 200 mM. Las fracciones que contenían el anticuerpo se combinaron, se diluyeron hasta 10 mg/ml, y se dializaron en un tampón que contenía fosfato de potasio 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5.

#### Ejemplo 27 - Preparación de Trastuzumab-MC-MMAE por conjugación de trastuzumab y MC-MMAE

Trastuzumab, disuelto en una solución de borato de sodio 500 mM y cloruro de sodio 500 mM a pH 8,0, se trata con un exceso de ditiotreitil 100 mM (DTT). Tras una incubación a 37°C durante aproximadamente 30 minutos, el tampón se intercambió por elución en resina Sephadex G25 y se eluyó con PBS con DTPA 1 mM. El valor t<sub>iol</sub>/Ab se comprobó determinando la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia de la solución medida a 280 nm y de la concentración de t<sub>iol</sub> determinada por reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido disuelto en PBS se enfrió sobre hielo.

El reactivo enlazador de fármaco, maleimidocaproil-monometil auristatina E (MMAE), es decir, MC-MMAE, disueltos en DMSO, se diluyó en acetonitrilo y agua a concentración conocida, y se añadió al anticuerpo trastuzumab muy frío en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añadió un exceso de maleimida para desactivar la reacción y proteger todos los grupos t<sub>iol</sub> del anticuerpo sin reaccionar. La mezcla de reacción se concentró mediante ultrafiltración centrífuga y trastuzumab-MC-MMAE se purificó y desaló por elución a través de resina G25 en PBS, se filtró a través de filtros de 0,2  $\mu$ m en condiciones estériles, y se congeló para su almacenamiento.

#### Ejemplo 28 - Preparación de trastuzumab-MC-MMAF por conjugación de trastuzumab y MC-MMAF

Trastuzumab-MC-MMAF se preparó por conjugación de trastuzumab y MC-MMAF según el procedimiento del Ejemplo 27.

#### Ejemplo 29 - Preparación de trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAE por conjugación de trastuzumab y MC-val-cit-PAB-MMAE

Trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAE se preparó por conjugación de trastuzumab y MC-val-cit-PAB-MMAE según el procedimiento del Ejemplo 27.

5 Ejemplo 30 - Preparación de trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF por conjugación de trastuzumab y MC-val-cit-PAB-MMAF 9

Trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF se preparó por conjugación de trastuzumab y MC-val-cit-PAB-MMAF 9 según el procedimiento del Ejemplo 27.

10 Ejemplo 31- Toxicidad en ratas

15 El perfil de toxicidad aguda de los fármacos libres y el ADC se evaluó en ratas Sprague Dawley adolescentes (75-125 g cada una, Charles River Laboratories (Hollister, CA). Los animales se inyectaron el día 1, la química completa y los perfiles hematológicos se obtuvieron en la línea base, día 3 y día 5 y se realizó necropsia complete el día 5. Las mediciones de enzimas hepáticas se realizaron sobre todos los animales y se realizó histología de rutina sobre tres animales al azar de cada grupo para los siguientes tejidos: esternón, hígado, riñón, timo, bazo, intestino grueso y delgado. Los grupos experimentales fueron los siguientes:

Grupo	Administrado	mg/kg	µg MMAF/ m <sup>2</sup>	MMAF/ MAb	N/Sexo
1	Vehículo	0	0	0	2/F
2	trastuzumab-MC-val-cit-MMAF	9,94	840	4,2	6/F
3	trastuzumab-MC-val-cit-MMAF	24,90	2105	4,2	6/F
4	trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF	10,69	840	3,9	6/F
5	trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF	26,78	2105	3,9	6/F
6	trastuzumab-MC-MMAF	10,17	840	4,1	6/F
7	trastuzumab-MC-MMAF	25,50	2105	4,1	6/F
8	trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF	21,85	2105	4,8	6/F

20 Para trastuzumab-MC-val-cit-MMAF, trastuzumab-MC(Me)-val-cit-PAB-MMAF, trastuzumab-MC-MMAF y trastuzumab-MC-val-cit-PAB-MMAF, el µg MMAF/m<sup>2</sup> se calculó usando 731,5 como el MW de MMAF y 145167 como el MW de herceptina.

25 El área de la superficie corporal se calculó de la siguiente forma: [((peso corporal en gramos a un potencia de 0,667) x 11,8)/10000]. (Guidance for Industry and Reviewers, 2002).

30 Las soluciones de dosis se administraron mediante una inyección intravenosa en bolo subcutánea en la vena de la cola en el Día 1 del estudio, a una dosis en volumen de 10 ml/kg. Los pesos corporales de los animales se midieron antes de la dosis del Día 1 del estudio, y el día posterior. Se recogió sangre completa en tubos que contenían EDTA para análisis hematológico. Las muestras de sangre se recogieron en tubos de separación de suero para análisis de química clínica. Se recogieron muestras de sangre antes de la dosis en el Día 4 del estudio, Día 3 del estudio y Día 5 del estudio. La sangre completa también se recogió en tubos que contenían heparina sódica el día de la necropsia, y el plasma se congeló a -70 °C para posible análisis posterior. Los siguientes tejidos se recogieron y se introdujeron en formalina neutra tamponada durante la necropsia: hígado, riñones, corazón, timo, bazo, cerebro, esternón y secciones del tracto GI, incluido estómago, intestino grueso y delgado. El esternón, intestino delgado, intestino grueso, hígado, timo, bazo y riñón se examinaron.

40 Los niveles de enzimas séricas asociadas al hígado para cada punto temporal se compararon con un intervalo (percentil 5<sup>o</sup> y 95<sup>o</sup>) para ratas Sprague Dawley hembra normales. Los recuento de glóbulos blancos y plaquetas para cada punto temporal se compararon con un intervalo (percentil 5<sup>o</sup> y 95<sup>o</sup>) para ratas Sprague Dawley hembra normales.

Los estudios de alta dosis en ratas Sprague Dawley hembra normales:

Grupo 1:	Vehículo
Grupo 2:	trastuzumab-MC-MMAF, 52,24 mg/kg, 4210 µg/m <sup>2</sup>
Grupo 3:	trastuzumab-MC-MMAF, 68,25 mg/kg, 5500 µg/m <sup>2</sup>
Grupo 4:	trastuzumab-MC-MMAF, 86,00 mg/kg, 6930 µg/m <sup>2</sup>

45 Los tejidos de 11 animales se enviaron para análisis histológico rutinario. Estos animales han sido parte de un estudio de toxicidad en rango agudo usando el inmunoconjugado trastuzumab-MC-MMAF. Los animales se siguieron durante 12 días tras la dosificación.

Ejemplo 32- Toxicidad/seguridad en macacos

Tres grupos de cuatro a modo de ejemplo (2 machos, 2 hembras) de *Macaca fascicularis* (macaco) no expuestos a tratamiento se estudiaron para trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE y trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF. La administración intravenosa se realizó en los días 1 y 22 de los estudios.

Muestra	Grupo	Dosis
Vehículo	1	día 1
	1M/1F	día 22
H-MC-vc-PAB-MMAE	2	180 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (0,5 mg/kg) en el día 1
	2M/2F	1100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (3,0 mg/kg) en el día 22
H-MC-vc-PAB-MMAE	3	550 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (1,5 mg/kg) en el día 8
	2M/2F	550 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (1,5 mg/kg) en el día 29
H-MC-vc-PAB-MMAE	4	880 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (2,5 mg/kg) en el día 15
	2M/2F	880 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (2,5 mg/kg) en el día 36

Muestra	Grupo	Dosis
Vehículo	1	día 1
	1M/1F	día 22
H-MC-vc-PAB-MMAF	2	180 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (0,5 mg/kg) en el día 1
	2M/2F	1100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (3,0 mg/kg) en el día 22
H-MC-vc-PAB-MMAF	3	550 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (1,5 mg/kg) en el día 1
	2M/2F	550 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (1,5 mg/kg) en el día 22
H-MC-vc-PAB-MMAF	4	880 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (2,5 mg/kg) en el día 1
	2M/2F	880 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (2,5 mg/kg) en el día 22
H = trastuzumab		

La dosificación se expresa como área superficial de un animal, de forma que sea relevante para otras especies, es decir, dosificación a  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  es independiente de la especie y, por tanto, comparable entre especies. Las formulaciones de ADC contenidas en PBS, fosfato de sodio 5,4 mM, fosfato de potasio 4,2 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 6,5.

La sangre se recogió para análisis hematología antes de la dosis, y a 5 min., 6 h, 10 h, y 1, 3, 5, 7, 14, 21 días después de cada dosis. Los recuentos de eritrocitos (RBC) y plaquetas (PLT) se midieron según un método de dispersión de luz. El recuento de leucocitos (WBC) se midió por el método de la peroxidasa/basófilos. El recuento de reticulocitos se midió según un método de dispersión de luz con un colorante catiónico. Los recuentos de células se midieron con un aparato Advia 120. ALT (alanina aminotransferasa) y AST (aspartato aminotransferasa) se midieron por U/l mediante UV/NADH; metodología IFCC en un aparato Olympus AU400, y usando Ab Total ELISA - ECD/GxhuFc-HRP. Conj. Ab ELISA - MMAE/MMAF//ECD-Bio/SA-HRP ensayos.

Ejemplo 33 - Producción, caracterización y humanización del anticuerpo monoclonal 4D5 dirigido contra ErbB2

El anticuerpo monoclonal 4D5 murino que se une específicamente al dominio extracelular de ErbB2 se produjo como se describe en Fendly et al. (1990) Cancer Research 50:1550-1558. En resumen, células NIH 3T3/HER2-3<sub>400</sub> (que se expresa aproximadamente a  $1 \times 10^5$  ErbB2 moléculas/célula) producido como se describe en Hudziak et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84:7158-7163 (1987) se recogieron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía EDTA 25 mM y se usaron para inmunizar ratones BALB/c. Los ratones recibieron inyecciones i.p. de  $10^7$  células en PBS 0,5 ml en las semanas 0, 2, 5 y 7. Los ratones con antisueros que inmunoprecipitaron ErbB2 marcado con <sup>32</sup>P recibieron inyecciones i.p. de un extracto de membrana de aglutinina de germen de trigo-ErbB2 purificado en Sepharose (WGA) en las semanas 9 y 13. Esto fue seguido por una inyección i.v., de 0,1 ml de la preparación de ErbB2 y los esplenocitos se fusionaron con la línea de mieloma de ratón X63-Ag8.653. Los sobrenadantes de hibridoma se cribaron para determinar la unión de ErbB2 mediante ELISA y radioinmunoprecipitación.

Cartografiado y caracterización de epítomos

- El epítomo ErbB2 unido por el anticuerpo monoclonal 4D5 se determinó mediante análisis de unión competitiva (Fendly et al. *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990)). Los estudios de bloqueo cruzado se realizaron mediante fluorescencia directa sobre células intactas, usando la PANDEX™ Screen Machine para la fluorescencia cuantitativa. El anticuerpo monoclonal se conjugó con isotiocianato de fluoresceína (FITC), usando procedimientos establecidos (Wofsy et al. *Selected Methods in Cellular Immunology*, p. 287, Mishel y Schiigi (eds.) San Francisco: W.J. Freeman Co. (1980)). Las monocapas confluentes de células NIH 3T3/HER2-3<sub>400</sub> se tripsinizaron, se lavaron una vez, y se resuspendieron a  $1,75 \times 10^6$  células/ml en PBS frío que contenía albúmina de suero bovino al 0,5 % (BSA) y  $\text{NaN}_3$  al 0,1 %. Una concentración final de partículas de látex al 1 % (IDC, Portland, OR) se añadió para reducir la obstrucción de las membranas de las placas PANDEX™. Células en suspensión, 20  $\mu\text{l}$ , y 20  $\mu\text{l}$  de anticuerpos monoclonales purificados (100  $\mu\text{g/ml}$  a 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) se añadieron a los pocillos de la placa PANDEX™ y se incubaron sobre hielo durante 30 minutos. Una dilución predeterminada del anticuerpo monoclonal marcado con FITC en 20  $\mu\text{l}$  se añadieron a cada pocillo, se incubó durante 30 minutos, se lavó, y la fluorescencia se cuantificó mediante PANDEX™. Se consideró que los anticuerpos monoclonales comparten un epítomo si cada uno bloquea la unión del otro en un 50 % o más en comparación con un anticuerpo monoclonal de control irrelevante. En este experimento, el anticuerpo monoclonal 4D5 recibió la asignación del epítomo I (restos de aminoácidos de aproximadamente 529 a aproximadamente 625, inclusive dentro del dominio extracelular de ErbB2).
- Las características de inhibición del crecimiento del anticuerpo monoclonal 4D5 se evaluaron usando la línea de células de tumor de mama, SK-BR-3 (véase Hudziak et al. (1989) *Molec. Cell. Biol.* 9(3): 1165-1172). En resumen, las células SK-BR-3 se desprendieron usando tripsina al 0,25 % (vol/vol) y se suspendieron en medio completo a una densidad de  $4 \times 10^5$  células por ml. Alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  ( $4 \times 10^4$  células) se sembraron en placas de microdilución de 96 pocillos, se dejaron adherir las células, y se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de media solo o media que contenía anticuerpo monoclonal (concentración final, 5  $\mu\text{g/ml}$ ) a continuación. Después de 72 horas, las placas se lavaron dos veces con PBS (pH 7,5), se tiñeron con violeta cristal (0,5 % en metanol), y se analizaron para determinar la proliferación celular relativa como se describe en Sugarman et al. (1985) *Science* 230:943-945. El anticuerpo monoclonal 4D5 inhibió la proliferación relativa de células SK-BR-3 en aproximadamente un 56 %.
- También se evaluó la capacidad del anticuerpo monoclonal 4D5 para inhibir la fosforilación de la tirosina de proteínas estimulada con HRG en el intervalo de  $M_r$  180.000 procedentes de lisados de células MCF7 completas (Lewis et al. (1996) *Cancer Research* 56:1457-1465). Se sabe que las células MCF7 expresan todos los receptores de ErbB, pero a relativamente bajos niveles. Como ErbB2, ErbB3, y ErbB4 tienen tamaños moleculares casi idénticos, no es posible discernir qué proteína tiene la tirosina fosforilada cuando los lisados de células completas, se evaluaron mediante análisis por transferencia Western. Sin embargo, estas células son ideales para los ensayos de fosforilación de tirosina HRG debido a las condiciones de ensayo usadas, en ausencia de HRG añadido exógenamente, muestran niveles de indetectables a bajos de fosforilación de tirosina de proteínas en el intervalo de  $M_r$  180.000.
- Las células MCF7 se sembraron en placas de 24 pocillos y pueden añadirse anticuerpos monoclonales a ErbB2 a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos a temperatura ambiente; después se añadió rHRG $\beta$ 1<sub>177-244</sub> a cada pocillo hasta una concentración final de 0,2 nM, y la incubación puede continuarse durante 8 minutos. El medio se aspiró cuidadosamente de cada pocillo, y se detuvieron las reacciones mediante la adición de 100  $\mu\text{l}$  de tampón de muestra SDS (SDS al 5 %, DTT 25 mM; y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Cada muestra (25  $\mu\text{l}$ ) se sometió a electroforesis en un gel de gradiente de 4-12 % (Novex) y después transferirse electroforéticamente a membrana de difluoruro de polivinilideno. Antifosfotirosina (4G10, de UBI, usada a 1  $\mu\text{g/ml}$ ), se usó para revelar las inmunotransferencias, y la intensidad de la banda reactiva predominante  $M_r$  180.000 se cuantificó mediante densitometría de reflectancia, como se ha descrito anteriormente (Holmes et al. (1992) *Science* 256:1205-1210; Sliwkowski y col. *J. Biol. Chem.* 269:14661-14665 (1994)).
- El anticuerpo monoclonal 4D5 inhibió significativamente la generación de una señal de fosforilación de tirosina inducida por a  $M_r$  180.000. En ausencia de HRG, pero fue incapaz de estimular la fosforilación de la tirosina en proteínas en el intervalo  $M_r$  180.000. También, este anticuerpo no reacciona en cruzado con EGFR (Fendly et al. *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990)), ErbB3 o ErbB4. El anticuerpo monoclonal 4D5 fue capaz de bloquear la fosforilación de tirosina estimulada con HRG en un 50 %.
- Se evaluó el efecto inhibitor del crecimiento del anticuerpo monoclonal 4D5 sobre células MDA-MB-175 y SK-BR-3 en presencia o ausencia de rHRG $\beta$ 1 exógeno (Schaefer et al. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)). Los niveles de ErbB2 en células MDA-MB-175 son 4-6 veces superiores al nivel encontrado en células epiteliales de mama normales y el receptor ErbB2-ErbB4 tiene 1 tirosina fosforilada de forma constitutiva en células MDA-MB-175. El anticuerpo monoclonal 4D5 fue capaz de inhibir la proliferación celular de células MDA-MB-175, tanto en presencia como en ausencia de HRG exógeno. La inhibición de la proliferación celular mediante 4D5 es dependiente del nivel de expresión de ErbB2 (Lewis et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993)). Se pudo detectar una inhibición máxima del 66 % en las células SK-BR-3. Sin embargo, este efecto se pudo superar mediante HRG exógeno.

El anticuerpo monoclonal 4D5 de murino se humanizó, usando una estrategia de "mutagénesis por conversión génica", como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5821337, cuya divulgación completa se incorpora al presente documento como referencia de forma expresa. El anticuerpo monoclonal 4D5 humanizado usado en los siguientes experimentos se denominó huMAb4D5-8. Este anticuerpo es de isotipo IgG1.

5

Listado de secuencias

<110> Doronina, Svetlana O.

Toki, Brian E.

10 Senter, Peter D.

Ebens, Allen J.

Polakis, Paul

Sliwkowski, Mark X.

Spencer, Susan D.

15 Kline, Toni Beth

<120> COMPUESTOS DE MONOMETILVALINA QUE SE PUEDEN CONJUGAR CON LIGANDOS

<130> 018891-001020PC

20

<141> 05/11/2004

<150> US 60/598,899

<151> 04/08/2004

25

<150> US 60/557,116

<151> 26/03/2004

30

<150> US 60/518,534

<151> 06/11/2003

<160> 35

<210> 1

35

<211> 502

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1



ES 2 697 327 T3

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

ES 2 697 327 T3

Ser Leu Leu Leu Val Leu Ile Ile Leu Phe Cys Tyr Phe Arg Tyr  
140 145 150

Lys Arg Gln Glu Thr Arg Pro Arg Tyr Ser Ile Gly Leu Glu Gln  
155 160 165

Asp Glu Thr Tyr Ile Pro Pro Gly Glu Ser Leu Arg Asp Leu Ile  
170 175 180

Glu Gln Ser Gln Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Leu Leu  
185 190 195

Val Gln Arg Thr Ile Ala Lys Gln Ile Gln Met Val Lys Gln Ile  
200 205 210

Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Met Gly Lys Trp Arg Gly  
215 220 225

Glu Lys Val Ala Val Lys Val Phe Phe Thr Thr Glu Glu Ala Ser  
230 235 240

Trp Phe Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Gln Thr Val Leu Met Arg His  
245 250 255

Glu Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Ile Lys Gly Thr Gly  
260 265 270

Ser Trp Thr Gln Leu Tyr Leu Ile Thr Asp Tyr His Glu Asn Gly  
275 280 285

Ser Leu Tyr Asp Tyr Leu Lys Ser Thr Thr Leu Asp Ala Lys Ser  
290 295 300

Met Leu Lys Leu Ala Tyr Ser Ser Val Ser Gly Leu Cys His Leu  
305 310 315

His Thr Glu Ile Phe Ser Thr Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His  
320 325 330

Arg Asp Leu Lys Ser Lys Asn Ile Leu Val Lys Lys Asn Gly Thr  
335 340 345

Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala Val Lys Phe Ile Ser Asp  
350 355 360

Thr Asn Glu Val Asp Ile Pro Pro Asn Thr Arg Val Gly Thr Lys  
365 370 375

Arg Tyr Met Pro Pro Glu Val Leu Asp Glu Ser Leu Asn Arg Asn  
380 385 390

His Phe Gln Ser Tyr Ile Met Ala Asp Met Tyr Ser Phe Gly Leu  
395 400 405

Ile Leu Trp Glu Val Ala Arg Arg Cys Val Ser Gly Gly Ile Val  
410 415 420

Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr His Asp Leu Val Pro Ser Asp Pro  
425 430 435

Ser Tyr Glu Asp Met Arg Glu Ile Val Cys Ile Lys Lys Leu Arg  
440 445 450

ES 2 697 327 T3

Pro Ser Phe Pro Asn Arg Trp Ser Ser Asp Glu Cys Leu Arg Gln  
 455 460 465  
 Met Gly Lys Leu Met Thr Glu Cys Trp Ala His Asn Pro Ala Ser  
 470 475 480  
 Arg Leu Thr Ala Leu Arg Val Lys Lys Thr Leu Ala Lys Met Ser  
 485 490 495  
 Glu Ser Gln Asp Ile Lys Leu  
 500

5 <210> 2  
 <211> 507  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 2

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

ES 2 697 327 T3

Asn Leu Asp Pro Asn Phe Ser Phe Glu Gly Thr Lys Leu Asp Val  
 230 235 240

Gly Asn Ile Val Leu Ala Leu Tyr Ser Gly Leu Phe Ala Tyr Gly  
 245 250 255

Gly Trp Asn Tyr Leu Asn Phe Val Thr Glu Glu Met Ile Asn Pro  
 260 265 270

Tyr Arg Asn Leu Pro Leu Ala Ile Ile Ile Ser Leu Pro Ile Val  
 275 280 285

Thr Leu Val Tyr Val Leu Thr Asn Leu Ala Tyr Phe Thr Thr Leu  
 290 295 300

Ser Thr Glu Gln Met Leu Ser Ser Glu Ala Val Ala Val Asp Phe  
 305 310 315

Gly Asn Tyr His Leu Gly Val Met Ser Trp Ile Ile Pro Val Phe  
 320 325 330

Val Gly Leu Ser Cys Phe Gly Ser Val Asn Gly Ser Leu Phe Thr  
 335 340 345

Ser Ser Arg Leu Phe Phe Val Gly Ser Arg Glu Gly His Leu Pro  
 350 355 360

Ser Ile Leu Ser Met Ile His Pro Gln Leu Leu Thr Pro Val Pro  
 365 370 375

Ser Leu Val Phe Thr Cys Val Met Thr Leu Leu Tyr Ala Phe Ser  
 380 385 390

Lys Asp Ile Phe Ser Val Ile Asn Phe Phe Ser Phe Phe Asn Trp  
 395 400 405

Leu Cys Val Ala Leu Ala Ile Ile Gly Met Ile Trp Leu Arg His  
 410 415 420

Arg Lys Pro Glu Leu Glu Arg Pro Ile Lys Val Asn Leu Ala Leu  
 425 430 435

Pro Val Phe Phe Ile Leu Ala Cys Leu Phe Leu Ile Ala Val Ser  
 440 445 450

Phe Trp Lys Thr Pro Val Glu Cys Gly Ile Gly Phe Thr Ile Ile  
 455 460 465

Leu Ser Gly Leu Pro Val Tyr Phe Phe Gly Val Trp Trp Lys Asn  
 470 475 480

Lys Pro Lys Trp Leu Leu Gln Gly Ile Phe Ser Thr Thr Val Leu  
 485 490 495

Cys Gln Lys Leu Met Gln Val Val Pro Gln Glu Thr  
 500 505

<210> 3  
 <211> 339  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 697 327 T3

<400> 3

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

ES 2 697 327 T3

Lys Ile Leu Lys Ile Arg His Gly Trp Glu Asp Val Thr Lys Ile  
 320 325 330  
 Asn Lys Thr Glu Ile Cys Ser Gln Leu  
 335

5 <210> 4  
 <211> 6995  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 4

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

ES 2 697 327 T3

Pro Ser Leu Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Ser Val Ser Ser Ser  
 260 265 270  
 Leu Ser Ser Pro Ala Met Thr Ser Thr Ser Phe Phe Ser Thr Leu  
 275 280 285  
 Pro Glu Ser Ile Ser Ser Ser Pro His Pro Val Thr Ala Leu Leu  
 290 295 300  
 Thr Leu Gly Pro Val Lys Thr Thr Asp Met Leu Arg Thr Ser Ser  
 305 310 315  
 Glu Pro Glu Thr Ser Ser Pro Pro Asn Leu Ser Ser Thr Ser Ala  
 320 325 330  
 Glu Ile Leu Ala Thr Ser Glu Val Thr Lys Asp Arg Glu Lys Ile  
 335 340 345  
 His Pro Ser Ser Asn Thr Pro Val Val Asn Val Gly Thr Val Ile  
 350 355 360  
 Tyr Lys His Leu Ser Pro Ser Ser Val Leu Ala Asp Leu Val Thr  
 365 370 375  
 Thr Lys Pro Thr Ser Pro Met Ala Thr Thr Ser Thr Leu Gly Asn  
 380 385 390  
 Thr Ser Val Ser Thr Ser Thr Pro Ala Phe Pro Glu Thr Met Met  
 395 400 405  
 Thr Gln Pro Thr Ser Ser Leu Thr Ser Gly Leu Arg Glu Ile Ser  
 410 415 420  
 Thr Ser Gln Glu Thr Ser Ser Ala Thr Glu Arg Ser Ala Ser Leu  
 425 430 435  
 Ser Gly Met Pro Thr Gly Ala Thr Thr Lys Val Ser Arg Thr Glu  
 440 445 450  
 Ala Leu Ser Leu Gly Arg Thr Ser Thr Pro Gly Pro Ala Gln Ser  
 455 460 465  
 Thr Ile Ser Pro Glu Ile Ser Thr Glu Thr Ile Thr Arg Ile Ser  
 470 475 480  
 Thr Pro Leu Thr Thr Thr Gly Ser Ala Glu Met Thr Ile Thr Pro  
 485 490 495  
 Lys Thr Gly His Ser Gly Ala Ser Ser Gln Gly Thr Phe Thr Leu  
 500 505 510  
 Asp Thr Ser Ser Arg Ala Ser Trp Pro Gly Thr His Ser Ala Ala  
 515 520 525  
 Thr His Arg Ser Pro His Ser Gly Met Thr Thr Pro Met Ser Arg  
 530 535 540  
 Gly Pro Glu Asp Val Ser Trp Pro Ser Arg Pro Ser Val Glu Lys  
 545 550 555  
 Thr Ser Pro Pro Ser Ser Leu Val Ser Leu Ser Ala Val Thr Ser  
 560 565 570

ES 2 697 327 T3

Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Thr Pro Ser Glu Ser Ser His Ser Ser  
 575 580 585  
 Pro Leu Arg Val Thr Ser Leu Phe Thr Pro Val Met Met Lys Thr  
 590 595 600  
 Thr Asp Met Leu Asp Thr Ser Leu Glu Pro Val Thr Thr Ser Pro  
 605 610 615  
 Pro Ser Met Asn Ile Thr Ser Asp Glu Ser Leu Ala Thr Ser Lys  
 620 625 630  
 Ala Thr Met Glu Thr Glu Ala Ile Gln Leu Ser Glu Asn Thr Ala  
 635 640 645  
 Val Thr Gln Met Gly Thr Ile Ser Ala Arg Gln Glu Phe Tyr Ser  
 650 655 660  
 Ser Tyr Pro Gly Leu Pro Glu Pro Ser Lys Val Thr Ser Pro Val  
 665 670 675  
 Val Thr Ser Ser Thr Ile Lys Asp Ile Val Ser Thr Thr Ile Pro  
 680 685 690  
 Ala Ser Ser Glu Ile Thr Arg Ile Glu Met Glu Ser Thr Ser Thr  
 695 700 705  
 Leu Thr Pro Thr Pro Arg Glu Thr Ser Thr Ser Gln Glu Ile His  
 710 715 720  
 Ser Ala Thr Lys Pro Ser Thr Val Pro Tyr Lys Ala Leu Thr Ser  
 725 730 735  
 Ala Thr Ile Glu Asp Ser Met Thr Gln Val Met Ser Ser Ser Arg  
 740 745 750  
 Gly Pro Ser Pro Asp Gln Ser Thr Met Ser Gln Asp Ile Ser Thr  
 755 760 765  
 Glu Val Ile Thr Arg Leu Ser Thr Ser Pro Ile Lys Thr Glu Ser  
 770 775 780  
 Thr Glu Met Thr Ile Thr Thr Gln Thr Gly Ser Pro Gly Ala Thr  
 785 790 795  
 Ser Arg Gly Thr Leu Thr Leu Asp Thr Ser Thr Thr Phe Met Ser  
 800 805 810  
 Gly Thr His Ser Thr Ala Ser Gln Gly Phe Ser His Ser Gln Met  
 815 820 825  
 Thr Ala Leu Met Ser Arg Thr Pro Gly Glu Val Pro Trp Leu Ser  
 830 835 840  
 His Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Ser  
 845 850 855  
 Ser Pro Val Met Thr Ser Ser Ser Pro Val Ser Ser Thr Leu Pro  
 860 865 870  
 Asp Ser Ile His Ser Ser Ser Leu Pro Val Thr Ser Leu Leu Thr  
 875 880 885



ES 2 697 327 T3

Ser Gly Leu Val Lys Thr Thr Glu Leu Leu Gly Thr Ser Ser Glu  
890 895 900

Pro Glu Thr Ser Ser Pro Pro Asn Leu Ser Ser Thr Ser Ala Glu  
905 910 915

Ile Leu Ala Thr Thr Glu Val Thr Thr Asp Thr Glu Lys Leu Glu  
920 925 930

Met Thr Asn Val Val Thr Ser Gly Tyr Thr His Glu Ser Pro Ser  
935 940 945

Ser Val Leu Ala Asp Ser Val Thr Thr Lys Ala Thr Ser Ser Met  
950 955 960

Gly Ile Thr Tyr Pro Thr Gly Asp Thr Asn Val Leu Thr Ser Thr  
965 970 975

Pro Ala Phe Ser Asp Thr Ser Arg Ile Gln Thr Lys Ser Lys Leu  
980 985 990

Ser Leu Thr Pro Gly Leu Met Glu Thr Ser Ile Ser Glu Glu Thr  
995 1000 1005

Ser Ser Ala Thr Glu Lys Ser Thr Val Leu Ser Ser Val Pro Thr  
1010 1015 1020

Gly Ala Thr Thr Glu Val Ser Arg Thr Glu Ala Ile Ser Ser Ser  
1025 1030 1035

Arg Thr Ser Ile Pro Gly Pro Ala Gln Ser Thr Met Ser Ser Asp  
1040 1045 1050

Thr Ser Met Glu Thr Ile Thr Arg Ile Ser Thr Pro Leu Thr Arg  
1055 1060 1065

Lys Glu Ser Thr Asp Met Ala Ile Thr Pro Lys Thr Gly Pro Ser  
1070 1075 1080

Gly Ala Thr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Leu Asp Ser Ser Ser Thr  
1085 1090 1095

Ala Ser Trp Pro Gly Thr His Ser Ala Thr Thr Gln Arg Phe Pro  
1100 1105 1110

Arg Ser Val Val Thr Thr Pro Met Ser Arg Gly Pro Glu Asp Val  
1115 1120 1125

Ser Trp Pro Ser Pro Leu Ser Val Glu Lys Asn Ser Pro Pro Ser  
1130 1135 1140

Ser Leu Val Ser Ser Ser Ser Val Thr Ser Pro Ser Pro Leu Tyr  
1145 1150 1155

Ser Thr Pro Ser Gly Ser Ser His Ser Ser Pro Val Pro Val Thr  
1160 1165 1170

Ser Leu Phe Thr Ser Ile Met Met Lys Ala Thr Asp Met Leu Asp  
1175 1180 1185

Ala Ser Leu Glu Pro Glu Thr Thr Ser Ala Pro Asn Met Asn Ile  
1190 1195 1200

ES 2 697 327 T3

Thr Ser Asp Glu Ser Leu Ala Ala Ser Lys Ala Thr Thr Glu Thr  
 1205 1210 1215  
 Glu Ala Ile His Val Phe Glu Asn Thr Ala Ala Ser His Val Glu  
 1220 1225 1230  
 Thr Thr Ser Ala Thr Glu Glu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro Gly Phe  
 1235 1240 1245  
 Ser Glu Pro Thr Lys Val Ile Ser Pro Val Val Thr Ser Ser Ser  
 1250 1255 1260  
 Ile Arg Asp Asn Met Val Ser Thr Thr Met Pro Gly Ser Ser Gly  
 1265 1270 1275  
 Ile Thr Arg Ile Glu Ile Glu Ser Met Ser Ser Leu Thr Pro Gly  
 1280 1285 1290  
 Leu Arg Glu Thr Arg Thr Ser Gln Asp Ile Thr Ser Ser Thr Glu  
 1295 1300 1305  
 Thr Ser Thr Val Leu Tyr Lys Met Pro Ser Gly Ala Thr Pro Glu  
 1310 1315 1320  
 Val Ser Arg Thr Glu Val Met Pro Ser Ser Arg Thr Ser Ile Pro  
 1325 1330 1335  
 Gly Pro Ala Gln Ser Thr Met Ser Leu Asp Ile Ser Asp Glu Val  
 1340 1345 1350  
 Val Thr Arg Leu Ser Thr Ser Pro Ile Met Thr Glu Ser Ala Glu  
 1355 1360 1365  
 Ile Thr Ile Thr Thr Gln Thr Gly Tyr Ser Leu Ala Thr Ser Gln  
 1370 1375 1380  
 Val Thr Leu Pro Leu Gly Thr Ser Met Thr Phe Leu Ser Gly Thr  
 1385 1390 1395  
 His Ser Thr Met Ser Gln Gly Leu Ser His Ser Glu Met Thr Asn  
 1400 1405 1410  
 Leu Met Ser Arg Gly Pro Glu Ser Leu Ser Trp Thr Ser Pro Arg  
 1415 1420 1425  
 Phe Val Glu Thr Thr Arg Ser Ser Ser Ser Leu Thr Ser Leu Pro  
 1430 1435 1440  
 Leu Thr Thr Ser Leu Ser Pro Val Ser Ser Thr Leu Leu Asp Ser  
 1445 1450 1455  
 Ser Pro Ser Ser Pro Leu Pro Val Thr Ser Leu Ile Leu Pro Gly  
 1460 1465 1470  
 Leu Val Lys Thr Thr Glu Val Leu Asp Thr Ser Ser Glu Pro Lys  
 1475 1480 1485  
 Thr Ser Ser Ser Pro Asn Leu Ser Ser Thr Ser Val Glu Ile Pro  
 1490 1495 1500  
 Ala Thr Ser Glu Ile Met Thr Asp Thr Glu Lys Ile His Pro Ser  
 1505 1510 1515

ES 2 697 327 T3

Ser Asn Thr Ala Val Ala Lys Val Arg Thr Ser Ser Ser Val His  
1520 1525 1530

Glu Ser His Ser Ser Val Leu Ala Asp Ser Glu Thr Thr Ile Thr  
1535 1540 1545

Ile Pro Ser Met Gly Ile Thr Ser Ala Val Glu Asp Thr Thr Val  
1550 1555 1560

Phe Thr Ser Asn Pro Ala Phe Ser Glu Thr Arg Arg Ile Pro Thr  
1565 1570 1575

Glu Pro Thr Phe Ser Leu Thr Pro Gly Phe Arg Glu Thr Ser Thr  
1580 1585 1590

Ser Glu Glu Thr Thr Ser Ile Thr Glu Thr Ser Ala Val Leu Phe  
1595 1600 1605

Gly Val Pro Thr Ser Ala Thr Thr Glu Val Ser Met Thr Glu Ile  
1610 1615 1620

Met Ser Ser Asn Arg Thr His Ile Pro Asp Ser Asp Gln Ser Thr  
1625 1630 1635

Met Ser Pro Asp Ile Ile Thr Glu Val Ile Thr Arg Leu Ser Ser  
1640 1645 1650

Ser Ser Met Met Ser Glu Ser Thr Gln Met Thr Ile Thr Thr Gln  
1655 1660 1665

Lys Ser Ser Pro Gly Ala Thr Ala Gln Ser Thr Leu Thr Leu Ala  
1670 1675 1680

Thr Thr Thr Ala Pro Leu Ala Arg Thr His Ser Thr Val Pro Pro  
1685 1690 1695

Arg Phe Leu His Ser Glu Met Thr Thr Leu Met Ser Arg Ser Pro  
1700 1705 1710

Glu Asn Pro Ser Trp Lys Ser Ser Pro Phe Val Glu Lys Thr Ser  
1715 1720 1725

Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser Leu Pro Val Thr Thr Ser Pro Ser  
1730 1735 1740

Val Ser Ser Thr Leu Pro Gln Ser Ile Pro Ser Ser Ser Phe Ser  
1745 1750 1755

Val Thr Ser Leu Leu Thr Pro Gly Met Val Lys Thr Thr Asp Thr  
1760 1765 1770

Ser Thr Glu Pro Gly Thr Ser Leu Ser Pro Asn Leu Ser Gly Thr  
1775 1780 1785

Ser Val Glu Ile Leu Ala Ala Ser Glu Val Thr Thr Asp Thr Glu  
1790 1795 1800

Lys Ile His Pro Ser Ser Ser Met Ala Val Thr Asn Val Gly Thr  
1805 1810 1815

Thr Ser Ser Gly His Glu Leu Tyr Ser Ser Val Ser Ile His Ser  
1820 1825 1830

ES 2 697 327 T3

Glu Pro Ser Lys Ala Thr Tyr Pro Val Gly Thr Pro Ser Ser Met  
 1835 1840 1845  
 Ala Glu Thr Ser Ile Ser Thr Ser Met Pro Ala Asn Phe Glu Thr  
 1850 1855 1860  
 Thr Gly Phe Glu Ala Glu Pro Phe Ser His Leu Thr Ser Gly Leu  
 1865 1870 1875  
 Arg Lys Thr Asn Met Ser Leu Asp Thr Ser Ser Val Thr Pro Thr  
 1880 1885 1890  
 Asn Thr Pro Ser Ser Pro Gly Ser Thr His Leu Leu Gln Ser Ser  
 1895 1900 1905  
 Lys Thr Asp Phe Thr Ser Ser Ala Lys Thr Ser Ser Pro Asp Trp  
 1910 1915 1920  
 Pro Pro Ala Ser Gln Tyr Thr Glu Ile Pro Val Asp Ile Ile Thr  
 1925 1930 1935  
 Pro Phe Asn Ala Ser Pro Ser Ile Thr Glu Ser Thr Gly Ile Thr  
 1940 1945 1950  
 Ser Phe Pro Glu Ser Arg Phe Thr Met Ser Val Thr Glu Ser Thr  
 1955 1960 1965  
 His His Leu Ser Thr Asp Leu Leu Pro Ser Ala Glu Thr Ile Ser  
 1970 1975 1980  
 Thr Gly Thr Val Met Pro Ser Leu Ser Glu Ala Met Thr Ser Phe  
 1985 1990 1995  
 Ala Thr Thr Gly Val Pro Arg Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Pro  
 2000 2005 2010  
 Phe Ser Arg Thr Glu Ser Gly Pro Gly Asp Ala Thr Leu Ser Thr  
 2015 2020 2025  
 Ile Ala Glu Ser Leu Pro Ser Ser Thr Pro Val Pro Phe Ser Ser  
 2030 2035 2040  
 Ser Thr Phe Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Ile Pro Ala Leu His  
 2045 2050 2055  
 Glu Ile Thr Ser Ser Ser Ala Thr Pro Tyr Arg Val Asp Thr Ser  
 2060 2065 2070  
 Leu Gly Thr Glu Ser Ser Thr Thr Glu Gly Arg Leu Val Met Val  
 2075 2080 2085  
 Ser Thr Leu Asp Thr Ser Ser Gln Pro Gly Arg Thr Ser Ser Ser  
 2090 2095 2100  
 Pro Ile Leu Asp Thr Arg Met Thr Glu Ser Val Glu Leu Gly Thr  
 2105 2110 2115  
 Val Thr Ser Ala Tyr Gln Val Pro Ser Leu Ser Thr Arg Leu Thr  
 2120 2125 2130  
 Arg Thr Asp Gly Ile Met Glu His Ile Thr Lys Ile Pro Asn Glu  
 2135 2140 2145

ES 2 697 327 T3

Ala Ala His Arg Gly Thr Ile Arg Pro Val Lys Gly Pro Gln Thr  
2150 2155 2160

Ser Thr Ser Pro Ala Ser Pro Lys Gly Leu His Thr Gly Gly Thr  
2165 2170 2175

Lys Arg Met Glu Thr Thr Thr Thr Ala Leu Lys Thr Thr Thr Thr  
2180 2185 2190

Ala Leu Lys Thr Thr Ser Arg Ala Thr Leu Thr Thr Ser Val Tyr  
2195 2200 2205

Thr Pro Thr Leu Gly Thr Leu Thr Pro Leu Asn Ala Ser Met Gln  
2210 2215 2220

Met Ala Ser Thr Ile Pro Thr Glu Met Met Ile Thr Thr Pro Tyr  
2225 2230 2235

Val Phe Pro Asp Val Pro Glu Thr Thr Ser Ser Leu Ala Thr Ser  
2240 2245 2250

Leu Gly Ala Glu Thr Ser Thr Ala Leu Pro Arg Thr Thr Pro Ser  
2255 2260 2265

Val Phe Asn Arg Glu Ser Glu Thr Thr Ala Ser Leu Val Ser Arg  
2270 2275 2280

Ser Gly Ala Glu Arg Ser Pro Val Ile Gln Thr Leu Asp Val Ser  
2285 2290 2295

Ser Ser Glu Pro Asp Thr Thr Ala Ser Trp Val Ile His Pro Ala  
2300 2305 2310

Glu Thr Ile Pro Thr Val Ser Lys Thr Thr Pro Asn Phe Phe His  
2315 2320 2325

Ser Glu Leu Asp Thr Val Ser Ser Thr Ala Thr Ser His Gly Ala  
2330 2335 2340

Asp Val Ser Ser Ala Ile Pro Thr Asn Ile Ser Pro Ser Glu Leu  
2345 2350 2355

Asp Ala Leu Thr Pro Leu Val Thr Ile Ser Gly Thr Asp Thr Ser  
2360 2365 2370

Thr Thr Phe Pro Thr Leu Thr Lys Ser Pro His Glu Thr Glu Thr  
2375 2380 2385

Arg Thr Thr Trp Leu Thr His Pro Ala Glu Thr Ser Ser Thr Ile  
2390 2395 2400

Pro Arg Thr Ile Pro Asn Phe Ser His His Glu Ser Asp Ala Thr  
2405 2410 2415

Pro Ser Ile Ala Thr Ser Pro Gly Ala Glu Thr Ser Ser Ala Ile  
2420 2425 2430

Pro Ile Met Thr Val Ser Pro Gly Ala Glu Asp Leu Val Thr Ser  
2435 2440 2445

Gln Val Thr Ser Ser Gly Thr Asp Arg Asn Met Thr Ile Pro Thr  
2450 2455 2460

ES 2 697 327 T3

Leu Thr Leu Ser Pro Gly Glu Pro Lys Thr Ile Ala Ser Leu Val  
 2465 2470 2475  
 Thr His Pro Glu Ala Gln Thr Ser Ser Ala Ile Pro Thr Ser Thr  
 2480 2485 2490  
 Ile Ser Pro Ala Val Ser Arg Leu Val Thr Ser Met Val Thr Ser  
 2495 2500 2505  
 Leu Ala Ala Lys Thr Ser Thr Thr Asn Arg Ala Leu Thr Asn Ser  
 2510 2515 2520  
 Pro Gly Glu Pro Ala Thr Thr Val Ser Leu Val Thr His Ser Ala  
 2525 2530 2535  
 Gln Thr Ser Pro Thr Val Pro Trp Thr Thr Ser Ile Phe Phe His  
 2540 2545 2550  
 Ser Lys Ser Asp Thr Thr Pro Ser Met Thr Thr Ser His Gly Ala  
 2555 2560 2565  
 Glu Ser Ser Ser Ala Val Pro Thr Pro Thr Val Ser Thr Glu Val  
 2570 2575 2580  
 Pro Gly Val Val Thr Pro Leu Val Thr Ser Ser Arg Ala Val Ile  
 2585 2590 2595  
 Ser Thr Thr Ile Pro Ile Leu Thr Leu Ser Pro Gly Glu Pro Glu  
 2600 2605 2610  
 Thr Thr Pro Ser Met Ala Thr Ser His Gly Glu Glu Ala Ser Ser  
 2615 2620 2625  
 Ala Ile Pro Thr Pro Thr Val Ser Pro Gly Val Pro Gly Val Val  
 2630 2635 2640  
 Thr Ser Leu Val Thr Ser Ser Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Ile  
 2645 2650 2655  
 Pro Ile Leu Thr Phe Ser Leu Gly Glu Pro Glu Thr Thr Pro Ser  
 2660 2665 2670  
 Met Ala Thr Ser His Gly Thr Glu Ala Gly Ser Ala Val Pro Thr  
 2675 2680 2685  
 Val Leu Pro Glu Val Pro Gly Met Val Thr Ser Leu Val Ala Ser  
 2690 2695 2700  
 Ser Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Leu Pro Thr Leu Thr Leu Ser  
 2705 2710 2715  
 Pro Gly Glu Pro Glu Thr Thr Pro Ser Met Ala Thr Ser His Gly  
 2720 2725 2730  
 Ala Glu Ala Ser Ser Thr Val Pro Thr Val Ser Pro Glu Val Pro  
 2735 2740 2745  
 Gly Val Val Thr Ser Leu Val Thr Ser Ser Ser Gly Val Asn Ser  
 2750 2755 2760  
 Thr Ser Ile Pro Thr Leu Ile Leu Ser Pro Gly Glu Leu Glu Thr  
 2765 2770 2775

ES 2 697 327 T3

Thr Pro Ser Met Ala Thr Ser His Gly Ala Glu Ala Ser Ser Ala  
 2780 2785 2790  
 Val Pro Thr Pro Thr Val Ser Pro Gly Val Ser Gly Val Val Thr  
 2795 2800 2805  
 Pro Leu Val Thr Ser Ser Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Ile Pro  
 2810 2815 2820  
 Ile Leu Thr Leu Ser Ser Ser Glu Pro Glu Thr Thr Pro Ser Met  
 2825 2830 2835  
 Ala Thr Ser His Gly Val Glu Ala Ser Ser Ala Val Leu Thr Val  
 2840 2845 2850  
 Ser Pro Glu Val Pro Gly Met Val Thr Phe Leu Val Thr Ser Ser  
 2855 2860 2865  
 Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Ile Pro Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
 2870 2875 2880  
 Asp Glu Pro Glu Thr Thr Thr Ser Leu Val Thr His Ser Glu Ala  
 2885 2890 2895  
 Lys Met Ile Ser Ala Ile Pro Thr Leu Gly Val Ser Pro Thr Val  
 2900 2905 2910  
 Gln Gly Leu Val Thr Ser Leu Val Thr Ser Ser Gly Ser Glu Thr  
 2915 2920 2925  
 Ser Ala Phe Ser Asn Leu Thr Val Ala Ser Ser Gln Pro Glu Thr  
 2930 2935 2940  
 Ile Asp Ser Trp Val Ala His Pro Gly Thr Glu Ala Ser Ser Val  
 2945 2950 2955  
 Val Pro Thr Leu Thr Val Ser Thr Gly Glu Pro Phe Thr Asn Ile  
 2960 2965 2970  
 Ser Leu Val Thr His Pro Ala Glu Ser Ser Ser Thr Leu Pro Arg  
 2975 2980 2985  
 Thr Thr Ser Arg Phe Ser His Ser Glu Leu Asp Thr Met Pro Ser  
 2990 2995 3000  
 Thr Val Thr Ser Pro Glu Ala Glu Ser Ser Ser Ala Ile Ser Thr  
 3005 3010 3015  
 Thr Ile Ser Pro Gly Ile Pro Gly Val Leu Thr Ser Leu Val Thr  
 3020 3025 3030  
 Ser Ser Gly Arg Asp Ile Ser Ala Thr Phe Pro Thr Val Pro Glu  
 3035 3040 3045  
 Ser Pro His Glu Ser Glu Ala Thr Ala Ser Trp Val Thr His Pro  
 3050 3055 3060  
 Ala Val Thr Ser Thr Thr Val Pro Arg Thr Thr Pro Asn Tyr Ser  
 3065 3070 3075  
 His Ser Glu Pro Asp Thr Thr Pro Ser Ile Ala Thr Ser Pro Gly  
 3080 3085 3090

ES 2 697 327 T3

Ala Glu Ala Thr Ser Asp Phe Pro Thr Ile Thr Val Ser Pro Asp  
 3095 3100 3105

Val Pro Asp Met Val Thr Ser Gln Val Thr Ser Ser Gly Thr Asp  
 3110 3115 3120

Thr Ser Ile Thr Ile Pro Thr Leu Thr Leu Ser Ser Gly Glu Pro  
 3125 3130 3135

Glu Thr Thr Thr Ser Phe Ile Thr Tyr Ser Glu Thr His Thr Ser  
 3140 3145 3150

Ser Ala Ile Pro Thr Leu Pro Val Ser Pro Asp Ala Ser Lys Met  
 3155 3160 3165

Leu Thr Ser Leu Val Ile Ser Ser Gly Thr Asp Ser Thr Thr Thr  
 3170 3175 3180

Phe Pro Thr Leu Thr Glu Thr Pro Tyr Glu Pro Glu Thr Thr Ala  
 3185 3190 3195

Ile Gln Leu Ile His Pro Ala Glu Thr Asn Thr Met Val Pro Arg  
 3200 3205 3210

Thr Thr Pro Lys Phe Ser His Ser Lys Ser Asp Thr Thr Leu Pro  
 3215 3220 3225

Val Ala Ile Thr Ser Pro Gly Pro Glu Ala Ser Ser Ala Val Ser  
 3230 3235 3240

Thr Thr Thr Ile Ser Pro Asp Met Ser Asp Leu Val Thr Ser Leu  
 3245 3250 3255

Val Pro Ser Ser Gly Thr Asp Thr Ser Thr Thr Phe Pro Thr Leu  
 3260 3265 3270

Ser Glu Thr Pro Tyr Glu Pro Glu Thr Thr Ala Thr Trp Leu Thr  
 3275 3280 3285

His Pro Ala Glu Thr Ser Thr Thr Val Ser Gly Thr Ile Pro Asn  
 3290 3295 3300

Phe Ser His Arg Gly Ser Asp Thr Ala Pro Ser Met Val Thr Ser  
 3305 3310 3315

Pro Gly Val Asp Thr Arg Ser Gly Val Pro Thr Thr Thr Ile Pro  
 3320 3325 3330

Pro Ser Ile Pro Gly Val Val Thr Ser Gln Val Thr Ser Ser Ala  
 3335 3340 3345

Thr Asp Thr Ser Thr Ala Ile Pro Thr Leu Thr Pro Ser Pro Gly  
 3350 3355 3360

Glu Pro Glu Thr Thr Ala Ser Ser Ala Thr His Pro Gly Thr Gln  
 3365 3370 3375

Thr Gly Phe Thr Val Pro Ile Arg Thr Val Pro Ser Ser Glu Pro  
 3380 3385 3390

Asp Thr Met Ala Ser Trp Val Thr His Pro Pro Gln Thr Ser Thr  
 3395 3400 3405



ES 2 697 327 T3

Pro Val Ser Arg Thr Thr Ser Ser Phe Ser His Ser Ser Pro Asp  
3410 3415 3420

Ala Thr Pro Val Met Ala Thr Ser Pro Arg Thr Glu Ala Ser Ser  
3425 3430 3435

Ala Val Leu Thr Thr Ile Ser Pro Gly Ala Pro Glu Met Val Thr  
3440 3445 3450

Ser Gln Ile Thr Ser Ser Gly Ala Ala Thr Ser Thr Thr Val Pro  
3455 3460 3465

Thr Leu Thr His Ser Pro Gly Met Pro Glu Thr Thr Ala Leu Leu  
3470 3475 3480

Ser Thr His Pro Arg Thr Glu Thr Ser Lys Thr Phe Pro Ala Ser  
3485 3490 3495

Thr Val Phe Pro Gln Val Ser Glu Thr Thr Ala Ser Leu Thr Ile  
3500 3505 3510

Arg Pro Gly Ala Glu Thr Ser Thr Ala Leu Pro Thr Gln Thr Thr  
3515 3520 3525

Ser Ser Leu Phe Thr Leu Leu Val Thr Gly Thr Ser Arg Val Asp  
3530 3535 3540

Leu Ser Pro Thr Ala Ser Pro Gly Val Ser Ala Lys Thr Ala Pro  
3545 3550 3555

Leu Ser Thr His Pro Gly Thr Glu Thr Ser Thr Met Ile Pro Thr  
3560 3565 3570

Ser Thr Leu Ser Leu Gly Leu Leu Glu Thr Thr Gly Leu Leu Ala  
3575 3580 3585

Thr Ser Ser Ser Ala Glu Thr Ser Thr Ser Thr Leu Thr Leu Thr  
3590 3595 3600

Val Ser Pro Ala Val Ser Gly Leu Ser Ser Ala Ser Ile Thr Thr  
3605 3610 3615

Asp Lys Pro Gln Thr Val Thr Ser Trp Asn Thr Glu Thr Ser Pro  
3620 3625 3630

Ser Val Thr Ser Val Gly Pro Pro Glu Phe Ser Arg Thr Val Thr  
3635 3640 3645

Gly Thr Thr Met Thr Leu Ile Pro Ser Glu Met Pro Thr Pro Pro  
3650 3655 3660

Lys Thr Ser His Gly Glu Gly Val Ser Pro Thr Thr Ile Leu Arg  
3665 3670 3675

Thr Thr Met Val Glu Ala Thr Asn Leu Ala Thr Thr Gly Ser Ser  
3680 3685 3690

Pro Thr Val Ala Lys Thr Thr Thr Thr Phe Asn Thr Leu Ala Gly  
3695 3700 3705

Ser Leu Phe Thr Pro Leu Thr Thr Pro Gly Met Ser Thr Leu Ala  
3710 3715 3720

ES 2 697 327 T3

Ser Glu Ser Val Thr Ser Arg Thr Ser Tyr Asn His Arg Ser Trp  
 3725 3730 3735

Ile Ser Thr Thr Ser Ser Tyr Asn Arg Arg Tyr Trp Thr Pro Ala  
 3740 3745 3750

Thr Ser Thr Pro Val Thr Ser Thr Phe Ser Pro Gly Ile Ser Thr  
 3755 3760 3765

Ser Ser Ile Pro Ser Ser Thr Ala Ala Thr Val Pro Phe Met Val  
 3770 3775 3780

Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Glu Glu  
 3785 3790 3795

Asp Met Arg His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Ala Thr Glu Arg  
 3800 3805 3810

Glu Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu Phe Arg Asn Ser Ser Leu  
 3815 3820 3825

Glu Tyr Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Ala Ser Leu Arg Pro Glu  
 3830 3835 3840

Lys Asp Ser Ser Ala Thr Ala Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg  
 3845 3850 3855

Pro Asp Pro Glu Asp Leu Gly Leu Asp Arg Glu Arg Leu Tyr Trp  
 3860 3865 3870

Glu Leu Ser Asn Leu Thr Asn Gly Ile Gln Glu Leu Gly Pro Tyr  
 3875 3880 3885

Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg  
 3890 3895 3900

Ser Ser Met Pro Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser Thr Val Asp  
 3905 3910 3915

Val Gly Thr Ser Gly Thr Pro Ser Ser Ser Pro Ser Pro Thr Thr  
 3920 3925 3930

Ala Gly Pro Leu Leu Met Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr  
 3935 3940 3945

Asn Leu Gln Tyr Glu Glu Asp Met Arg Arg Thr Gly Ser Arg Lys  
 3950 3955 3960

Phe Asn Thr Met Glu Ser Val Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu  
 3965 3970 3975

Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu  
 3980 3985 3990

Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp  
 3995 4000 4005

Ala Ile Cys Thr His Arg Leu Asp Pro Lys Ser Pro Gly Leu Asn  
 4010 4015 4020

Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Lys Leu Thr Asn Asp Ile  
 4025 4030 4035

ES 2 697 327 T3

Glu Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val  
 4040 4045 4050  
 Asn Gly Phe Thr His Gln Ser Ser Val Ser Thr Thr Ser Thr Pro  
 4055 4060 4065  
 Gly Thr Ser Thr Val Asp Leu Arg Thr Ser Gly Thr Pro Ser Ser  
 4070 4075 4080  
 Leu Ser Ser Pro Thr Ile Met Ala Ala Gly Pro Leu Leu Val Pro  
 4085 4090 4095  
 Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Glu Asp  
 4100 4105 4110  
 Met Gly His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val  
 4115 4120 4125  
 Leu Gln Gly Leu Leu Gly Pro Ile Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly  
 4130 4135 4140  
 Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Ser Leu Arg Ser Glu Lys  
 4145 4150 4155  
 Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys Ile His His Leu  
 4160 4165 4170  
 Asp Pro Lys Ser Pro Gly Leu Asn Arg Glu Arg Leu Tyr Trp Glu  
 4175 4180 4185  
 Leu Ser Gln Leu Thr Asn Gly Ile Lys Glu Leu Gly Pro Tyr Thr  
 4190 4195 4200  
 Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Thr  
 4205 4210 4215  
 Ser Val Pro Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser Thr Val Asp Leu  
 4220 4225 4230  
 Gly Thr Ser Gly Thr Pro Phe Ser Leu Pro Ser Pro Ala Thr Ala  
 4235 4240 4245  
 Gly Pro Leu Leu Val Leu Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn  
 4250 4255 4260  
 Leu Lys Tyr Glu Glu Asp Met His Arg Pro Gly Ser Arg Lys Phe  
 4265 4270 4275  
 Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Thr Leu Val Gly Pro Met Phe  
 4280 4285 4290  
 Lys Asn Thr Ser Val Gly Leu Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr  
 4295 4300 4305  
 Leu Leu Arg Ser Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp Ala  
 4310 4315 4320  
 Ile Cys Thr His Arg Leu Asp Pro Lys Ser Pro Gly Val Asp Arg  
 4325 4330 4335  
 Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr Asn Gly Ile Lys  
 4340 4345 4350

ES 2 697 327 T3

Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn  
 4355 4360 4365  
 Gly Phe Thr His Trp Ile Pro Val Pro Thr Ser Ser Thr Pro Gly  
 4370 4375 4380  
 Thr Ser Thr Val Asp Leu Gly Ser Gly Thr Pro Ser Ser Leu Pro  
 4385 4390 4395  
 Ser Pro Thr Ser Ala Thr Ala Gly Pro Leu Leu Val Pro Phe Thr  
 4400 4405 4410  
 Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Lys Tyr Glu Glu Asp Met His  
 4415 4420 4425  
 Cys Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln  
 4430 4435 4440  
 Ser Leu Leu Gly Pro Met Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu  
 4445 4450 4455  
 Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Ser Glu Lys Asp Gly  
 4460 4465 4470  
 Ala Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg Leu Asp Pro  
 4475 4480 4485  
 Lys Ser Pro Gly Val Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser  
 4490 4495 4500  
 Gln Leu Thr Asn Gly Ile Lys Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp  
 4505 4510 4515  
 Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Gln Thr Ser Ala  
 4520 4525 4530  
 Pro Asn Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser Thr Val Asp Leu Gly Thr  
 4535 4540 4545  
 Ser Gly Thr Pro Ser Ser Leu Pro Ser Pro Thr Ser Ala Gly Pro  
 4550 4555 4560  
 Leu Leu Val Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln  
 4565 4570 4575  
 Tyr Glu Glu Asp Met His His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr  
 4580 4585 4590  
 Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Gly Pro Met Phe Lys Asn  
 4595 4600 4605  
 Thr Ser Val Gly Leu Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu  
 4610 4615 4620  
 Arg Pro Glu Lys Asn Gly Ala Ala Thr Gly Met Asp Ala Ile Cys  
 4625 4630 4635  
 Ser His Arg Leu Asp Pro Lys Ser Pro Gly Leu Asn Arg Glu Gln  
 4640 4645 4650  
 Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Gly Ile Lys Glu Leu  
 4655 4660 4665

ES 2 697 327 T3

Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe  
4670 4675 4680

Thr His Arg Ser Ser Val Ala Pro Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser  
4685 4690 4695

Thr Val Asp Leu Gly Thr Ser Gly Thr Pro Ser Ser Leu Pro Ser  
4700 4705 4710

Pro Thr Thr Ala Val Pro Leu Leu Val Pro Phe Thr Leu Asn Phe  
4715 4720 4725

Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Glu Asp Met Arg His Pro Gly  
4730 4735 4740

Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu  
4745 4750 4755

Gly Pro Leu Phe Lys Asn Ser Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly  
4760 4765 4770

Cys Arg Leu Ile Ser Leu Arg Ser Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr  
4775 4780 4785

Gly Val Asp Ala Ile Cys Thr His His Leu Asn Pro Gln Ser Pro  
4790 4795 4800

Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Gln Leu Ser Gln Met Thr  
4805 4810 4815

Asn Gly Ile Lys Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser  
4820 4825 4830

Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Ser Ser Gly Leu Thr Thr  
4835 4840 4845

Ser Thr Pro Trp Thr Ser Thr Val Asp Leu Gly Thr Ser Gly Thr  
4850 4855 4860

Pro Ser Pro Val Pro Ser Pro Thr Thr Ala Gly Pro Leu Leu Val  
4865 4870 4875

Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Glu Glu  
4880 4885 4890

Asp Met His Arg Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Ala Thr Glu Arg  
4895 4900 4905

Val Leu Gln Gly Leu Leu Ser Pro Ile Phe Lys Asn Ser Ser Val  
4910 4915 4920

Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Ser Leu Arg Pro Glu  
4925 4930 4935

Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Met Asp Ala Val Cys Leu Tyr His  
4940 4945 4950

Pro Asn Pro Lys Arg Pro Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp  
4955 4960 4965

Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Asn Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr  
4970 4975 4980

ES 2 697 327 T3

Ser Leu Asp Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Gln  
4985 4990 4995

Asn Ser Val Pro Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser Thr Val Tyr  
5000 5005 5010

Trp Ala Thr Thr Gly Thr Pro Ser Ser Phe Pro Gly His Thr Glu  
5015 5020 5025

Pro Gly Pro Leu Leu Ile Pro Phe Thr Phe Asn Phe Thr Ile Thr  
5030 5035 5040

Asn Leu His Tyr Glu Glu Asn Met Gln His Pro Gly Ser Arg Lys  
5045 5050 5055

Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu  
5060 5065 5070

Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu  
5075 5080 5085

Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Gln Glu Ala Ala Thr Gly Val Asp  
5090 5095 5100

Thr Ile Cys Thr His Arg Val Asp Pro Ile Gly Pro Gly Leu Asp  
5105 5110 5115

Arg Glu Arg Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr Asn Ser Ile  
5120 5125 5130

Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asp Ser Leu Tyr Val  
5135 5140 5145

Asn Gly Phe Asn Pro Trp Ser Ser Val Pro Thr Thr Ser Thr Pro  
5150 5155 5160

Gly Thr Ser Thr Val His Leu Ala Thr Ser Gly Thr Pro Ser Ser  
5165 5170 5175

Leu Pro Gly His Thr Ala Pro Val Pro Leu Leu Ile Pro Phe Thr  
5180 5185 5190

Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu His Tyr Glu Glu Asn Met Gln  
5195 5200 5205

His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln  
5210 5215 5220

Gly Leu Leu Lys Pro Leu Phe Lys Ser Thr Ser Val Gly Pro Leu  
5225 5230 5235

Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys His Gly  
5240 5245 5250

Ala Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys Thr Leu Arg Leu Asp Pro  
5255 5260 5265

Thr Gly Pro Gly Leu Asp Arg Glu Arg Leu Tyr Trp Glu Leu Ser  
5270 5275 5280

Gln Leu Thr Asn Ser Val Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp  
5285 5290 5295

ES 2 697 327 T3

Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Ser Ser Val  
5300 5305 5310

Pro Thr Thr Ser Ile Pro Gly Thr Ser Ala Val His Leu Glu Thr  
5315 5320 5325

Ser Gly Thr Pro Ala Ser Leu Pro Gly His Thr Ala Pro Gly Pro  
5330 5335 5340

Leu Leu Val Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln  
5345 5350 5355

Tyr Glu Glu Asp Met Arg His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr  
5360 5365 5370

Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu Phe Lys Ser  
5375 5380 5385

Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu  
5390 5395 5400

Arg Pro Glu Lys Arg Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp Thr Ile Cys  
5405 5410 5415

Thr His Arg Leu Asp Pro Leu Asn Pro Gly Leu Asp Arg Glu Gln  
5420 5425 5430

Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Lys Leu Thr Arg Gly Ile Ile Glu Leu  
5435 5440 5445

Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Arg Gly Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe  
5450 5455 5460

Thr His Arg Asn Phe Val Pro Ile Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser  
5465 5470 5475

Thr Val His Leu Gly Thr Ser Glu Thr Pro Ser Ser Leu Pro Arg  
5480 5485 5490

Pro Ile Val Pro Gly Pro Leu Leu Val Pro Phe Thr Leu Asn Phe  
5495 5500 5505

Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Glu Glu Ala Met Arg His Pro Gly  
5510 5515 5520

Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu  
5525 5530 5535

Arg Pro Leu Phe Lys Asn Thr Ser Ile Gly Pro Leu Tyr Ser Ser  
5540 5545 5550

Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Asp Lys Ala Ala Thr  
5555 5560 5565

Arg Val Asp Ala Ile Cys Thr His His Pro Asp Pro Gln Ser Pro  
5570 5575 5580

Gly Leu Asn Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr  
5585 5590 5595

His Gly Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asp Ser  
5600 5605 5610

ES 2 697 327 T3

Leu Tyr Val Asp Gly Phe Thr His Trp Ser Pro Ile Pro Thr Thr  
 5615 5620 5625  
 Ser Thr Pro Gly Thr Ser Ile Val Asn Leu Gly Thr Ser Gly Ile  
 5630 5635 5640  
 Pro Pro Ser Leu Pro Glu Thr Thr Ala Thr Gly Pro Leu Leu Val  
 5645 5650 5655  
 Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Glu Glu  
 5660 5665 5670  
 Asn Met Gly His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Ile Thr Glu Ser  
 5675 5680 5685  
 Val Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu Phe Lys Ser Thr Ser Val  
 5690 5695 5700  
 Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu  
 5705 5710 5715  
 Lys Asp Gly Val Ala Thr Arg Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg  
 5720 5725 5730  
 Pro Asp Pro Lys Ile Pro Gly Leu Asp Arg Gln Gln Leu Tyr Trp  
 5735 5740 5745  
 Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Ser Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr  
 5750 5755 5760  
 Thr Leu Asp Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr Gln Arg  
 5765 5770 5775  
 Ser Ser Val Pro Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Phe Thr Val Gln  
 5780 5785 5790  
 Pro Glu Thr Ser Glu Thr Pro Ser Ser Leu Pro Gly Pro Thr Ala  
 5795 5800 5805  
 Thr Gly Pro Val Leu Leu Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Ile  
 5810 5815 5820  
 Asn Leu Gln Tyr Glu Glu Asp Met His Arg Pro Gly Ser Arg Lys  
 5825 5830 5835  
 Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Met Pro Leu  
 5840 5845 5850  
 Phe Lys Asn Thr Ser Val Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu  
 5855 5860 5865  
 Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr Arg Val Asp  
 5870 5875 5880  
 Ala Val Cys Thr His Arg Pro Asp Pro Lys Ser Pro Gly Leu Asp  
 5885 5890 5895  
 Arg Glu Arg Leu Tyr Trp Lys Leu Ser Gln Leu Thr His Gly Ile  
 5900 5905 5910  
 Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg His Ser Leu Tyr Val  
 5915 5920 5925



ES 2 697 327 T3

Asn Gly Phe Thr His Gln Ser Ser Met Thr Thr Thr Arg Thr Pro  
 5930 5935 5940  
 Asp Thr Ser Thr Met His Leu Ala Thr Ser Arg Thr Pro Ala Ser  
 5945 5950 5955  
 Leu Ser Gly Pro Thr Thr Ala Ser Pro Leu Leu Val Leu Phe Thr  
 5960 5965 5970  
 Ile Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Arg Tyr Glu Glu Asn Met His  
 5975 5980 5985  
 His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln  
 5990 5995 6000  
 Gly Leu Leu Arg Pro Val Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu  
 6005 6010 6015  
 Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Lys Lys Asp Gly  
 6020 6025 6030  
 Ala Ala Thr Lys Val Asp Ala Ile Cys Thr Tyr Arg Pro Asp Pro  
 6035 6040 6045  
 Lys Ser Pro Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser  
 6050 6055 6060  
 Gln Leu Thr His Ser Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp  
 6065 6070 6075  
 Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr Gln Arg Ser Ser Val  
 6080 6085 6090  
 Pro Thr Thr Ser Ile Pro Gly Thr Pro Thr Val Asp Leu Gly Thr  
 6095 6100 6105  
 Ser Gly Thr Pro Val Ser Lys Pro Gly Pro Ser Ala Ala Ser Pro  
 6110 6115 6120  
 Leu Leu Val Leu Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Arg  
 6125 6130 6135  
 Tyr Glu Glu Asn Met Gln His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr  
 6140 6145 6150  
 Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Arg Ser Leu Phe Lys Ser  
 6155 6160 6165  
 Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu  
 6170 6175 6180  
 Arg Pro Glu Lys Asp Gly Thr Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys  
 6185 6190 6195  
 Thr His His Pro Asp Pro Lys Ser Pro Arg Leu Asp Arg Glu Gln  
 6200 6205 6210  
 Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Asn Ile Thr Glu Leu  
 6215 6220 6225  
 Gly Pro Tyr Ala Leu Asp Asn Asp Ser Leu Phe Val Asn Gly Phe  
 6230 6235 6240

ES 2 697 327 T3

Thr His Arg Ser Ser Val Ser Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Pro  
 6245 6250 6255  
 Thr Val Tyr Leu Gly Ala Ser Lys Thr Pro Ala Ser Ile Phe Gly  
 6260 6265 6270  
 Pro Ser Ala Ala Ser His Leu Leu Ile Leu Phe Thr Leu Asn Phe  
 6275 6280 6285  
 Thr Ile Thr Asn Leu Arg Tyr Glu Glu Asn Met Trp Pro Gly Ser  
 6290 6295 6300  
 Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Arg  
 6305 6310 6315  
 Pro Leu Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys  
 6320 6325 6330  
 Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Glu Ala Thr Gly  
 6335 6340 6345  
 Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg Pro Asp Pro Thr Gly Pro Gly  
 6350 6355 6360  
 Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Thr His  
 6365 6370 6375  
 Ser Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asp Ser Leu  
 6380 6385 6390  
 Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Ser Ser Val Pro Thr Thr Ser  
 6395 6400 6405  
 Thr Gly Val Val Ser Glu Glu Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile  
 6410 6415 6420  
 Asn Asn Leu Arg Tyr Met Ala Asp Met Gly Gln Pro Gly Ser Leu  
 6425 6430 6435  
 Lys Phe Asn Ile Thr Asp Asn Val Met Gln His Leu Leu Ser Pro  
 6440 6445 6450  
 Leu Phe Gln Arg Ser Ser Leu Gly Ala Arg Tyr Thr Gly Cys Arg  
 6455 6460 6465  
 Val Ile Ala Leu Arg Ser Val Lys Asn Gly Ala Glu Thr Arg Val  
 6470 6475 6480  
 Asp Leu Leu Cys Thr Tyr Leu Gln Pro Leu Ser Gly Pro Gly Leu  
 6485 6490 6495  
 Pro Ile Lys Gln Val Phe His Glu Leu Ser Gln Gln Thr His Gly  
 6500 6505 6510  
 Ile Thr Arg Leu Gly Pro Tyr Ser Leu Asp Lys Asp Ser Leu Tyr  
 6515 6520 6525  
 Leu Asn Gly Tyr Asn Glu Pro Gly Pro Asp Glu Pro Pro Thr Thr  
 6530 6535 6540  
 Pro Lys Pro Ala Thr Thr Phe Leu Pro Pro Leu Ser Glu Ala Thr  
 6545 6550 6555

ES 2 697 327 T3

Thr Ala Met Gly Tyr His Leu Lys Thr Leu Thr Leu Asn Phe Thr  
 6560 6565 6570  
 Ile Ser Asn Leu Gln Tyr Ser Pro Asp Met Gly Lys Gly Ser Ala  
 6575 6580 6585  
 Thr Phe Asn Ser Thr Glu Gly Val Leu Gln His Leu Leu Arg Pro  
 6590 6595 6600  
 Leu Phe Gln Lys Ser Ser Met Gly Pro Phe Tyr Leu Gly Cys Gln  
 6605 6610 6615  
 Leu Ile Ser Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val  
 6620 6625 6630  
 Asp Thr Thr Cys Thr Tyr His Pro Asp Pro Val Gly Pro Gly Leu  
 6635 6640 6645  
 Asp Ile Gln Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Gly  
 6650 6655 6660  
 Val Thr Gln Leu Gly Phe Tyr Val Leu Asp Arg Asp Ser Leu Phe  
 6665 6670 6675  
 Ile Asn Gly Tyr Ala Pro Gln Asn Leu Ser Ile Arg Gly Glu Tyr  
 6680 6685 6690  
 Gln Ile Asn Phe His Ile Val Asn Trp Asn Leu Ser Asn Pro Asp  
 6695 6700 6705  
 Pro Thr Ser Ser Glu Tyr Ile Thr Leu Leu Arg Asp Ile Gln Asp  
 6710 6715 6720  
 Lys Val Thr Thr Leu Tyr Lys Gly Ser Gln Leu His Asp Thr Phe  
 6725 6730 6735  
 Arg Phe Cys Leu Val Thr Asn Leu Thr Met Asp Ser Val Leu Val  
 6740 6745 6750  
 Thr Val Lys Ala Leu Phe Ser Ser Asn Leu Asp Pro Ser Leu Val  
 6755 6760 6765  
 Glu Gln Val Phe Leu Asp Lys Thr Leu Asn Ala Ser Phe His Trp  
 6770 6775 6780  
 Leu Gly Ser Thr Tyr Gln Leu Val Asp Ile His Val Thr Glu Met  
 6785 6790 6795  
 Glu Ser Ser Val Tyr Gln Pro Thr Ser Ser Ser Ser Thr Gln His  
 6800 6805 6810  
 Phe Tyr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Pro Tyr Ser Gln Asp  
 6815 6820 6825  
 Lys Ala Gln Pro Gly Thr Thr Asn Tyr Gln Arg Asn Lys Arg Asn  
 6830 6835 6840  
 Ile Glu Asp Ala Leu Asn Gln Leu Phe Arg Asn Ser Ser Ile Lys  
 6845 6850 6855  
 Ser Tyr Phe Ser Asp Cys Gln Val Ser Thr Phe Arg Ser Val Pro  
 6860 6865 6870

ES 2 697 327 T3

Asn Arg His His Thr Gly Val Asp Ser Leu Cys Asn Phe Ser Pro  
 6875 6880 6885

Leu Ala Arg Arg Val Asp Arg Val Ala Ile Tyr Glu Glu Phe Leu  
 6890 6895 6900

Arg Met Thr Arg Asn Gly Thr Gln Leu Gln Asn Phe Thr Leu Asp  
 6905 6910 6915

Arg Ser Ser Val Leu Val Asp Gly Tyr Ser Pro Asn Arg Asn Glu  
 6920 6925 6930

Pro Leu Thr Gly Asn Ser Asp Leu Pro Phe Trp Ala Val Ile Leu  
 6935 6940 6945

Ile Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Leu Ile Thr Cys Leu Ile Cys  
 6950 6955 6960

Gly Val Leu Val Thr Thr Arg Arg Arg Lys Lys Glu Gly Glu Tyr  
 6965 6970 6975

Asn Val Gln Gln Gln Cys Pro Gly Tyr Tyr Gln Ser His Leu Asp  
 6980 6985 6990

Leu Glu Asp Leu Gln  
 6995

<210> 5  
 <211> 622  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr  
 1 5 10 15

Pro Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp  
 20 25 30

Val Gln Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala  
 35 40 45

Ala Pro Leu Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser  
 50 55 60

Leu Ser Pro Arg Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser  
 65 70 75

Gly Leu Ser Thr Glu Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala  
 80 85 90

Gln Lys Asn Val Lys Leu Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala  
 95 100 105

His Arg Leu Ser Glu Pro Pro Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu  
 110 115 120

Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln  
 125 130 135

Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile Thr Lys Ala Asn Val Asp  
 140 145 150

ES 2 697 327 T3

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

ES 2 697 327 T3

Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala  
 470 475 480

Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys  
 485 490 495

Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala  
 500 505 510

Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys  
 515 520 525

Leu Arg Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln  
 530 535 540

Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg  
 545 550 555

His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp  
 560 565 570

Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly  
 575 580 585

Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr  
 590 595 600

Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro Val Leu Thr Val Leu Ala Leu  
 605 610 615

Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala  
 620

<210> 6  
 <211> 690  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

Met Ala Pro Trp Pro Glu Leu Gly Asp Ala Gln Pro Asn Pro Asp  
 1 5 10 15

Lys Tyr Leu Glu Gly Ala Ala Gly Gln Gln Pro Thr Ala Pro Asp  
 20 25 30

Lys Ser Lys Glu Thr Asn Lys Thr Asp Asn Thr Glu Ala Pro Val  
 35 40 45

Thr Lys Ile Glu Leu Leu Pro Ser Tyr Ser Thr Ala Thr Leu Ile  
 50 55 60

Asp Glu Pro Thr Glu Val Asp Asp Pro Trp Asn Leu Pro Thr Leu  
 65 70 75

Gln Asp Ser Gly Ile Lys Trp Ser Glu Arg Asp Thr Lys Gly Lys  
 80 85 90

Ile Leu Cys Phe Phe Gln Gly Ile Gly Arg Leu Ile Leu Leu Leu  
 95 100 105

Gly Phe Leu Tyr Phe Phe Val Cys Ser Leu Asp Ile Leu Ser Ser  
 110 115 120

ES 2 697 327 T3

Ala Phe Gln Leu Val Gly Gly Lys Met Ala Gly Gln Phe Phe Ser  
125 130 135

Asn Ser Ser Ile Met Ser Asn Pro Leu Leu Gly Leu Val Ile Gly  
140 145 150

Val Leu Val Thr Val Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ser  
155 160 165

Ile Val Val Ser Met Val Ser Ser Ser Leu Leu Thr Val Arg Ala  
170 175 180

Ala Ile Pro Ile Ile Met Gly Ala Asn Ile Gly Thr Ser Ile Thr  
185 190 195

Asn Thr Ile Val Ala Leu Met Gln Val Gly Asp Arg Ser Glu Phe  
200 205 210

Arg Arg Ala Phe Ala Gly Ala Thr Val His Asp Phe Phe Asn Trp  
215 220 225

Leu Ser Val Leu Val Leu Leu Pro Val Glu Val Ala Thr His Tyr  
230 235 240

Leu Glu Ile Ile Thr Gln Leu Ile Val Glu Ser Phe His Phe Lys  
245 250 255

Asn Gly Glu Asp Ala Pro Asp Leu Leu Lys Val Ile Thr Lys Pro  
260 265 270

Phe Thr Lys Leu Ile Val Gln Leu Asp Lys Lys Val Ile Ser Gln  
275 280 285

Ile Ala Met Asn Asp Glu Lys Ala Lys Asn Lys Ser Leu Val Lys  
290 295 300

Ile Trp Cys Lys Thr Phe Thr Asn Lys Thr Gln Ile Asn Val Thr  
305 310 315

Val Pro Ser Thr Ala Asn Cys Thr Ser Pro Ser Leu Cys Trp Thr  
320 325 330

Asp Gly Ile Gln Asn Trp Thr Met Lys Asn Val Thr Tyr Lys Glu  
335 340 345

Asn Ile Ala Lys Cys Gln His Ile Phe Val Asn Phe His Leu Pro  
350 355 360

Asp Leu Ala Val Gly Thr Ile Leu Leu Ile Leu Ser Leu Leu Val  
365 370 375

Leu Cys Gly Cys Leu Ile Met Ile Val Lys Ile Leu Gly Ser Val  
380 385 390

Leu Lys Gly Gln Val Ala Thr Val Ile Lys Lys Thr Ile Asn Thr  
395 400 405

Asp Phe Pro Phe Pro Phe Ala Trp Leu Thr Gly Tyr Leu Ala Ile  
410 415 420

Leu Val Gly Ala Gly Met Thr Phe Ile Val Gln Ser Ser Ser Val  
425 430 435

ES 2 697 327 T3

Phe	Thr	Ser	Ala	Leu	Thr	Pro	Leu	Ile	Gly	Ile	Gly	Val	Ile	Thr
				440					445					450
Ile	Glu	Arg	Ala	Tyr	Pro	Leu	Thr	Leu	Gly	Ser	Asn	Ile	Gly	Thr
				455					460					465
Thr	Thr	Thr	Ala	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Ser	Pro	Gly	Asn	Ala
				470					475					480
Leu	Arg	Ser	Ser	Leu	Gln	Ile	Ala	Leu	Cys	His	Phe	Phe	Phe	Asn
				485					490					495
Ile	Ser	Gly	Ile	Leu	Leu	Trp	Tyr	Pro	Ile	Pro	Phe	Thr	Arg	Leu
				500					505					510
Pro	Ile	Arg	Met	Ala	Lys	Gly	Leu	Gly	Asn	Ile	Ser	Ala	Lys	Tyr
				515					520					525
Arg	Trp	Phe	Ala	Val	Phe	Tyr	Leu	Ile	Ile	Phe	Phe	Phe	Leu	Ile
				530					535					540
Pro	Leu	Thr	Val	Phe	Gly	Leu	Ser	Leu	Ala	Gly	Trp	Arg	Val	Leu
				545					550					555
Val	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Val	Val	Phe	Ile	Ile	Ile	Leu	Val	Leu
				560					565					570
Cys	Leu	Arg	Leu	Leu	Gln	Ser	Arg	Cys	Pro	Arg	Val	Leu	Pro	Lys
				575					580					585
Lys	Leu	Gln	Asn	Trp	Asn	Phe	Leu	Pro	Leu	Trp	Met	Arg	Ser	Leu
				590					595					600
Lys	Pro	Trp	Asp	Ala	Val	Val	Ser	Lys	Phe	Thr	Gly	Cys	Phe	Gln
				605					610					615
Met	Arg	Cys	Cys	Tyr	Cys	Cys	Arg	Val	Cys	Cys	Arg	Ala	Cys	Cys
				620					625					630
Leu	Leu	Cys	Gly	Cys	Pro	Lys	Cys	Cys	Arg	Cys	Ser	Lys	Cys	Cys
				635					640					645
Glu	Asp	Leu	Glu	Glu	Ala	Gln	Glu	Gly	Gln	Asp	Val	Pro	Val	Lys
				650					655					660
Ala	Pro	Glu	Thr	Phe	Asp	Asn	Ile	Thr	Ile	Ser	Arg	Glu	Ala	Gln
				665					670					675
Gly	Glu	Val	Pro	Ala	Ser	Asp	Ser	Lys	Thr	Glu	Cys	Thr	Ala	Leu
				680					685					690

<210> 7  
 <211> 1093  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 7

5



ES 2 697 327 T3

Met Val Leu Ala Gly Pro Leu Ala Val Ser Leu Leu Leu Pro Ser  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Leu Val Ser His Leu Ser Ser Ser Gln Asp Val Ser  
20 25 30

Ser Glu Pro Ser Ser Glu Gln Gln Leu Cys Ala Leu Ser Lys His  
35 40 45

Pro Thr Val Ala Phe Glu Asp Leu Gln Pro Trp Val Ser Asn Phe  
50 55 60

Thr Tyr Pro Gly Ala Arg Asp Phe Ser Gln Leu Ala Leu Asp Pro  
65 70 75

Ser Gly Asn Gln Leu Ile Val Gly Ala Arg Asn Tyr Leu Phe Arg  
80 85 90

Leu Ser Leu Ala Asn Val Ser Leu Leu Gln Ala Thr Glu Trp Ala  
95 100 105

Ser Ser Glu Asp Thr Arg Arg Ser Cys Gln Ser Lys Gly Lys Thr  
110 115 120

Glu Glu Glu Cys Gln Asn Tyr Val Arg Val Leu Ile Val Ala Gly  
125 130 135

Arg Lys Val Phe Met Cys Gly Thr Asn Ala Phe Ser Pro Met Cys  
140 145 150

Thr Ser Arg Gln Val Gly Asn Leu Ser Arg Thr Thr Glu Lys Ile  
155 160 165

Asn Gly Val Ala Arg Cys Pro Tyr Asp Pro Arg His Asn Ser Thr  
170 175 180

Ala Val Ile Ser Ser Gln Gly Glu Leu Tyr Ala Ala Thr Val Ile  
185 190 195

Asp Phe Ser Gly Arg Asp Pro Ala Ile Tyr Arg Ser Leu Gly Ser  
200 205 210

Gly Pro Pro Leu Arg Thr Ala Gln Tyr Asn Ser Lys Trp Leu Asn  
215 220 225

Glu Pro Asn Phe Val Ala Ala Tyr Asp Ile Gly Leu Phe Ala Tyr  
230 235 240

Phe Phe Leu Arg Glu Asn Ala Val Glu His Asp Cys Gly Arg Thr  
245 250 255

Val Tyr Ser Arg Val Ala Arg Val Cys Lys Asn Asp Val Gly Gly  
260 265 270

Arg Phe Leu Leu Glu Asp Thr Trp Thr Thr Phe Met Lys Ala Arg  
275 280 285

Leu Asn Cys Ser Arg Pro Gly Glu Val Pro Phe Tyr Tyr Asn Glu  
290 295 300

Leu Gln Ser Ala Phe His Leu Pro Glu Gln Asp Leu Ile Tyr Gly  
305 310 315

Val Phe Thr Thr Asn Val Asn Ser Ile Ala Ala Ser Ala Val Cys  
320 325 330

Ala Phe Asn Leu Ser Ala Ile Ser Gln Ala Phe Asn Gly Pro Phe  
335 340 345

ES 2 697 327 T3

Arg Tyr Gln Glu Asn Pro Arg Ala Ala Trp Leu Pro Ile Ala Asn  
 350 355 360  
 Pro Ile Pro Asn Phe Gln Cys Gly Thr Leu Pro Glu Thr Gly Pro  
 365 370 375  
 Asn Glu Asn Leu Thr Glu Arg Ser Leu Gln Asp Ala Gln Arg Leu  
 380 385 390  
 Phe Leu Met Ser Glu Ala Val Gln Pro Val Thr Pro Glu Pro Cys  
 395 400 405  
 Val Thr Gln Asp Ser Val Arg Phe Ser His Leu Val Val Asp Leu  
 410 415 420  
 Val Gln Ala Lys Asp Thr Leu Tyr His Val Leu Tyr Ile Gly Thr  
 425 430 435  
 Glu Ser Gly Thr Ile Leu Lys Ala Leu Ser Thr Ala Ser Arg Ser  
 440 445 450  
 Leu His Gly Cys Tyr Leu Glu Glu Leu His Val Leu Pro Pro Gly  
 455 460 465  
 Arg Arg Glu Pro Leu Arg Ser Leu Arg Ile Leu His Ser Ala Arg  
 470 475 480  
 Ala Leu Phe Val Gly Leu Arg Asp Gly Val Leu Arg Val Pro Leu  
 485 490 495  
 Glu Arg Cys Ala Ala Tyr Arg Ser Gln Gly Ala Cys Leu Gly Ala  
 500 505 510  
 Arg Asp Pro Tyr Cys Gly Trp Asp Gly Lys Gln Gln Arg Cys Ser  
 515 520 525  
 Thr Leu Glu Asp Ser Ser Asn Met Ser Leu Trp Thr Gln Asn Ile  
 530 535 540  
 Thr Ala Cys Pro Val Arg Asn Val Thr Arg Asp Gly Gly Phe Gly  
 545 550 555  
 Pro Trp Ser Pro Trp Gln Pro Cys Glu His Leu Asp Gly Asp Asn  
 560 565 570  
 Ser Gly Ser Cys Leu Cys Arg Ala Arg Ser Cys Asp Ser Pro Arg  
 575 580 585  
 Pro Arg Cys Gly Gly Leu Asp Cys Leu Gly Pro Ala Ile His Ile  
 590 595 600  
 Ala Asn Cys Ser Arg Asn Gly Ala Trp Thr Pro Trp Ser Ser Trp  
 605 610 615  
 Ala Leu Cys Ser Thr Ser Cys Gly Ile Gly Phe Gln Val Arg Gln  
 620 625 630  
 Arg Ser Cys Ser Asn Pro Ala Pro Arg His Gly Gly Arg Ile Cys  
 635 640 645  
 Val Gly Lys Ser Arg Glu Glu Arg Phe Cys Asn Glu Asn Thr Pro  
 650 655 660

ES 2 697 327 T3

Cys Pro Val Pro Ile Phe Trp Ala Ser Trp Gly Ser Trp Ser Lys  
 665 670 675  
 Cys Ser Ser Asn Cys Gly Gly Gly Met Gln Ser Arg Arg Arg Ala  
 680 685 690  
 Cys Glu Asn Gly Asn Ser Cys Leu Gly Cys Gly Val Glu Phe Lys  
 695 700 705  
 Thr Cys Asn Pro Glu Gly Cys Pro Glu Val Arg Arg Asn Thr Pro  
 710 715 720  
 Trp Thr Pro Trp Leu Pro Val Asn Val Thr Gln Gly Gly Ala Arg  
 725 730 735  
 Gln Glu Gln Arg Phe Arg Phe Thr Cys Arg Ala Pro Leu Ala Asp  
 740 745 750  
 Pro His Gly Leu Gln Phe Gly Arg Arg Arg Thr Glu Thr Arg Thr  
 755 760 765  
 Cys Pro Ala Asp Gly Ser Gly Ser Cys Asp Thr Asp Ala Leu Val  
 770 775 780  
 Glu Asp Leu Leu Arg Ser Gly Ser Thr Ser Pro His Thr Val Ser  
 785 790 795  
 Gly Gly Trp Ala Ala Trp Gly Pro Trp Ser Ser Cys Ser Arg Asp  
 800 805 810  
 Cys Glu Leu Gly Phe Arg Val Arg Lys Arg Thr Cys Thr Asn Pro  
 815 820 825  
 Glu Pro Arg Asn Gly Gly Leu Pro Cys Val Gly Asp Ala Ala Glu  
 830 835 840  
 Tyr Gln Asp Cys Asn Pro Gln Ala Cys Pro Val Arg Gly Ala Trp  
 845 850 855  
 Ser Cys Trp Thr Ser Trp Ser Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Gly  
 860 865 870  
 Gly His Tyr Gln Arg Thr Arg Ser Cys Thr Ser Pro Ala Pro Ser  
 875 880 885  
 Pro Gly Glu Asp Ile Cys Leu Gly Leu His Thr Glu Glu Ala Leu  
 890 895 900  
 Cys Ala Thr Gln Ala Cys Pro Glu Gly Trp Ser Pro Trp Ser Glu  
 905 910 915  
 Trp Ser Lys Cys Thr Asp Asp Gly Ala Gln Ser Arg Ser Arg His  
 920 925 930  
 Cys Glu Glu Leu Leu Pro Gly Ser Ser Ala Cys Ala Gly Asn Ser  
 935 940 945  
 Ser Gln Ser Arg Pro Cys Pro Tyr Ser Glu Ile Pro Val Ile Leu  
 950 955 960  
 Pro Ala Ser Ser Met Glu Glu Ala Thr Gly Cys Ala Gly Phe Asn  
 965 970 975

ES 2 697 327 T3

Leu Ile His Leu Val Ala Thr Gly Ile Ser Cys Phe Leu Gly Ser  
 980 985 990

Gly Leu Leu Thr Leu Ala Val Tyr Leu Ser Cys Gln His Cys Gln  
 995 1000 1005

Arg Gln Ser Gln Glu Ser Thr Leu Val His Pro Ala Thr Pro Asn  
 1010 1015 1020

His Leu His Tyr Lys Gly Gly Gly Thr Pro Lys Asn Glu Lys Tyr  
 1025 1030 1035

Thr Pro Met Glu Phe Lys Thr Leu Asn Lys Asn Asn Leu Ile Pro  
 1040 1045 1050

Asp Asp Arg Ala Asn Phe Tyr Pro Leu Gln Gln Thr Asn Val Tyr  
 1055 1060 1065

Thr Thr Thr Tyr Tyr Pro Ser Pro Leu Asn Lys His Ser Phe Arg  
 1070 1075 1080

Pro Glu Ala Ser Pro Gly Gln Arg Cys Phe Pro Asn Ser  
 1085 1090

<210> 8  
 <211> 141  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 8

Met Trp Val Leu Gly Ile Ala Ala Thr Phe Cys Gly Leu Phe Leu  
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Phe Ala Leu Gln Ile Gln Cys Tyr Gln Cys Glu Glu  
 20 25 30

Phe Gln Leu Asn Asn Asp Cys Ser Ser Pro Glu Phe Ile Val Asn  
 35 40 45

Cys Thr Val Asn Val Gln Asp Met Cys Gln Lys Glu Val Met Glu  
 50 55 60

Gln Ser Ala Gly Ile Met Tyr Arg Lys Ser Cys Ala Ser Ser Ala  
 65 70 75

Ala Cys Leu Ile Ala Ser Ala Gly Tyr Gln Ser Phe Cys Ser Pro  
 80 85 90

Gly Lys Leu Asn Ser Val Cys Ile Ser Cys Cys Asn Thr Pro Leu  
 95 100 105

Cys Asn Gly Pro Arg Pro Lys Lys Arg Gly Ser Ser Ala Ser Ala  
 110 115 120

Leu Arg Pro Gly Leu Arg Thr Thr Ile Leu Phe Leu Lys Leu Ala  
 125 130 135

Leu Phe Ser Ala His Cys  
 140

10

<210> 9



ES 2 697 327 T3

Leu Arg Lys Lys Ser Gly Met Gln Ile Ala Leu Asn Asp His Leu  
 305 310 315  
 Lys Gln Arg Arg Glu Val Ala Lys Thr Val Phe Cys Leu Val Leu  
 320 325 330  
 Val Phe Ala Leu Cys Trp Leu Pro Leu His Leu Ser Arg Ile Leu  
 335 340 345  
 Lys Leu Thr Leu Tyr Asn Gln Asn Asp Pro Asn Arg Cys Glu Leu  
 350 355 360  
 Leu Ser Phe Leu Leu Val Leu Asp Tyr Ile Gly Ile Asn Met Ala  
 365 370 375  
 Ser Leu Asn Ser Cys Ile Asn Pro Ile Ala Leu Tyr Leu Val Ser  
 380 385 390  
 Lys Arg Phe Lys Asn Cys Phe Lys Ser Cys Leu Cys Cys Trp Cys  
 395 400 405  
 Gln Ser Phe Glu Glu Lys Gln Ser Leu Glu Glu Lys Gln Ser Cys  
 410 415 420  
 Leu Lys Phe Lys Ala Asn Asp His Gly Tyr Asp Asn Phe Arg Ser  
 425 430 435  
 Ser Asn Lys Tyr Ser Ser Ser  
 440

<210> 10  
 <211> 783  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 10

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

10

ES 2 697 327 T3

Ala Val Leu Phe Asp Ile Thr Glu Asp Arg Ala Ala Ala Glu Gln  
140 145 150

Leu Gln Gln Pro Leu Gly Leu Thr Trp Pro Val Val Leu Ile Trp  
155 160 165

Gly Asn Asp Ala Glu Lys Leu Met Glu Phe Val Tyr Lys Asn Gln  
170 175 180

Lys Ala His Val Arg Ile Glu Leu Lys Glu Pro Pro Ala Trp Pro  
185 190 195

Asp Tyr Asp Val Trp Ile Leu Met Thr Val Val Gly Thr Ile Phe  
200 205 210

Val Ile Ile Leu Ala Ser Val Leu Arg Ile Arg Cys Arg Pro Arg  
215 220 225

His Ser Arg Pro Asp Pro Leu Gln Gln Arg Thr Ala Trp Ala Ile  
230 235 240

Ser Gln Leu Ala Thr Arg Arg Tyr Gln Ala Ser Cys Arg Gln Ala  
245 250 255

Arg Gly Glu Trp Pro Asp Ser Gly Ser Ser Cys Ser Ser Ala Pro  
260 265 270

Val Cys Ala Ile Cys Leu Glu Glu Phe Ser Glu Gly Gln Glu Leu  
275 280 285

Arg Val Ile Ser Cys Leu His Glu Phe His Arg Asn Cys Val Asp  
290 295 300

Pro Trp Leu His Gln His Arg Thr Cys Pro Leu Cys Val Phe Asn  
305 310 315

Ile Thr Glu Gly Asp Ser Phe Ser Gln Ser Leu Gly Pro Ser Arg  
320 325 330

Ser Tyr Gln Glu Pro Gly Arg Arg Leu His Leu Ile Arg Gln His  
335 340 345

Pro Gly His Ala His Tyr His Leu Pro Ala Ala Tyr Leu Leu Gly  
350 355 360

Pro Ser Arg Ser Ala Val Ala Arg Pro Pro Arg Pro Gly Pro Phe  
365 370 375

Leu Pro Ser Gln Glu Pro Gly Met Gly Pro Arg His His Arg Phe  
380 385 390

Pro Arg Ala Ala His Pro Arg Ala Pro Gly Glu Gln Gln Arg Leu  
395 400 405

Ala Gly Ala Gln His Pro Tyr Ala Gln Gly Trp Gly Met Ser His  
410 415 420

Leu Gln Ser Thr Ser Gln His Pro Ala Ala Cys Pro Val Pro Leu  
425 430 435

Arg Arg Ala Arg Pro Pro Asp Ser Ser Gly Ser Gly Glu Ser Tyr  
440 445 450

ES 2 697 327 T3

Cys Thr Glu Arg Ser Gly Tyr Leu Ala Asp Gly Pro Ala Ser Asp  
 455 460 465  
 Ser Ser Ser Gly Pro Cys His Gly Ser Ser Ser Asp Ser Val Val  
 470 475 480  
 Asn Cys Thr Asp Ile Ser Leu Gln Gly Val His Gly Ser Ser Ser  
 485 490 495  
 Thr Phe Cys Ser Ser Leu Ser Ser Asp Phe Asp Pro Leu Val Tyr  
 500 505 510  
 Cys Ser Pro Lys Gly Asp Pro Gln Arg Val Asp Met Gln Pro Ser  
 515 520 525  
 Val Thr Ser Arg Pro Arg Ser Leu Asp Ser Val Val Pro Thr Gly  
 530 535 540  
 Glu Thr Gln Val Ser Ser His Val His Tyr His Arg His Arg His  
 545 550 555  
 His His Tyr Lys Lys Arg Phe Gln Trp His Gly Arg Lys Pro Gly  
 560 565 570  
 Pro Glu Thr Gly Val Pro Gln Ser Arg Pro Pro Ile Pro Arg Thr  
 575 580 585  
 Gln Pro Gln Pro Glu Pro Pro Ser Pro Asp Gln Gln Val Thr Gly  
 590 595 600  
 Ser Asn Ser Ala Ala Pro Ser Gly Arg Leu Ser Asn Pro Gln Cys  
 605 610 615  
 Pro Arg Ala Leu Pro Glu Pro Ala Pro Gly Pro Val Asp Ala Ser  
 620 625 630  
 Ser Ile Cys Pro Ser Thr Ser Ser Leu Phe Asn Leu Gln Lys Ser  
 635 640 645  
 Ser Leu Ser Ala Arg His Pro Gln Arg Lys Arg Arg Gly Gly Pro  
 650 655 660  
 Ser Glu Pro Thr Pro Gly Ser Arg Pro Gln Asp Ala Thr Val His  
 665 670 675  
 Pro Ala Cys Gln Ile Phe Pro His Tyr Thr Pro Ser Val Ala Tyr  
 680 685 690  
 Pro Trp Ser Pro Glu Ala His Pro Leu Ile Cys Gly Pro Pro Gly  
 695 700 705  
 Leu Asp Lys Arg Leu Leu Pro Glu Thr Pro Gly Pro Cys Tyr Ser  
 710 715 720  
 Asn Ser Gln Pro Val Trp Leu Cys Leu Thr Pro Arg Gln Pro Leu  
 725 730 735  
 Glu Pro His Pro Pro Gly Glu Gly Pro Ser Glu Trp Ser Ser Asp  
 740 745 750  
 Thr Ala Glu Gly Arg Pro Cys Pro Tyr Pro His Cys Gln Val Leu  
 755 760 765



ES 2 697 327 T3

Ser Ala Gln Pro Gly Ser Glu Glu Glu Leu Glu Glu Leu Cys Glu  
 770 775 780

Gln Ala Val

<210> 11  
 <211> 490  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 11

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

ES 2 697 327 T3

```

Asn Lys Thr Leu Pro Ile Val Ala Ile Thr Leu Leu Ser Leu Val
    260                               265                               270

Tyr Leu Ala Gly Leu Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Leu Tyr Tyr Gly
    275                               280                               285

Thr Lys Tyr Arg Arg Phe Pro Pro Trp Leu Glu Thr Trp Leu Gln
    290                               295                               300

Cys Arg Lys Gln Leu Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Met Val
    305                               310                               315

His Val Ala Tyr Ser Leu Cys Leu Pro Met Arg Arg Ser Glu Arg
    320                               325                               330

Tyr Leu Phe Leu Asn Met Ala Tyr Gln Gln Val His Ala Asn Ile
    335                               340                               345

Glu Asn Ser Trp Asn Glu Glu Glu Val Trp Arg Ile Glu Met Tyr
    350                               355                               360

Ile Ser Phe Gly Ile Met Ser Leu Gly Leu Leu Ser Leu Leu Ala
    365                               370                               375

Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asn Ala Leu Asn Trp Arg Glu
    380                               385                               390

Phe Ser Phe Ile Gln Ser Thr Leu Gly Tyr Val Ala Leu Leu Ile
    395                               400                               405

Ser Thr Phe His Val Leu Ile Tyr Gly Trp Lys Arg Ala Phe Glu
    410                               415                               420

Glu Glu Tyr Tyr Arg Phe Tyr Thr Pro Pro Asn Phe Val Leu Ala
    425                               430                               435

Leu Val Leu Pro Ser Ile Val Ile Leu Gly Lys Ile Ile Leu Phe
    440                               445                               450

Leu Pro Cys Ile Ser Gln Lys Leu Lys Arg Ile Lys Lys Gly Trp
    455                               460                               465

Glu Lys Ser Gln Phe Leu Glu Glu Gly Ile Gly Gly Thr Ile Pro
    470                               475                               480

His Val Ser Pro Glu Arg Val Thr Val Met
    485                               490

```

5 <210> 12  
 <211> 1214  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

```

Met Val Val Pro Glu Lys Glu Gln Ser Trp Ile Pro Lys Ile Phe
  1                               5                               10                               15

Lys Lys Lys Thr Cys Thr Thr Phe Ile Val Asp Ser Thr Asp Pro
    20                               25                               30

Gly Gly Thr Leu Cys Gln Cys Gly Arg Pro Arg Thr Ala His Pro
    35                               40                               45

```

10

ES 2 697 327 T3

Ala Val Ala Met Glu Asp Ala Phe Gly Ala Ala Val Val Thr Val  
50 55 60

Trp Asp Ser Asp Ala His Thr Thr Glu Lys Pro Thr Asp Ala Tyr  
65 70 75

Gly Glu Leu Asp Phe Thr Gly Ala Gly Arg Lys His Ser Asn Phe  
80 85 90

Leu Arg Leu Ser Asp Arg Thr Asp Pro Ala Ala Val Tyr Ser Leu  
95 100 105

Val Thr Arg Thr Trp Gly Phe Arg Ala Pro Asn Leu Val Val Ser  
110 115 120

Val Leu Gly Gly Ser Gly Gly Pro Val Leu Gln Thr Trp Leu Gln  
125 130 135

Asp Leu Leu Arg Arg Gly Leu Val Arg Ala Ala Gln Ser Thr Gly  
140 145 150

Ala Trp Ile Val Thr Gly Gly Leu His Thr Gly Ile Gly Arg His  
155 160 165

Val Gly Val Ala Val Arg Asp His Gln Met Ala Ser Thr Gly Gly  
170 175 180

Thr Lys Val Val Ala Met Gly Val Ala Pro Trp Gly Val Val Arg  
185 190 195

Asn Arg Asp Thr Leu Ile Asn Pro Lys Gly Ser Phe Pro Ala Arg  
200 205 210

Tyr Arg Trp Arg Gly Asp Pro Glu Asp Gly Val Gln Phe Pro Leu  
215 220 225

Asp Tyr Asn Tyr Ser Ala Phe Phe Leu Val Asp Asp Gly Thr His  
230 235 240

Gly Cys Leu Gly Gly Glu Asn Arg Phe Arg Leu Arg Leu Glu Ser  
245 250 255

Tyr Ile Ser Gln Gln Lys Thr Gly Val Gly Gly Thr Gly Ile Asp  
260 265 270

Ile Pro Val Leu Leu Leu Leu Ile Asp Gly Asp Glu Lys Met Leu  
275 280 285

Thr Arg Ile Glu Asn Ala Thr Gln Ala Gln Leu Pro Cys Leu Leu  
290 295 300

Val Ala Gly Ser Gly Gly Ala Ala Asp Cys Leu Ala Glu Thr Leu  
305 310 315

Glu Asp Thr Leu Ala Pro Gly Ser Gly Gly Ala Arg Gln Gly Glu  
320 325 330

Ala Arg Asp Arg Ile Arg Arg Phe Phe Pro Lys Gly Asp Leu Glu  
335 340 345

Val Leu Gln Ala Gln Val Glu Arg Ile Met Thr Arg Lys Glu Leu  
350 355 360

ES 2 697 327 T3

Leu Thr Val Tyr Ser Ser Glu Asp Gly Ser Glu Glu Phe Glu Thr  
 365 370 375  
 Ile Val Leu Lys Ala Leu Val Lys Ala Cys Gly Ser Ser Glu Ala  
 380 385 390  
 Ser Ala Tyr Leu Asp Glu Leu Arg Leu Ala Val Ala Trp Asn Arg  
 395 400 405  
 Val Asp Ile Ala Gln Ser Glu Leu Phe Arg Gly Asp Ile Gln Trp  
 410 415 420  
 Arg Ser Phe His Leu Glu Ala Ser Leu Met Asp Ala Leu Leu Asn  
 425 430 435  
 Asp Arg Pro Glu Phe Val Arg Leu Leu Ile Ser His Gly Leu Ser  
 440 445 450  
 Leu Gly His Phe Leu Thr Pro Met Arg Leu Ala Gln Leu Tyr Ser  
 455 460 465  
 Ala Ala Pro Ser Asn Ser Leu Ile Arg Asn Leu Leu Asp Gln Ala  
 470 475 480  
 Ser His Ser Ala Gly Thr Lys Ala Pro Ala Leu Lys Gly Gly Ala  
 485 490 495  
 Ala Glu Leu Arg Pro Pro Asp Val Gly His Val Leu Arg Met Leu  
 500 505 510  
 Leu Gly Lys Met Cys Ala Pro Arg Tyr Pro Ser Gly Gly Ala Trp  
 515 520 525  
 Asp Pro His Pro Gly Gln Gly Phe Gly Glu Ser Met Tyr Leu Leu  
 530 535 540  
 Ser Asp Lys Ala Thr Ser Pro Leu Ser Leu Asp Ala Gly Leu Gly  
 545 550 555  
 Gln Ala Pro Trp Ser Asp Leu Leu Leu Trp Ala Leu Leu Leu Asn  
 560 565 570  
 Arg Ala Gln Met Ala Met Tyr Phe Trp Glu Met Gly Ser Asn Ala  
 575 580 585  
 Val Ser Ser Ala Leu Gly Ala Cys Leu Leu Leu Arg Val Met Ala  
 590 595 600  
 Arg Leu Glu Pro Asp Ala Glu Glu Ala Ala Arg Arg Lys Asp Leu  
 605 610 615  
 Ala Phe Lys Phe Glu Gly Met Gly Val Asp Leu Phe Gly Glu Cys  
 620 625 630  
 Tyr Arg Ser Ser Glu Val Arg Ala Ala Arg Leu Leu Leu Arg Arg  
 635 640 645  
 Cys Pro Leu Trp Gly Asp Ala Thr Cys Leu Gln Leu Ala Met Gln  
 650 655 660  
 Ala Asp Ala Arg Ala Phe Phe Ala Gln Asp Gly Val Gln Ser Leu  
 665 670 675

ES 2 697 327 T3

Leu	Thr	Gln	Lys	Trp	Trp	Gly	Asp	Met	Ala	Ser	Thr	Thr	Pro	Ile
				680					685					690
Trp	Ala	Leu	Val	Leu	Ala	Phe	Phe	Cys	Pro	Pro	Leu	Ile	Tyr	Thr
				695					700					705
Arg	Leu	Ile	Thr	Phe	Arg	Lys	Ser	Glu	Glu	Glu	Pro	Thr	Arg	Glu
				710					715					720
Glu	Leu	Glu	Phe	Asp	Met	Asp	Ser	Val	Ile	Asn	Gly	Glu	Gly	Pro
				725					730					735
Val	Gly	Thr	Ala	Asp	Pro	Ala	Glu	Lys	Thr	Pro	Leu	Gly	Val	Pro
				740					745					750
Arg	Gln	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Cys	Cys	Gly	Gly	Arg	Cys	Gly	Gly
				755					760					765
Arg	Arg	Cys	Leu	Arg	Arg	Trp	Phe	His	Phe	Trp	Gly	Ala	Pro	Val
				770					775					780
Thr	Ile	Phe	Met	Gly	Asn	Val	Val	Ser	Tyr	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu
				785					790					795
Leu	Phe	Ser	Arg	Val	Leu	Leu	Val	Asp	Phe	Gln	Pro	Ala	Pro	Pro
				800					805					810
Gly	Ser	Leu	Glu	Leu	Leu	Leu	Tyr	Phe	Trp	Ala	Phe	Thr	Leu	Leu
				815					820					825
Cys	Glu	Glu	Leu	Arg	Gln	Gly	Leu	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Leu
				830					835					840
Ala	Ser	Gly	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	His	Ala	Ser	Leu	Ser	Gln	Arg
				845					850					855
Leu	Arg	Leu	Tyr	Leu	Ala	Asp	Ser	Trp	Asn	Gln	Cys	Asp	Leu	Val
				860					865					870
Ala	Leu	Thr	Cys	Phe	Leu	Leu	Gly	Val	Gly	Cys	Arg	Leu	Thr	Pro
				875					880					885
Gly	Leu	Tyr	His	Leu	Gly	Arg	Thr	Val	Leu	Cys	Ile	Asp	Phe	Met
				890					895					900
Val	Phe	Thr	Val	Arg	Leu	Leu	His	Ile	Phe	Thr	Val	Asn	Lys	Gln
				905					910					915
Leu	Gly	Pro	Lys	Ile	Val	Ile	Val	Ser	Lys	Met	Met	Lys	Asp	Val
				920					925					930
Phe	Phe	Phe	Leu	Phe	Phe	Leu	Gly	Val	Trp	Leu	Val	Ala	Tyr	Gly
				935					940					945
Val	Ala	Thr	Glu	Gly	Leu	Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Ser	Asp	Phe	Pro
				950					955					960
Ser	Ile	Leu	Arg	Arg	Val	Phe	Tyr	Arg	Pro	Tyr	Leu	Gln	Ile	Phe
				965					970					975
Gly	Gln	Ile	Pro	Gln	Glu	Asp	Met	Asp	Val	Ala	Leu	Met	Glu	His
				980					985					990

ES 2 697 327 T3

Ser Asn Cys Ser Ser Glu Pro Gly Phe Trp Ala His Pro Pro Gly  
 995 1000 1005

Ala Gln Ala Gly Thr Cys Val Ser Gln Tyr Ala Asn Trp Leu Val  
 1010 1015 1020

Val Leu Leu Leu Val Ile Phe Leu Leu Val Ala Asn Ile Leu Leu  
 1025 1030 1035

Val Asn Leu Leu Ile Ala Met Phe Ser Tyr Thr Phe Gly Lys Val  
 1040 1045 1050

Gln Gly Asn Ser Asp Leu Tyr Trp Lys Ala Gln Arg Tyr Arg Leu  
 1055 1060 1065

Ile Arg Glu Phe His Ser Arg Pro Ala Leu Ala Pro Pro Phe Ile  
 1070 1075 1080

Val Ile Ser His Leu Arg Leu Leu Leu Arg Gln Leu Cys Arg Arg  
 1085 1090 1095

Pro Arg Ser Pro Gln Pro Ser Ser Pro Ala Leu Glu His Phe Arg  
 1100 1105 1110

Val Tyr Leu Ser Lys Glu Ala Glu Arg Lys Leu Leu Thr Trp Glu  
 1115 1120 1125

Ser Val His Lys Glu Asn Phe Leu Leu Ala Arg Ala Arg Asp Lys  
 1130 1135 1140

Arg Glu Ser Asp Ser Glu Arg Leu Lys Arg Thr Ser Gln Lys Val  
 1145 1150 1155

Asp Leu Ala Leu Lys Gln Leu Gly His Ile Arg Glu Tyr Glu Gln  
 1160 1165 1170

Arg Leu Lys Val Leu Glu Arg Glu Val Gln Gln Cys Ser Arg Val  
 1175 1180 1185

Leu Gly Trp Val Ala Glu Ala Leu Ser Arg Ser Ala Leu Leu Pro  
 1190 1195 1200

Pro Gly Gly Pro Pro Pro Pro Asp Leu Pro Gly Ser Lys Asp  
 1205 1210

<210> 13  
 <211> 188  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 13

ES 2 697 327 T3

```

Met Asp Cys Arg Lys Met Ala Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp
 1          5          10          15

Ile Met Ala Ile Ser Lys Val Phe Glu Leu Gly Leu Val Ala Gly
 20          25          30

Leu Gly His Gln Glu Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Tyr Leu Ala
 35          40          45

Phe Arg Asp Asp Ser Ile Trp Pro Gln Glu Glu Pro Ala Ile Arg
 50          55          60

Pro Arg Ser Ser Gln Arg Val Pro Pro Met Gly Ile Gln His Ser
 65          70          75

Lys Glu Leu Asn Arg Thr Cys Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Met
 80          85          90

Leu Gly Ser Phe Cys Ala Cys Pro Pro Ser Phe Tyr Gly Arg Asn
 95          100         105

Cys Glu His Asp Val Arg Lys Glu Asn Cys Gly Ser Val Pro His
 110         115         120

Asp Thr Trp Leu Pro Lys Lys Cys Ser Leu Cys Lys Cys Trp His
 125         130         135

Gly Gln Leu Arg Cys Phe Pro Gln Ala Phe Leu Pro Gly Cys Asp
 140         145         150

Gly Leu Val Met Asp Glu His Leu Val Ala Ser Arg Thr Pro Glu
 155         160         165

Leu Pro Pro Ser Ala Arg Thr Thr Thr Phe Met Leu Val Gly Ile
 170         175         180

Cys Leu Ser Ile Gln Ser Tyr Tyr
 185

```

<210> 14  
 <211> 1033  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 14

5

ES 2 697 327 T3

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



ES 2 697 327 T3

Pro Leu Glu Cys Pro Ala Leu Pro Met Ile His Asn Gly His His  
155 160 165

Thr Ser Glu Asn Val Gly Ser Ile Ala Pro Gly Leu Ser Val Thr  
170 175 180

Tyr Ser Cys Glu Ser Gly Tyr Leu Leu Val Gly Glu Lys Ile Ile  
185 190 195

Asn Cys Leu Ser Ser Gly Lys Trp Ser Ala Val Pro Pro Thr Cys  
200 205 210

Glu Glu Ala Arg Cys Lys Ser Leu Gly Arg Phe Pro Asn Gly Lys  
215 220 225

Val Lys Glu Pro Pro Ile Leu Arg Val Gly Val Thr Ala Asn Phe  
230 235 240

Phe Cys Asp Glu Gly Tyr Arg Leu Gln Gly Pro Pro Ser Ser Arg  
245 250 255

Cys Val Ile Ala Gly Gln Gly Val Ala Trp Thr Lys Met Pro Val  
260 265 270

Cys Glu Glu Ile Phe Cys Pro Ser Pro Pro Pro Ile Leu Asn Gly  
275 280 285

Arg His Ile Gly Asn Ser Leu Ala Asn Val Ser Tyr Gly Ser Ile  
290 295 300

Val Thr Tyr Thr Cys Asp Pro Asp Pro Glu Glu Gly Val Asn Phe  
305 310 315

Ile Leu Ile Gly Glu Ser Thr Leu Arg Cys Thr Val Asp Ser Gln  
320 325 330

Lys Thr Gly Thr Trp Ser Gly Pro Ala Pro Arg Cys Glu Leu Ser  
335 340 345

Thr Ser Ala Val Gln Cys Pro His Pro Gln Ile Leu Arg Gly Arg  
350 355 360

Met Val Ser Gly Gln Lys Asp Arg Tyr Thr Tyr Asn Asp Thr Val  
365 370 375

Ile Phe Ala Cys Met Phe Gly Phe Thr Leu Lys Gly Ser Lys Gln  
380 385 390

Ile Arg Cys Asn Ala Gln Gly Thr Trp Glu Pro Ser Ala Pro Val  
395 400 405

Cys Glu Lys Glu Cys Gln Ala Pro Pro Asn Ile Leu Asn Gly Gln  
410 415 420

Lys Glu Asp Arg His Met Val Arg Phe Asp Pro Gly Thr Ser Ile  
425 430 435

Lys Tyr Ser Cys Asn Pro Gly Tyr Val Leu Val Gly Glu Glu Ser  
440 445 450

Ile Gln Cys Thr Ser Glu Gly Val Trp Thr Pro Pro Val Pro Gln  
455 460 465

ES 2 697 327 T3

Cys	Lys	Val	Ala	Ala	Cys	Glu	Ala	Thr	Gly	Arg	Gln	Leu	Leu	Thr
				470					475					480
Lys	Pro	Gln	His	Gln	Phe	Val	Arg	Pro	Asp	Val	Asn	Ser	Ser	Cys
				485					490					495
Gly	Glu	Gly	Tyr	Lys	Leu	Ser	Gly	Ser	Val	Tyr	Gln	Glu	Cys	Gln
				500					505					510
Gly	Thr	Ile	Pro	Trp	Phe	Met	Glu	Ile	Arg	Leu	Cys	Lys	Glu	Ile
				515					520					525
Thr	Cys	Pro	Pro	Pro	Pro	Val	Ile	Tyr	Asn	Gly	Ala	His	Thr	Gly
				530					535					540
Ser	Ser	Leu	Glu	Asp	Phe	Pro	Tyr	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Tyr	Thr
				545					550					555
Cys	Asn	Pro	Gly	Pro	Glu	Arg	Gly	Val	Glu	Phe	Ser	Leu	Ile	Gly
				560					565					570
Glu	Ser	Thr	Ile	Arg	Cys	Thr	Ser	Asn	Asp	Gln	Glu	Arg	Gly	Thr
				575					580					585
Trp	Ser	Gly	Pro	Ala	Pro	Leu	Cys	Lys	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	Val
				590					595					600
Gln	Cys	Ser	His	Val	His	Ile	Ala	Asn	Gly	Tyr	Lys	Ile	Ser	Gly
				605					610					615
Lys	Glu	Ala	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Asn	Asp	Thr	Val	Thr	Phe	Lys	Cys
				620					625					630
Tyr	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu	Lys	Gly	Ser	Ser	Gln	Ile	Arg	Cys	Lys
				635					640					645
Ala	Asp	Asn	Thr	Trp	Asp	Pro	Glu	Ile	Pro	Val	Cys	Glu	Lys	Glu
				650					655					660
Thr	Cys	Gln	His	Val	Arg	Gln	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Pro	Ala	Gly
				665					670					675
Ser	Arg	Val	Glu	Leu	Val	Asn	Thr	Ser	Cys	Gln	Asp	Gly	Tyr	Gln
				680					685					690
Leu	Thr	Gly	His	Ala	Tyr	Gln	Met	Cys	Gln	Asp	Ala	Glu	Asn	Gly
				695					700					705
Ile	Trp	Phe	Lys	Lys	Ile	Pro	Leu	Cys	Lys	Val	Ile	His	Cys	His
				710					715					720
Pro	Pro	Pro	Val	Ile	Val	Asn	Gly	Lys	His	Thr	Gly	Met	Met	Ala
				725					730					735
Glu	Asn	Phe	Leu	Tyr	Gly	Asn	Glu	Val	Ser	Tyr	Glu	Cys	Asp	Gln
				740					745					750
Gly	Phe	Tyr	Leu	Leu	Gly	Glu	Lys	Lys	Leu	Gln	Cys	Arg	Ser	Asp
				755					760					765
Ser	Lys	Gly	His	Gly	Ser	Trp	Ser	Gly	Pro	Ser	Pro	Gln	Cys	Leu
				770					775					780

ES 2 697 327 T3

Arg Ser Pro Pro Val Thr Arg Cys Pro Asn Pro Glu Val Lys His  
785 790 795

Gly Tyr Lys Leu Asn Lys Thr His Ser Ala Tyr Ser His Asn Asp  
800 805 810

Ile Val Tyr Val Asp Cys Asn Pro Gly Phe Ile Met Asn Gly Ser  
815 820 825

Arg Val Ile Arg Cys His Thr Asp Asn Thr Trp Val Pro Gly Val  
830 835 840

Pro Thr Cys Ile Lys Lys Ala Phe Ile Gly Cys Pro Pro Pro Pro  
845 850 855

Lys Thr Pro Asn Gly Asn His Thr Gly Gly Asn Ile Ala Arg Phe  
860 865 870

Ser Pro Gly Met Ser Ile Leu Tyr Ser Cys Asp Gln Gly Tyr Leu  
875 880 885

Leu Val Gly Glu Ala Leu Leu Leu Cys Thr His Glu Gly Thr Trp  
890 895 900

Ser Gln Pro Ala Pro His Cys Lys Glu Val Asn Cys Ser Ser Pro  
905 910 915

Ala Asp Met Asp Gly Ile Gln Lys Gly Leu Glu Pro Arg Lys Met  
920 925 930

Tyr Gln Tyr Gly Ala Val Val Thr Leu Glu Cys Glu Asp Gly Tyr  
935 940 945

Met Leu Glu Gly Ser Pro Gln Ser Gln Cys Gln Ser Asp His Gln  
950 955 960

Trp Asn Pro Pro Leu Ala Val Cys Arg Ser Arg Ser Leu Ala Pro  
965 970 975

Val Leu Cys Gly Ile Ala Ala Gly Leu Ile Leu Leu Thr Phe Leu  
980 985 990

Ile Val Ile Thr Leu Tyr Val Ile Ser Lys His Arg Glu Arg Asn  
995 1000 1005

Tyr Tyr Thr Asp Thr Ser Gln Lys Glu Ala Phe His Leu Glu Ala  
1010 1015 1020

Arg Glu Val Tyr Ser Val Asp Pro Tyr Asn Pro Ala Ser  
1025 1030

<210> 15  
<211> 229  
5 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 15

ES 2 697 327 T3

```

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

Pro Gly Gln Glu

```

<210> 16  
 <211> 508  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 16

```

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

```

ES 2 697 327 T3

Asp Ser Gly Asn Tyr Phe Cys Ser Thr Lys Gly Gln Leu Phe Leu  
 80 85 90  
 Trp Asp Lys Thr Ser Asn Ile Val Lys Ile Lys Val Gln Glu Leu  
 95 100 105  
 Phe Gln Arg Pro Val Leu Thr Ala Ser Ser Phe Gln Pro Ile Glu  
 110 115 120  
 Gly Gly Pro Val Ser Leu Lys Cys Glu Thr Arg Leu Ser Pro Gln  
 125 130 135  
 Arg Leu Asp Val Gln Leu Gln Phe Cys Phe Phe Arg Glu Asn Gln  
 140 145 150  
 Val Leu Gly Ser Gly Trp Ser Ser Ser Pro Glu Leu Gln Ile Ser  
 155 160 165  
 Ala Val Trp Ser Glu Asp Thr Gly Ser Tyr Trp Cys Lys Ala Glu  
 170 175 180  
 Thr Val Thr His Arg Ile Arg Lys Gln Ser Leu Gln Ser Gln Ile  
 185 190 195  
 His Val Gln Arg Ile Pro Ile Ser Asn Val Ser Leu Glu Ile Arg  
 200 205 210  
 Ala Pro Gly Gly Gln Val Thr Glu Gly Gln Lys Leu Ile Leu Leu  
 215 220 225  
 Cys Ser Val Ala Gly Gly Thr Gly Asn Val Thr Phe Ser Trp Tyr  
 230 235 240  
 Arg Glu Ala Thr Gly Thr Ser Met Gly Lys Lys Thr Gln Arg Ser  
 245 250 255  
 Leu Ser Ala Glu Leu Glu Ile Pro Ala Val Lys Glu Ser Asp Ala  
 260 265 270  
 Gly Lys Tyr Tyr Cys Arg Ala Asp Asn Gly His Val Pro Ile Gln  
 275 280 285  
 Ser Lys Val Val Asn Ile Pro Val Arg Ile Pro Val Ser Arg Pro  
 290 295 300  
 Val Leu Thr Leu Arg Ser Pro Gly Ala Gln Ala Ala Val Gly Asp  
 305 310 315  
 Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro Pro Ile  
 320 325 330  
 Leu Tyr Gln Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Asn Ser Ser  
 335 340 345  
 Ala Pro Ser Gly Gly Gly Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Ala  
 350 355 360  
 Glu His Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asn Asn Gly Leu Gly  
 365 370 375  
 Ala Gln Cys Ser Glu Ala Val Pro Val Ser Ile Ser Gly Pro Asp  
 380 385 390

ES 2 697 327 T3

Gly Tyr Arg Arg Asp Leu Met Thr Ala Gly Val Leu Trp Gly Leu  
 395 400 405  
 Phe Gly Val Leu Gly Phe Thr Gly Val Ala Leu Leu Leu Tyr Ala  
 410 415 420  
 Leu Phe His Lys Ile Ser Gly Glu Ser Ser Ala Thr Asn Glu Pro  
 425 430 435  
 Arg Gly Ala Ser Arg Pro Asn Pro Gln Glu Phe Thr Tyr Ser Ser  
 440 445 450  
 Pro Thr Pro Asp Met Glu Glu Leu Gln Pro Val Tyr Val Asn Val  
 455 460 465  
 Gly Ser Val Asp Val Asp Val Val Tyr Ser Gln Val Trp Ser Met  
 470 475 480  
 Gln Gln Pro Glu Ser Ser Ala Asn Ile Arg Thr Leu Leu Glu Asn  
 485 490 495  
 Lys Asp Ser Gln Val Ile Tyr Ser Ser Val Lys Lys Ser  
 500 505

<210> 17  
 <211> 1255  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 17

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

ES 2 697 327 T3

Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile	Phe	His	Lys	Asn	Asn	Gln	Leu	Ala	170	175	180
Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg	Ala	Cys	His	Pro	Cys	185	190	195
Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp	Gly	Glu	Ser	Ser	Glu	200	205	210
Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Ala	215	220	225
Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Gln	Cys	230	235	240
Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Cys	245	250	255
Leu	His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro	Ala	260	265	270
Leu	Val	Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro	275	280	285
Glu	Gly	Arg	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	290	295	300
Tyr	Asn	Tyr	Leu	Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	305	310	315
Pro	Leu	His	Asn	Gln	Glu	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	320	325	330
Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	Lys	Pro	Cys	Ala	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	335	340	345
Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	Glu	Val	Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Asn	350	355	360
Ile	Gln	Glu	Phe	Ala	Gly	Cys	Lys	Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	365	370	375
Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Gly	Asp	Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	380	385	390
Pro	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	Val	Phe	Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	395	400	405
Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	Pro	Asp	Ser	Leu	Pro	410	415	420
Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Gln	Val	Ile	Arg	Gly	Arg	Ile	425	430	435
Leu	His	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu	Gly	Ile	440	445	450
Ser	Trp	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly	Leu	455	460	465
Ala	Leu	Ile	His	His	Asn	Thr	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	Thr	Val	470	475	480

ES 2 697 327 T3

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His  
 485 490 495  
 Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala  
 500 505 510 515 510 510 510 510  
 Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro  
 515 520 525 525 525 525 525 525 525  
 Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys  
 530 535 540 540 540 540 540 540 540  
 Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val  
 545 550 555 555 555 555 555 555 555  
 Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln  
 560 565 570 570 570 570 570 570 570  
 Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val  
 575 580 585 585 585 585 585 585 585  
 Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys  
 590 595 600 600 600 600 600 600 600  
 Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys  
 605 610 615 615 615 615 615 615 615  
 Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys  
 620 625 630 630 630 630 630 630 630  
 Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu  
 635 640 645 645 645 645 645 645 645  
 Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val Val Gly  
 650 655 660 660 660 660 660 660 660  
 Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Ile  
 665 670 675 675 675 675 675 675 675  
 Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg Leu  
 680 685 690 690 690 690 690 690 690  
 Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala  
 695 700 705 705 705 705 705 705 705  
 Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu  
 710 715 720 720 720 720 720 720 720  
 Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr  
 725 730 735 735 735 735 735 735 735  
 Lys Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val  
 740 745 750 750 750 750 750 750 750  
 Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys  
 755 760 765 765 765 765 765 765 765  
 Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro  
 770 775 780 780 780 780 780 780 780  
 Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln  
 785 790 795 795 795 795 795 795 795



ES 2 697 327 T3

Leu Val Thr Gln Leu Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val  
 800 805 810  
 Arg Glu Asn Arg Gly Arg Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp  
 815 820 825  
 Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg  
 830 835 840  
 Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Ser  
 845 850 855  
 Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Leu  
 860 865 870  
 Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp Gly Gly Lys Val Pro  
 875 880 885  
 Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg Arg Arg Phe Thr  
 890 895 900  
 His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu  
 905 910 915  
 Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg Glu  
 920 925 930  
 Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro  
 935 940 945  
 Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met  
 950 955 960  
 Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu  
 965 970 975  
 Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln  
 980 985 990  
 Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr  
 995 1000 1005  
 Arg Ser Leu Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala  
 1010 1015 1020  
 Glu Glu Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro  
 1025 1030 1035  
 Ala Pro Gly Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser  
 1040 1045 1050  
 Ser Thr Arg Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro  
 1055 1060 1065  
 Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly  
 1070 1075 1080  
 Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala  
 1085 1090 1095  
 Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln  
 1100 1105 1110

ES 2 697 327 T3

Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp  
 1115 1120 1125

Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val  
 1130 1135 1140

Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly  
 1145 1150 1155

Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro  
 1160 1165 1170

Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe  
 1175 1180 1185

Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln  
 1190 1195 1200

Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro  
 1205 1210 1215

Ala Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg  
 1220 1225 1230

Gly Ala Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn  
 1235 1240 1245

Pro Glu Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro Val  
 1250 1255

<210> 18  
 <211> 344  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 18

Met Gly Pro Pro Ser Ala Pro Pro Cys Arg Leu His Val Pro Trp  
 1 5 10 15

Lys Glu Val Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro  
 20 25 30

Pro Thr Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val  
 35 40 45

Ala Glu Gly Lys Glu Val Leu Leu Leu Ala His Asn Leu Pro Gln  
 50 55 60

Asn Arg Ile Gly Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly  
 65 70 75

Asn Ser Leu Ile Val Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr  
 80 85 90

Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala  
 95 100 105

Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr  
 110 115 120

Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr  
 125 130 135

ES 2 697 327 T3

Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser  
 140 145 150  
 Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe  
 155 160 165  
 Thr Cys Glu Pro Glu Val Gln Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val  
 170 175 180  
 Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn  
 185 190 195  
 Gly Asn Met Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Lys Arg Asn Asp Ala  
 200 205 210  
 Gly Ser Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Ala Ser Ala Asn Arg  
 215 220 225  
 Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Val Pro  
 230 235 240  
 Thr Ile Ser Pro Ser Lys Ala Asn Tyr Arg Pro Gly Glu Asn Leu  
 245 250 255  
 Asn Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser  
 260 265 270  
 Trp Phe Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe  
 275 280 285  
 Ile Pro Asn Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln  
 290 295 300  
 Ala His Asn Ser Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Met  
 305 310 315  
 Ile Thr Val Ser Gly Ser Ala Pro Val Leu Ser Ala Val Ala Thr  
 320 325 330  
 Val Gly Ile Thr Ile Gly Val Leu Ala Arg Val Ala Leu Ile  
 335 340

5 <210> 19  
 <211> 411  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 19

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

ES 2 697 327 T3

Val	Gly	Gly	Gln	Phe	Trp	Ser	Val	Tyr	Thr	Pro	Cys	Asp	Thr	Gln
				80					85					90
Asn	Lys	Asp	Ala	Val	Arg	Arg	Thr	Leu	Glu	Gln	Met	Asp	Val	Val
				95					100					105
His	Arg	Met	Cys	Arg	Met	Tyr	Pro	Glu	Thr	Phe	Leu	Tyr	Val	Thr
				110					115					120
Ser	Ser	Ala	Gly	Ile	Arg	Gln	Ala	Phe	Arg	Glu	Gly	Lys	Val	Ala
				125					130					135
Ser	Leu	Ile	Gly	Val	Glu	Gly	Gly	His	Ser	Ile	Asp	Ser	Ser	Leu
				140					145					150
Gly	Val	Leu	Arg	Ala	Leu	Tyr	Gln	Leu	Gly	Met	Arg	Tyr	Leu	Thr
				155					160					165
Leu	Thr	His	Ser	Cys	Asn	Thr	Pro	Trp	Ala	Asp	Asn	Trp	Leu	Val
				170					175					180
Asp	Thr	Gly	Asp	Ser	Glu	Pro	Gln	Ser	Gln	Gly	Leu	Ser	Pro	Phe
				185					190					195
Gly	Gln	Arg	Val	Val	Lys	Glu	Leu	Asn	Arg	Leu	Gly	Val	Leu	Ile
				200					205					210
Asp	Leu	Ala	His	Val	Ser	Val	Ala	Thr	Met	Lys	Ala	Thr	Leu	Gln
				215					220					225
Leu	Ser	Arg	Ala	Pro	Val	Ile	Phe	Ser	His	Ser	Ser	Ala	Tyr	Ser
				230					235					240
Val	Cys	Ala	Ser	Arg	Arg	Asn	Val	Pro	Asp	Asp	Val	Leu	Arg	Leu
				245					250					255
Val	Lys	Gln	Thr	Asp	Ser	Leu	Val	Met	Val	Asn	Phe	Tyr	Asn	Asn
				260					265					270
Tyr	Ile	Ser	Cys	Thr	Asn	Lys	Ala	Asn	Leu	Ser	Gln	Val	Ala	Asp
				275					280					285
His	Leu	Asp	His	Ile	Lys	Glu	Val	Ala	Gly	Ala	Arg	Ala	Val	Gly
				290					295					300
Phe	Gly	Gly	Asp	Phe	Asp	Gly	Val	Pro	Arg	Val	Pro	Glu	Gly	Leu
				305					310					315
Glu	Asp	Val	Ser	Lys	Tyr	Pro	Asp	Leu	Ile	Ala	Glu	Leu	Leu	Arg
				320					325					330
Arg	Asn	Trp	Thr	Glu	Ala	Glu	Val	Lys	Gly	Ala	Leu	Ala	Asp	Asn
				335					340					345
Leu	Leu	Arg	Val	Phe	Glu	Ala	Val	Glu	Gln	Ala	Ser	Asn	Leu	Thr
				350					355					360
Gln	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Pro	Ile	Pro	Leu	Asp	Gln	Leu	Gly	Gly
				365					370					375
Ser	Cys	Arg	Thr	His	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Ser	Gly	Ala	Ser	Ser	Leu
				380					385					390

ES 2 697 327 T3

His Arg His Trp Gly Leu Leu Leu Ala Ser Leu Ala Pro Leu Val  
 395 400 405  
 Leu Cys Leu Ser Leu Leu  
 410

5 <210> 20  
 <211> 553  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 20

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

ES 2 697 327 T3

Val Leu Pro Ile Ser Ile Thr Val Phe Leu Phe Ser Val Met Gly  
 260 265 270  
 Tyr Ser Ile Tyr Arg Tyr Ile His Val Gly Lys Glu Lys His Pro  
 275 280 285  
 Ala Asn Leu Ile Leu Ile Tyr Gly Asn Glu Phe Asp Lys Arg Phe  
 290 295 300  
 Phe Val Pro Ala Glu Lys Ile Val Ile Asn Phe Ile Thr Leu Asn  
 305 310 315  
 Ile Ser Asp Asp Ser Lys Ile Ser His Gln Asp Met Ser Leu Leu  
 320 325 330  
 Gly Lys Ser Ser Asp Val Ser Ser Leu Asn Asp Pro Gln Pro Ser  
 335 340 345  
 Gly Asn Leu Arg Pro Pro Gln Glu Glu Glu Glu Val Lys His Leu  
 350 355 360  
 Gly Tyr Ala Ser His Leu Met Glu Ile Phe Cys Asp Ser Glu Glu  
 365 370 375  
 Asn Thr Glu Gly Thr Ser Phe Thr Gln Gln Glu Ser Leu Ser Arg  
 380 385 390  
 Thr Ile Pro Pro Asp Lys Thr Val Ile Glu Tyr Glu Tyr Asp Val  
 395 400 405  
 Arg Thr Thr Asp Ile Cys Ala Gly Pro Glu Glu Gln Glu Leu Ser  
 410 415 420  
 Leu Gln Glu Glu Val Ser Thr Gln Gly Thr Leu Leu Glu Ser Gln  
 425 430 435  
 Ala Ala Leu Ala Val Leu Gly Pro Gln Thr Leu Gln Tyr Ser Tyr  
 440 445 450  
 Thr Pro Gln Leu Gln Asp Leu Asp Pro Leu Ala Gln Glu His Thr  
 455 460 465  
 Asp Ser Glu Glu Gly Pro Glu Glu Glu Pro Ser Thr Thr Leu Val  
 470 475 480  
 Asp Trp Asp Pro Gln Thr Gly Arg Leu Cys Ile Pro Ser Leu Ser  
 485 490 495  
 Ser Phe Asp Gln Asp Ser Glu Gly Cys Glu Pro Ser Glu Gly Asp  
 500 505 510  
 Gly Leu Gly Glu Glu Gly Leu Leu Ser Arg Leu Tyr Glu Glu Pro  
 515 520 525  
 Ala Pro Asp Arg Pro Pro Gly Glu Asn Glu Thr Tyr Leu Met Gln  
 530 535 540  
 Phe Met Glu Glu Trp Gly Leu Tyr Val Gln Met Glu Asn  
 545 550

ES 2 697 327 T3

<210> 21  
 <211> 911  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 21

```

Met Ala Gln Leu Phe Leu Pro Leu Leu Ala Ala Leu Val Leu Ala
 1                    5                      10                15

Gln Ala Pro Ala Ala Leu Ala Asp Val Leu Glu Gly Asp Ser Ser
                20                      25                30

Glu Asp Arg Ala Phe Arg Val Arg Ile Ala Gly Asp Ala Pro Leu
                35                      40                45

Gln Gly Val Leu Gly Gly Ala Leu Thr Ile Pro Cys His Val His
                50                      55                60

Tyr Leu Arg Pro Pro Pro Ser Arg Arg Ala Val Leu Gly Ser Pro
                65                      70                75

Arg Val Lys Trp Thr Phe Leu Ser Arg Gly Arg Glu Ala Glu Val
                80                      85                90

Leu Val Ala Arg Gly Val Arg Val Lys Val Asn Glu Ala Tyr Arg
                95                      100               105

Phe Arg Val Ala Leu Pro Ala Tyr Pro Ala Ser Leu Thr Asp Val
                110                     115                120

Ser Leu Ala Leu Ser Glu Leu Arg Pro Asn Asp Ser Gly Ile Tyr
                125                     130                135

Arg Cys Glu Val Gln His Gly Ile Asp Asp Ser Ser Asp Ala Val
                140                     145                150

Glu Val Lys Val Lys Gly Val Val Phe Leu Tyr Arg Glu Gly Ser
                155                     160                165

Ala Arg Tyr Ala Phe Ser Phe Ser Gly Ala Gln Glu Ala Cys Ala
                170                     175                180

Arg Ile Gly Ala His Ile Ala Thr Pro Glu Gln Leu Tyr Ala Ala
                185                     190                195

Tyr Leu Gly Gly Tyr Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Ser Asp
                200                     205                210

Gln Thr Val Arg Tyr Pro Ile Gln Thr Pro Arg Glu Ala Cys Tyr
                215                     220                225

Gly Asp Met Asp Gly Phe Pro Gly Val Arg Asn Tyr Gly Val Val
                230                     235                240

Asp Pro Asp Asp Leu Tyr Asp Val Tyr Cys Tyr Ala Glu Asp Leu
                245                     250                255

Asn Gly Glu Leu Phe Leu Gly Asp Pro Pro Glu Lys Leu Thr Leu
                260                     265                270

Glu Glu Ala Arg Ala Tyr Cys Gln Glu Arg Gly Ala Glu Ile Ala
                275                     280                285

Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Ala Ala Trp Asp Gly Gly Leu Asp His
                290                     295                300
    
```

ES 2 697 327 T3

Cys Ser Pro Gly Trp Leu Ala Asp Gly Ser Val Arg Tyr Pro Ile  
 305 310 315  
 Val Thr Pro Ser Gln Arg Cys Gly Gly Gly Leu Pro Gly Val Lys  
 320 325 330  
 Thr Leu Phe Leu Phe Pro Asn Gln Thr Gly Phe Pro Asn Lys His  
 335 340 345  
 Ser Arg Phe Asn Val Tyr Cys Phe Arg Asp Ser Ala Gln Pro Ser  
 350 355 360  
 Ala Ile Pro Glu Ala Ser Asn Pro Ala Ser Asn Pro Ala Ser Asp  
 365 370 375  
 Gly Leu Glu Ala Ile Val Thr Val Thr Glu Thr Leu Glu Glu Leu  
 380 385 390  
 Gln Leu Pro Gln Glu Ala Thr Glu Ser Glu Ser Arg Gly Ala Ile  
 395 400 405  
 Tyr Ser Ile Pro Ile Met Glu Asp Gly Gly Gly Ser Ser Thr  
 410 415 420  
 Pro Glu Asp Pro Ala Glu Ala Pro Arg Thr Leu Leu Glu Phe Glu  
 425 430 435  
 Thr Gln Ser Met Val Pro Pro Thr Gly Phe Ser Glu Glu Glu Gly  
 440 445 450  
 Lys Ala Leu Glu Glu Glu Glu Lys Tyr Glu Asp Glu Glu Glu Lys  
 455 460 465  
 Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Val Glu Asp Glu Ala Leu Trp  
 470 475 480  
 Ala Trp Pro Ser Glu Leu Ser Ser Pro Gly Pro Glu Ala Ser Leu  
 485 490 495  
 Pro Thr Glu Pro Ala Ala Gln Glu Lys Ser Leu Ser Gln Ala Pro  
 500 505 510  
 Ala Arg Ala Val Leu Gln Pro Gly Ala Ser Pro Leu Pro Asp Gly  
 515 520 525  
 Glu Ser Glu Ala Ser Arg Pro Pro Arg Val His Gly Pro Pro Thr  
 530 535 540  
 Glu Thr Leu Pro Thr Pro Arg Glu Arg Asn Leu Ala Ser Pro Ser  
 545 550 555  
 Pro Ser Thr Leu Val Glu Ala Arg Glu Val Gly Glu Ala Thr Gly  
 560 565 570  
 Gly Pro Glu Leu Ser Gly Val Pro Arg Gly Glu Ser Glu Glu Thr  
 575 580 585  
 Gly Ser Ser Glu Gly Ala Pro Ser Leu Leu Pro Ala Thr Arg Ala  
 590 595 600  
 Pro Glu Gly Thr Arg Glu Leu Glu Ala Pro Ser Glu Asp Asn Ser  
 605 610 615



ES 2 697 327 T3

Gly Arg Thr Ala Pro Ala Gly Thr Ser Val Gln Ala Gln Pro Val  
620 625 630

Leu Pro Thr Asp Ser Ala Ser Arg Gly Gly Val Ala Val Val Pro  
635 640 645

Ala Ser Gly Asp Cys Val Pro Ser Pro Cys His Asn Gly Gly Thr  
650 655 660

Cys Leu Glu Glu Glu Glu Gly Val Arg Cys Leu Cys Leu Pro Gly  
665 670 675

Tyr Gly Gly Asp Leu Cys Asp Val Gly Leu Arg Phe Cys Asn Pro  
680 685 690

Gly Trp Asp Ala Phe Gln Gly Ala Cys Tyr Lys His Phe Ser Thr  
695 700 705

Arg Arg Ser Trp Glu Glu Ala Glu Thr Gln Cys Arg Met Tyr Gly  
710 715 720

Ala His Leu Ala Ser Ile Ser Thr Pro Glu Glu Gln Asp Phe Ile  
725 730 735

Asn Asn Arg Tyr Arg Glu Tyr Gln Trp Ile Gly Leu Asn Asp Arg  
740 745 750

Thr Ile Glu Gly Asp Phe Leu Trp Ser Asp Gly Val Pro Leu Leu  
755 760 765

Tyr Glu Asn Trp Asn Pro Gly Gln Pro Asp Ser Tyr Phe Leu Ser  
770 775 780

Gly Glu Asn Cys Val Val Met Val Trp His Asp Gln Gly Gln Trp  
785 790 795

Ser Asp Val Pro Cys Asn Tyr His Leu Ser Tyr Thr Cys Lys Met  
800 805 810

Gly Leu Val Ser Cys Gly Pro Pro Pro Glu Leu Pro Leu Ala Gln  
815 820 825

Val Phe Gly Arg Pro Arg Leu Arg Tyr Glu Val Asp Thr Val Leu  
830 835 840

Arg Tyr Arg Cys Arg Glu Gly Leu Ala Gln Arg Asn Leu Pro Leu  
845 850 855

Ile Arg Cys Gln Glu Asn Gly Arg Trp Glu Ala Pro Gln Ile Ser  
860 865 870

Cys Val Pro Arg Arg Pro Ala Arg Ala Leu His Pro Glu Glu Asp  
875 880 885

Pro Glu Gly Arg Gln Gly Arg Leu Leu Gly Arg Trp Lys Ala Leu  
890 895 900

Leu Ile Pro Pro Ser Ser Pro Met Pro Gly Pro  
905 910

ES 2 697 327 T3

<210> 22  
 <211> 987  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 22

```

Met Ala Leu Arg Arg Leu Gly Ala Ala Leu Leu Leu Leu Pro Leu
 1           5           10           15

Leu Ala Ala Val Glu Glu Thr Leu Met Asp Ser Thr Thr Ala Thr
          20           25           30

Ala Glu Leu Gly Trp Met Val His Pro Pro Ser Gly Trp Glu Glu
          35           40           45

Val Ser Gly Tyr Asp Glu Asn Met Asn Thr Ile Arg Thr Tyr Gln
          50           55           60

Val Cys Asn Val Phe Glu Ser Ser Gln Asn Asn Trp Leu Arg Thr
          65           70           75

Lys Phe Ile Arg Arg Arg Gly Ala His Arg Ile His Val Glu Met
          80           85           90

Lys Phe Ser Val Arg Asp Cys Ser Ser Ile Pro Ser Val Pro Gly
          95           100          105

Ser Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ala Asp Phe
          110          115          120

Asp Ser Ala Thr Lys Thr Phe Pro Asn Trp Met Glu Asn Pro Trp
          125          130          135

Val Lys Val Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Ser Gln Val
          140          145          150

Asp Leu Gly Gly Arg Val Met Lys Ile Asn Thr Glu Val Arg Ser
          155          160          165

Phe Gly Pro Val Ser Arg Ser Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp
          170          175          180

Tyr Gly Gly Cys Met Ser Leu Ile Ala Val Arg Val Phe Tyr Arg
          185          190          195

Lys Cys Pro Arg Ile Ile Gln Asn Gly Ala Ile Phe Gln Glu Thr
          200          205          210

Leu Ser Gly Ala Glu Ser Thr Ser Leu Val Ala Ala Arg Gly Ser
          215          220          225

Cys Ile Ala Asn Ala Glu Glu Val Asp Val Pro Ile Lys Leu Tyr
          230          235          240

Cys Asn Gly Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Arg Cys Met
          245          250          255

Cys Lys Ala Gly Phe Glu Ala Val Glu Asn Gly Thr Val Cys Arg
          260          265          270

Gly Cys Pro Ser Gly Thr Phe Lys Ala Asn Gln Gly Asp Glu Ala
          275          280          285

Cys Thr His Cys Pro Ile Asn Ser Arg Thr Thr Ser Glu Gly Ala
          290          295          300
    
```

ES 2 697 327 T3

Thr Asn Cys Val Cys Arg Asn Gly Tyr Tyr Arg Ala Asp Leu Asp  
305 310 315

Pro Leu Asp Met Pro Cys Thr Thr Ile Pro Ser Ala Pro Gln Ala  
320 325 330

Val Ile Ser Ser Val Asn Glu Thr Ser Leu Met Leu Glu Trp Thr  
335 340 345

Pro Pro Arg Asp Ser Gly Gly Arg Glu Asp Leu Val Tyr Asn Ile  
350 355 360

Ile Cys Lys Ser Cys Gly Ser Gly Arg Gly Ala Cys Thr Arg Cys  
365 370 375

Gly Asp Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Gln Leu Gly Leu Thr Glu  
380 385 390

Pro Arg Ile Tyr Ile Ser Asp Leu Leu Ala His Thr Gln Tyr Thr  
395 400 405

Phe Glu Ile Gln Ala Val Asn Gly Val Thr Asp Gln Ser Pro Phe  
410 415 420

Ser Pro Gln Phe Ala Ser Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala  
425 430 435

Pro Ser Ala Val Ser Ile Met His Gln Val Ser Arg Thr Val Asp  
440 445 450

Ser Ile Thr Leu Ser Trp Ser Gln Pro Asp Gln Pro Asn Gly Val  
455 460 465

Ile Leu Asp Tyr Glu Leu Gln Tyr Tyr Glu Lys Glu Leu Ser Glu  
470 475 480

Tyr Asn Ala Thr Ala Ile Lys Ser Pro Thr Asn Thr Val Thr Val  
485 490 495

Gln Gly Leu Lys Ala Gly Ala Ile Tyr Val Phe Gln Val Arg Ala  
500 505 510

Arg Thr Val Ala Gly Tyr Gly Arg Tyr Ser Gly Lys Met Tyr Phe  
515 520 525

Gln Thr Met Thr Glu Ala Glu Tyr Gln Thr Ser Ile Gln Glu Lys  
530 535 540

Leu Pro Leu Ile Ile Gly Ser Ser Ala Ala Gly Leu Val Phe Leu  
545 550 555

Ile Ala Val Val Val Ile Ala Ile Val Cys Asn Arg Arg Arg Gly  
560 565 570

Phe Glu Arg Ala Asp Ser Glu Tyr Thr Asp Lys Leu Gln His Tyr  
575 580 585

Thr Ser Gly His Met Thr Pro Gly Met Lys Ile Tyr Ile Asp Pro  
590 595 600

Phe Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Glu Ala Val Arg Glu Phe Ala Lys  
605 610 615

ES 2 697 327 T3

Glu	Ile	Asp	Ile	Ser	Cys	Val	Lys	Ile	Glu	Gln	Val	Ile	Gly	Ala
				620					625					630
Gly	Glu	Phe	Gly	Glu	Val	Cys	Ser	Gly	His	Leu	Lys	Leu	Pro	Gly
				635					640					645
Lys	Arg	Glu	Ile	Phe	Val	Ala	Ile	Lys	Thr	Leu	Lys	Ser	Gly	Tyr
				650					655					660
Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	Arg	Asp	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Ser	Ile	Met
				665					670					675
Gly	Gln	Phe	Asp	His	Pro	Asn	Val	Ile	His	Leu	Glu	Gly	Val	Val
				680					685					690
Thr	Lys	Ser	Thr	Pro	Val	Met	Ile	Ile	Thr	Glu	Phe	Met	Glu	Asn
				695					700					705
Gly	Ser	Leu	Asp	Ser	Phe	Leu	Arg	Gln	Asn	Asp	Gly	Gln	Phe	Thr
				710					715					720
Val	Ile	Gln	Leu	Val	Gly	Met	Leu	Arg	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly	Met
				725					730					735
Lys	Tyr	Leu	Ala	Asp	Met	Asn	Tyr	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala
				740					745					750
Arg	Asn	Ile	Leu	Val	Asn	Ser	Asn	Leu	Val	Cys	Lys	Val	Ser	Asp
				755					760					765
Phe	Gly	Leu	Ser	Arg	Phe	Leu	Glu	Asp	Asp	Thr	Ser	Asp	Pro	Thr
				770					775					780
Tyr	Thr	Ser	Ala	Leu	Gly	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Arg	Trp	Thr	Ala
				785					790					795
Pro	Glu	Ala	Ile	Gln	Tyr	Arg	Lys	Phe	Thr	Ser	Ala	Ser	Asp	Val
				800					805					810
Trp	Ser	Tyr	Gly	Ile	Val	Met	Trp	Glu	Val	Met	Ser	Tyr	Gly	Glu
				815					820					825
Arg	Pro	Tyr	Trp	Asp	Met	Thr	Asn	Gln	Asp	Val	Ile	Asn	Ala	Ile
				830					835					840
Glu	Gln	Asp	Tyr	Arg	Leu	Pro	Pro	Pro	Met	Asp	Cys	Pro	Ser	Ala
				845					850					855
Leu	His	Gln	Leu	Met	Leu	Asp	Cys	Trp	Gln	Lys	Asp	Arg	Asn	His
				860					865					870
Arg	Pro	Lys	Phe	Gly	Gln	Ile	Val	Asn	Thr	Leu	Asp	Lys	Met	Ile
				875					880					885
Arg	Asn	Pro	Asn	Ser	Leu	Lys	Ala	Met	Ala	Pro	Leu	Ser	Ser	Gly
				890					895					900
Ile	Asn	Leu	Pro	Leu	Leu	Asp	Arg	Thr	Ile	Pro	Asp	Tyr	Thr	Ser
				905					910					915
Phe	Asn	Thr	Val	Asp	Glu	Trp	Leu	Glu	Ala	Ile	Lys	Met	Gly	Gln
				920					925					930

ES 2 697 327 T3

Tyr Lys Glu Ser Phe Ala Asn Ala Gly Phe Thr Ser Phe Asp Val  
 935 940 945  
 Val Ser Gln Met Met Met Glu Asp Ile Leu Arg Val Gly Val Thr  
 950 955 960  
 Leu Ala Gly His Gln Lys Lys Ile Leu Asn Ser Ile Gln Val Met  
 965 970 975  
 Arg Ala Gln Met Asn Gln Ile Gln Ser Val Glu Val  
 980 985

<210> 23  
 <211> 282  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 23

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

ES 2 697 327 T3

<210> 24  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 24

```

Met Lys Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Met Ala Gly Leu Ala Leu
 1           5           10           15
Gln Pro Gly Thr Ala Leu Leu Cys Tyr Ser Cys Lys Ala Gln Val
           20           25           30
Ser Asn Glu Asp Cys Leu Gln Val Glu Asn Cys Thr Gln Leu Gly
           35           40           45
Glu Gln Cys Trp Thr Ala Arg Ile Arg Ala Val Gly Leu Leu Thr
           50           55           60
Val Ile Ser Lys Gly Cys Ser Leu Asn Cys Val Asp Asp Ser Gln
           65           70           75
Asp Tyr Tyr Val Gly Lys Lys Asn Ile Thr Cys Cys Asp Thr Asp
           80           85           90
Leu Cys Asn Ala Ser Gly Ala His Ala Leu Gln Pro Ala Ala Ala
           95           100          105
Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala Leu Gly Leu Leu Leu Trp Gly Pro
           110          115          120

Gly Gln Leu
  
```

10  
 <210> 25  
 <211> 236  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

```

Met Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Met
 1           5           10           15
Leu Pro Ala Gln Glu Ala Ala Lys Leu Tyr His Thr Asn Tyr Val
           20           25           30
Arg Asn Ser Arg Ala Ile Gly Val Leu Trp Ala Ile Phe Thr Ile
           35           40           45
Cys Phe Ala Ile Val Asn Val Val Cys Phe Ile Gln Pro Tyr Trp
           50           55           60
  
```

ES 2 697 327 T3

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

<210> 26  
 <211> 184  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 26

ES 2 697 327 T3

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

<210> 27  
 <211> 847  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 27



ES 2 697 327 T3

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

ES 2 697 327 T3

Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp  
 200 205 210  
 Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp  
 215 220 225  
 Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His  
 230 235 240  
 Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val  
 245 250 255  
 Arg Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser  
 260 265 270  
 Asn Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser  
 275 280 285  
 Leu Lys Lys Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr  
 290 295 300  
 Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val  
 305 310 315  
 Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala  
 320 325 330  
 Pro Glu Pro Ser Thr Val Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu  
 335 340 345  
 Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu  
 350 355 360  
 Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly  
 365 370 375  
 Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His  
 380 385 390  
 Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly  
 395 400 405  
 Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys  
 410 415 420  
 Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly  
 425 430 435  
 Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser  
 440 445 450  
 Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro  
 455 460 465  
 Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr  
 470 475 480  
 Thr Ile Ala Cys Ala Arg Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser  
 485 490 495  
 Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val  
 500 505 510

ES 2 697 327 T3

Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val  
515 520 525

Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln  
530 535 540

Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln  
545 550 555

Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser  
560 565 570

Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp  
575 580 585

Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met  
590 595 600

Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr  
605 610 615

Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe  
620 625 630

Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg  
635 640 645

Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln  
650 655 660

Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu  
665 670 675

Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val  
680 685 690

Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys Gly  
695 700 705

Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly  
710 715 720

Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys  
725 730 735

Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly  
740 745 750

Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu  
755 760 765

Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser  
770 775 780

Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr  
785 790 795

Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val  
800 805 810

Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu  
815 820 825

ES 2 697 327 T3

Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val  
 830 835 840

Asp Tyr Val Ile Leu Lys His  
 845

5 <210> 28  
 <211> 226  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 28

Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile  
 1 5 10 15

Phe Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys  
 20 25 30

Gln Ala Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser  
 35 40 45

Leu Gly Glu Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn  
 50 55 60

Asn Ala Asn Val Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr  
 65 70 75

Trp Pro Pro Glu Phe Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr  
 80 85 90

Leu Ile Ile Gln Asn Val Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val  
 95 100 105

Cys Arg Val Gln Glu Gly Asn Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly  
 110 115 120

Thr Tyr Leu Arg Val Arg Gln Pro Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp  
 125 130 135

Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile Ile Thr Ala Glu Gly Ile  
 140 145 150

Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly Thr Leu Leu Leu Phe  
 155 160 165

Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu Asp Ala Gly Asp  
 170 175 180

Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp  
 185 190 195

Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly Thr Tyr  
 200 205 210

Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu Lys  
 215 220 225

Pro

10

ES 2 697 327 T3

<210> 29  
 <211> 372  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 29

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

ES 2 697 327 T3

Pro Val Ala Ile Thr Met Cys Glu Phe Leu Gly Leu Ala His Cys  
305 310 315

Cys Leu Asn Pro Met Leu Tyr Thr Phe Ala Gly Val Lys Phe Arg  
320 325 330

Ser Asp Leu Ser Arg Leu Leu Thr Lys Leu Gly Cys Thr Gly Pro  
335 340 345

Ala Ser Leu Cys Gln Leu Phe Pro Ser Trp Arg Arg Ser Ser Leu  
350 355 360

Ser Glu Ser Glu Asn Ala Thr Ser Leu Thr Thr Phe  
365 370

<210> 30  
<211> 273  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 30

5

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

ES 2 697 327 T3

<210> 31  
 <211> 422  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 31

5

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



ES 2 697 327 T3

Val Lys Asp Arg Ser Phe Leu Lys Ser Cys His Phe Gly Pro Lys  
 215 220 225  
 Asn His Tyr Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Ser Val Ile Arg Trp  
 230 235 240  
 Ala Gly Ser Asp Phe Gln Asp Ile Ala Leu Glu Gly Gly Val Ile  
 245 250 255  
 Gly Ile Asn Ile Glu Trp Asn Cys Asp Leu Asp Lys Ala Ala Ser  
 260 265 270  
 Glu Cys His Pro His Tyr Ser Phe Ser Arg Leu Asp Asn Lys Leu  
 275 280 285  
 Ser Lys Ser Val Ser Ser Gly Tyr Asn Phe Arg Phe Ala Arg Tyr  
 290 295 300  
 Tyr Arg Asp Ala Ala Gly Val Glu Phe Arg Thr Leu Met Lys Ala  
 305 310 315  
 Tyr Gly Ile Arg Phe Asp Val Met Val Asn Gly Lys Gly Ala Phe  
 320 325 330  
 Phe Cys Asp Leu Val Leu Ile Tyr Leu Ile Lys Lys Arg Glu Phe  
 335 340 345  
 Tyr Arg Asp Lys Lys Tyr Glu Glu Val Arg Gly Leu Glu Asp Ser  
 350 355 360  
 Ser Gln Glu Ala Glu Asp Glu Ala Ser Gly Leu Gly Leu Ser Glu  
 365 370 375  
 Gln Leu Thr Ser Gly Pro Gly Leu Leu Gly Met Pro Glu Gln Gln  
 380 385 390  
 Glu Leu Gln Glu Pro Pro Glu Ala Lys Arg Gly Ser Ser Ser Gln  
 395 400 405  
 Lys Gly Asn Gly Ser Val Cys Pro Gln Leu Leu Glu Pro His Arg  
 410 415 420  
 Ser Thr

<210> 32  
 <211> 359  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 32

Met Ala Glu Ala Ile Thr Tyr Ala Asp Leu Arg Phe Val Lys Ala  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Lys Lys Ser Ile Ser Ser Arg Leu Gly Gln Asp Pro Gly  
 20 25 30  
 Ala Asp Asp Asp Gly Glu Ile Thr Tyr Glu Asn Val Gln Val Pro  
 35 40 45  
 Ala Val Leu Gly Val Pro Ser Ser Leu Ala Ser Ser Val Leu Gly  
 50 55 60

ES 2 697 327 T3

Asp Lys Ala Ala Val Lys Ser Glu Gln Pro Thr Ala Ser Trp Arg  
 65 70 75  
 Ala Val Thr Ser Pro Ala Val Gly Arg Ile Leu Pro Cys Arg Thr  
 80 85 90  
 Thr Cys Leu Arg Tyr Leu Leu Leu Gly Leu Leu Leu Thr Cys Leu  
 95 100 105  
 Leu Leu Gly Val Thr Ala Ile Cys Leu Gly Val Arg Tyr Leu Gln  
 110 115 120  
 Val Ser Gln Gln Leu Gln Gln Thr Asn Arg Val Leu Glu Val Thr  
 125 130 135  
 Asn Ser Ser Leu Arg Gln Gln Leu Arg Leu Lys Ile Thr Gln Leu  
 140 145 150  
 Gly Gln Ser Ala Glu Asp Leu Gln Gly Ser Arg Arg Glu Leu Ala  
 155 160 165  
 Gln Ser Gln Glu Ala Leu Gln Val Glu Gln Arg Ala His Gln Ala  
 170 175 180  
 Ala Glu Gly Gln Leu Gln Ala Cys Gln Ala Asp Arg Gln Lys Thr  
 185 190 195  
 Lys Glu Thr Leu Gln Ser Glu Glu Gln Gln Arg Arg Ala Leu Glu  
 200 205 210  
 Gln Lys Leu Ser Asn Met Glu Asn Arg Leu Lys Pro Phe Phe Thr  
 215 220 225  
 Cys Gly Ser Ala Asp Thr Cys Cys Pro Ser Gly Trp Ile Met His  
 230 235 240  
 Gln Lys Ser Cys Phe Tyr Ile Ser Leu Thr Ser Lys Asn Trp Gln  
 245 250 255  
 Glu Ser Gln Lys Gln Cys Glu Thr Leu Ser Ser Lys Leu Ala Thr  
 260 265 270  
 Phe Ser Glu Ile Tyr Pro Gln Ser His Ser Tyr Tyr Phe Leu Asn  
 275 280 285  
 Ser Leu Leu Pro Asn Gly Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Trp Thr Gly  
 290 295 300  
 Leu Ser Ser Asn Lys Asp Trp Lys Leu Thr Asp Asp Thr Gln Arg  
 305 310 315  
 Thr Arg Thr Tyr Ala Gln Ser Ser Lys Cys Asn Lys Val His Lys  
 320 325 330  
 Thr Trp Ser Trp Trp Thr Leu Glu Ser Glu Ser Cys Arg Ser Ser  
 335 340 345  
 Leu Pro Tyr Ile Cys Glu Met Thr Ala Phe Arg Phe Pro Asp  
 350 355

ES 2 697 327 T3

<210> 33  
 <211> 661  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 33

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

ES 2 697 327 T3

Gln Glu Leu Asp Leu Thr Ala Thr His Leu Lys Gly Leu Pro Ser  
305 310 315

Gly Met Lys Gly Leu Asn Leu Leu Lys Lys Leu Val Leu Ser Val  
320 325 330

Asn His Phe Asp Gln Leu Cys Gln Ile Ser Ala Ala Asn Phe Pro  
335 340 345

Ser Leu Thr His Leu Tyr Ile Arg Gly Asn Val Lys Lys Leu His  
350 355 360

Leu Gly Val Gly Cys Leu Glu Lys Leu Gly Asn Leu Gln Thr Leu  
365 370 375

Asp Leu Ser His Asn Asp Ile Glu Ala Ser Asp Cys Cys Ser Leu  
380 385 390

Gln Leu Lys Asn Leu Ser His Leu Gln Thr Leu Asn Leu Ser His  
395 400 405

Asn Glu Pro Leu Gly Leu Gln Ser Gln Ala Phe Lys Glu Cys Pro  
410 415 420

Gln Leu Glu Leu Leu Asp Leu Ala Phe Thr Arg Leu His Ile Asn  
425 430 435

Ala Pro Gln Ser Pro Phe Gln Asn Leu His Phe Leu Gln Val Leu  
440 445 450

Asn Leu Thr Tyr Cys Phe Leu Asp Thr Ser Asn Gln His Leu Leu  
455 460 465

Ala Gly Leu Pro Val Leu Arg His Leu Asn Leu Lys Gly Asn His  
470 475 480

Phe Gln Asp Gly Thr Ile Thr Lys Thr Asn Leu Leu Gln Thr Val  
485 490 495

Gly Ser Leu Glu Val Leu Ile Leu Ser Ser Cys Gly Leu Leu Ser  
500 505 510

Ile Asp Gln Gln Ala Phe His Ser Leu Gly Lys Met Ser His Val  
515 520 525

Asp Leu Ser His Asn Ser Leu Thr Cys Asp Ser Ile Asp Ser Leu  
530 535 540

Ser His Leu Lys Gly Ile Tyr Leu Asn Leu Ala Ala Asn Ser Ile  
545 550 555

Asn Ile Ile Ser Pro Arg Leu Leu Pro Ile Leu Ser Gln Gln Ser  
560 565 570

Thr Ile Asn Leu Ser His Asn Pro Leu Asp Cys Thr Cys Ser Asn  
575 580 585

Ile His Phe Leu Thr Trp Tyr Lys Glu Asn Leu His Lys Leu Glu  
590 595 600

Gly Ser Glu Glu Thr Thr Cys Ala Asn Pro Pro Ser Leu Arg Gly  
605 610 615

ES 2 697 327 T3

Val Lys Leu Ser Asp Val Lys Leu Ser Cys Gly Ile Thr Ala Ile  
 620 625 630  
 Gly Ile Phe Phe Leu Ile Val Phe Leu Leu Leu Leu Ala Ile Leu  
 635 640 645  
 Leu Phe Phe Ala Val Lys Tyr Leu Leu Arg Trp Lys Tyr Gln His  
 650 655 660  
 Ile

5 <210> 34  
 <211> 429  
 <212> PRT  
 <213> Sarcophaga bullata  
 <400> 34

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

ES 2 697 327 T3

Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro Pro Ile Leu Tyr  
 230 235 240

Trp Phe Tyr His Glu Asp Ile Thr Leu Gly Ser Arg Ser Ala Pro  
 245 250 255

Ser Gly Gly Gly Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Glu Glu His  
 260 265 270

Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asn Asn Gly Leu Gly Ala Gln  
 275 280 285

Arg Ser Glu Ala Val Thr Leu Asn Phe Thr Val Pro Thr Gly Ala  
 290 295 300

Arg Ser Asn His Leu Thr Ser Gly Val Ile Glu Gly Leu Leu Ser  
 305 310 315

Thr Leu Gly Pro Ala Thr Val Ala Leu Leu Phe Cys Tyr Gly Leu  
 320 325 330

Lys Arg Lys Ile Gly Arg Arg Ser Ala Arg Asp Pro Leu Arg Ser  
 335 340 345

Leu Pro Ser Pro Leu Pro Gln Glu Phe Thr Tyr Leu Asn Ser Pro  
 350 355 360

Thr Pro Gly Gln Leu Gln Pro Ile Tyr Glu Asn Val Asn Val Val  
 365 370 375

Ser Gly Asp Glu Val Tyr Ser Leu Ala Tyr Tyr Asn Gln Pro Glu  
 380 385 390

Gln Glu Ser Val Ala Ala Glu Thr Leu Gly Thr His Met Glu Asp  
 395 400 405

Lys Val Ser Leu Asp Ile Tyr Ser Arg Leu Arg Lys Ala Asn Ile  
 410 415 420

Thr Asp Val Asp Tyr Glu Asp Ala Met  
 425

5 <210> 35  
 <211> 977  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 35

Met Leu Leu Trp Val Ile Leu Leu Val Leu Ala Pro Val Ser Gly  
 1 5 10 15

Gln Phe Ala Arg Thr Pro Arg Pro Ile Ile Phe Leu Gln Pro Pro  
 20 25 30

Trp Thr Thr Val Phe Gln Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys  
 35 40 45

Gly Phe Arg Phe Tyr Ser Pro Gln Lys Thr Lys Trp Tyr His Arg  
 50 55 60

Tyr Leu Gly Lys Glu Ile Leu Arg Glu Thr Pro Asp Asn Ile Leu  
 65 70 75

ES 2 697 327 T3

Glu	Val	Gln	Glu	Ser	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Gln	Ala	Gln	Gly	Ser
				80					85					90
Pro	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	His	Leu	Asp	Phe	Ser	Ser	Ala	Ser	Leu
				95					100					105
Ile	Leu	Gln	Ala	Pro	Leu	Ser	Val	Phe	Glu	Gly	Asp	Ser	Val	Val
				110					115					120
Leu	Arg	Cys	Arg	Ala	Lys	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Asn	Asn	Thr	Ile
				125					130					135
Tyr	Lys	Asn	Asp	Asn	Val	Leu	Ala	Phe	Leu	Asn	Lys	Arg	Thr	Asp
				140					145					150
Phe	His	Ile	Pro	His	Ala	Cys	Leu	Lys	Asp	Asn	Gly	Ala	Tyr	Arg
				155					160					165
Cys	Thr	Gly	Tyr	Lys	Glu	Ser	Cys	Cys	Pro	Val	Ser	Ser	Asn	Thr
				170					175					180
Val	Lys	Ile	Gln	Val	Gln	Glu	Pro	Phe	Thr	Arg	Pro	Val	Leu	Arg
				185					190					195
Ala	Ser	Ser	Phe	Gln	Pro	Ile	Ser	Gly	Asn	Pro	Val	Thr	Leu	Thr
				200					205					210
Cys	Glu	Thr	Gln	Leu	Ser	Leu	Glu	Arg	Ser	Asp	Val	Pro	Leu	Arg
				215					220					225
Phe	Arg	Phe	Phe	Arg	Asp	Asp	Gln	Thr	Leu	Gly	Leu	Gly	Trp	Ser
				230					235					240
Leu	Ser	Pro	Asn	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Met	Trp	Ser	Lys	Asp	Ser
				245					250					255
Gly	Phe	Tyr	Trp	Cys	Lys	Ala	Ala	Thr	Met	Pro	His	Ser	Val	Ile
				260					265					270
Ser	Asp	Ser	Pro	Arg	Ser	Trp	Ile	Gln	Val	Gln	Ile	Pro	Ala	Ser
				275					280					285
His	Pro	Val	Leu	Thr	Leu	Ser	Pro	Glu	Lys	Ala	Leu	Asn	Phe	Glu
				290					295					300
Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Leu	His	Cys	Glu	Thr	Gln	Glu	Asp	Ser	Leu
				305					310					315
Arg	Thr	Leu	Tyr	Arg	Phe	Tyr	His	Glu	Gly	Val	Pro	Leu	Arg	His
				320					325					330
Lys	Ser	Val	Arg	Cys	Glu	Arg	Gly	Ala	Ser	Ile	Ser	Phe	Ser	Leu
				335					340					345
Thr	Thr	Glu	Asn	Ser	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ala	Asp	Asn	Gly
				350					355					360
Leu	Gly	Ala	Lys	Pro	Ser	Lys	Ala	Val	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Val
				365					370					375
Pro	Val	Ser	His	Pro	Val	Leu	Asn	Leu	Ser	Ser	Pro	Glu	Asp	Leu
				380					385					390

ES 2 697 327 T3

Ile Phe Glu Gly	Ala Lys Val Thr Leu	His Cys Glu Ala Gln Arg	395	400	405
Gly Ser Leu Pro	Ile Leu Tyr Gln Phe	His His Glu Asp Ala Ala	410	415	420
Leu Glu Arg Arg	Ser Ala Asn Ser Ala	Gly Gly Val Ala Ile Ser	425	430	435
Phe Ser Leu Thr	Ala Glu His Ser Gly	Asn Tyr Tyr Cys Thr Ala	440	445	450
Asp Asn Gly Phe	Gly Pro Gln Arg Ser	Lys Ala Val Ser Leu Ser	455	460	465
Ile Thr Val Pro	Val Ser His Pro Val	Leu Thr Leu Ser Ser Ala	470	475	480
Glu Ala Leu Thr	Phe Glu Gly Ala Thr	Val Thr Leu His Cys Glu	485	490	495
Val Gln Arg Gly	Ser Pro Gln Ile Leu	Tyr Gln Phe Tyr His Glu	500	505	510
Asp Met Pro Leu	Trp Ser Ser Ser Thr	Pro Ser Val Gly Arg Val	515	520	525
Ser Phe Ser Phe	Ser Leu Thr Glu Gly	His Ser Gly Asn Tyr Tyr	530	535	540
Cys Thr Ala Asp	Asn Gly Phe Gly Pro	Gln Arg Ser Glu Val Val	545	550	555
Ser Leu Phe Val	Thr Val Pro Val Ser	Arg Pro Ile Leu Thr Leu	560	565	570
Arg Val Pro Arg	Ala Gln Ala Val Val	Gly Asp Leu Leu Glu Leu	575	580	585
His Cys Glu Ala	Pro Arg Gly Ser Pro	Pro Ile Leu Tyr Trp Phe	590	595	600
Tyr His Glu Asp	Val Thr Leu Gly Ser	Ser Ser Ala Pro Ser Gly	605	610	615
Gly Glu Ala Ser	Phe Asn Leu Ser Leu	Thr Ala Glu His Ser Gly	620	625	630
Asn Tyr Ser Cys	Glu Ala Asn Asn Gly	Leu Val Ala Gln His Ser	635	640	645
Asp Thr Ile Ser	Leu Ser Val Ile Val	Pro Val Ser Arg Pro Ile	650	655	660
Leu Thr Phe Arg	Ala Pro Arg Ala Gln	Ala Val Val Gly Asp Leu	665	670	675
Leu Glu Leu His	Cys Glu Ala Leu Arg	Gly Ser Ser Pro Ile Leu	680	685	690
Tyr Trp Phe Tyr	His Glu Asp Val Thr	Leu Gly Lys Ile Ser Ala	695	700	705



ES 2 697 327 T3

Pro Ser Gly Gly Gly Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Thr Glu  
 710 715 720  
 His Ser Gly Ile Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Pro Glu Ala  
 725 730 735  
 Gln Arg Ser Glu Met Val Thr Leu Lys Val Ala Val Pro Val Ser  
 740 745 750  
 Arg Pro Val Leu Thr Leu Arg Ala Pro Gly Thr His Ala Ala Val  
 755 760 765  
 Gly Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro  
 770 775 780  
 Leu Ile Leu Tyr Arg Phe Phe His Glu Asp Val Thr Leu Gly Asn  
 785 790 795  
 Arg Ser Ser Pro Ser Gly Gly Ala Ser Leu Asn Leu Ser Leu Thr  
 800 805 810  
 Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Leu  
 815 820 825  
 Gly Ala Gln Arg Ser Glu Thr Val Thr Leu Tyr Ile Thr Gly Leu  
 830 835 840  
 Thr Ala Asn Arg Ser Gly Pro Phe Ala Thr Gly Val Ala Gly Gly  
 845 850 855  
 Leu Leu Ser Ile Ala Gly Leu Ala Ala Gly Ala Leu Leu Leu Tyr  
 860 865 870  
 Cys Trp Leu Ser Arg Lys Ala Gly Arg Lys Pro Ala Ser Asp Pro  
 875 880 885  
 Ala Arg Ser Pro Pro Asp Ser Asp Ser Gln Glu Pro Thr Tyr His  
 890 895 900  
 Asn Val Pro Ala Trp Glu Glu Leu Gln Pro Val Tyr Thr Asn Ala  
 905 910 915  
 Asn Pro Arg Gly Glu Asn Val Val Tyr Ser Glu Val Arg Ile Ile  
 920 925 930  
 Gln Glu Lys Lys Lys His Ala Val Ala Ser Asp Pro Arg His Leu  
 935 940 945  
 Arg Asn Lys Gly Ser Pro Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Val Ala  
 950 955 960  
 Ser Thr Pro Val Ser Gly Ser Leu Phe Leu Ala Ser Ser Ala Pro  
 965 970 975  
 His Arg

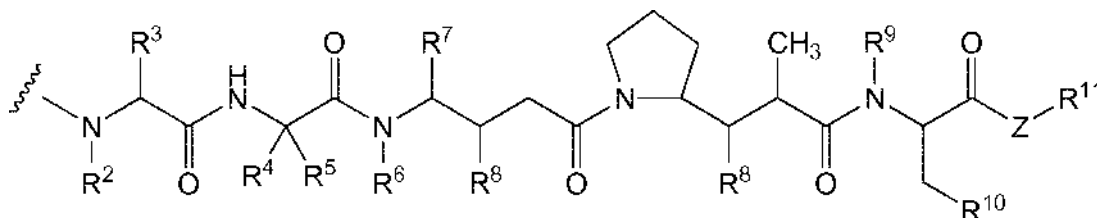
## REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que tiene la fórmula:

5 LU-D<sub>F</sub>

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

10 LU- es una Unidad enlazadora que comprende un grupo funcional capaz de unirse a un ligando o a un anticuerpo, y  
D<sub>F</sub> es un grupo que tiene la siguiente fórmula:



15 en la que:  
independientemente en cada localización:

R<sup>2</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  
R<sup>3</sup> se selecciona de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>),  
20 heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);  
R<sup>4</sup> se selecciona de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>),  
heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);  
R<sup>5</sup> se selecciona entre H y metilo;

25 o:

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

45 2. Un conjugado de la reivindicación 1, en el que la Unidad enlazadora comprende:



50 en la que

-A- es una Unidad ensanchadora,  
a es 0 o 1,  
cada -W- es independientemente una Unidad de aminoácido,  
w es un número entero comprendido entre 0 y 12,  
55 -Y- es una Unidad separadora, y  
y es 0, 1 o 2.

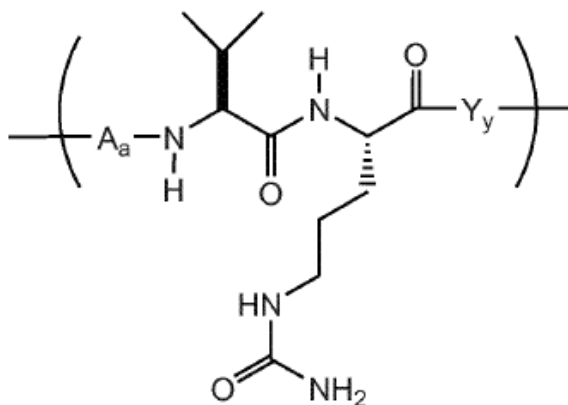
3. Un conjugado de la reivindicación 2, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde w  
es un número entero comprendido entre 2 y 12.

4. Un conjugado de la reivindicación 2, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde w es 2.

5 5. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 2, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde  $W_w$  es -valina-citrulina-, -fenilalanina-lisina- o -N-metil valina-citrulina-.

6. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 2, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde  $W_w$  es -valina-citrulina-.

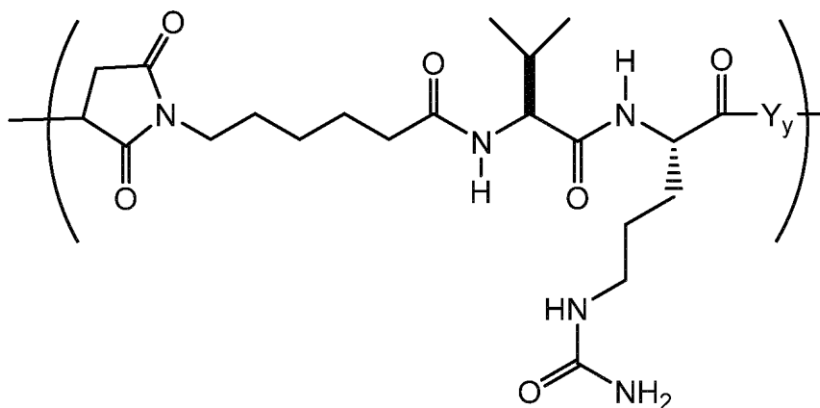
7. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 2, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde la Unidad enlazadora comprende:



15

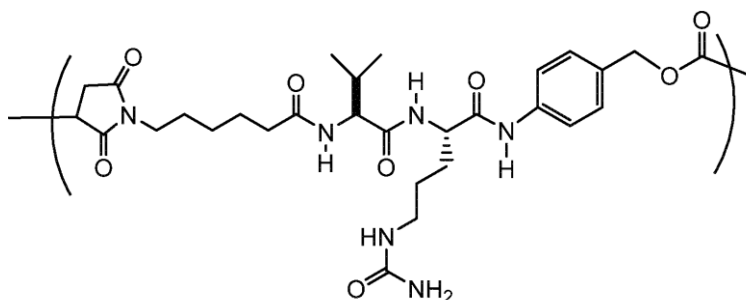
8. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 2, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde la Unidad enlazadora comprende:

20



9. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 2, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde la Unidad enlazadora comprende:

25





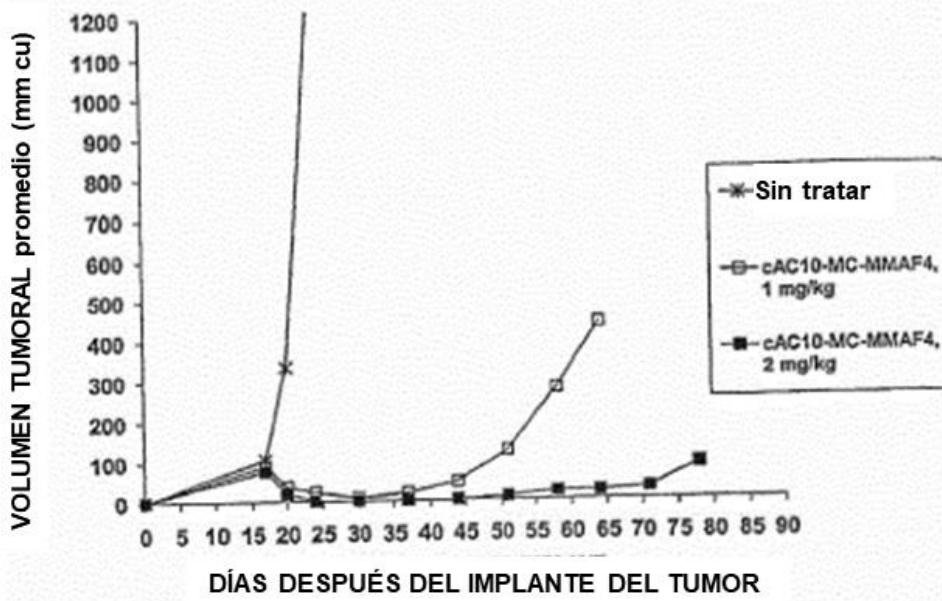


FIGURA 1

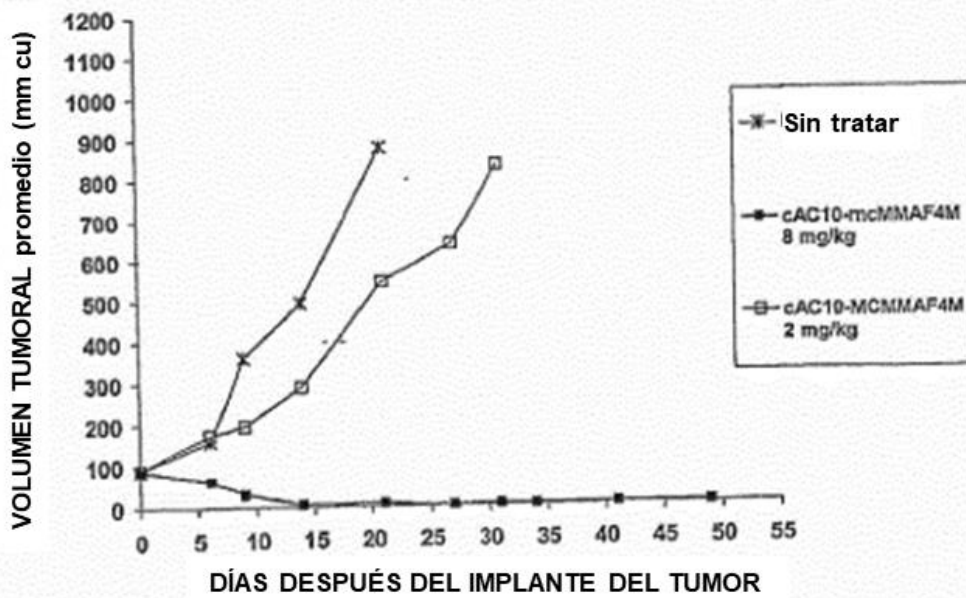
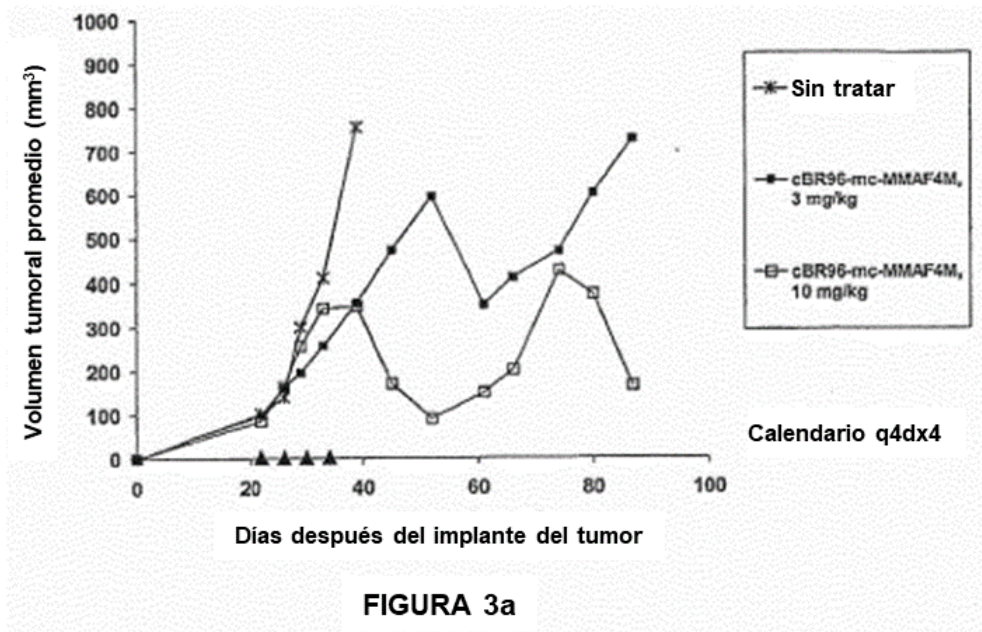


FIGURA 2



### Eficacia de mAb-mc-MMAF en carcinoma de pulmón L2987

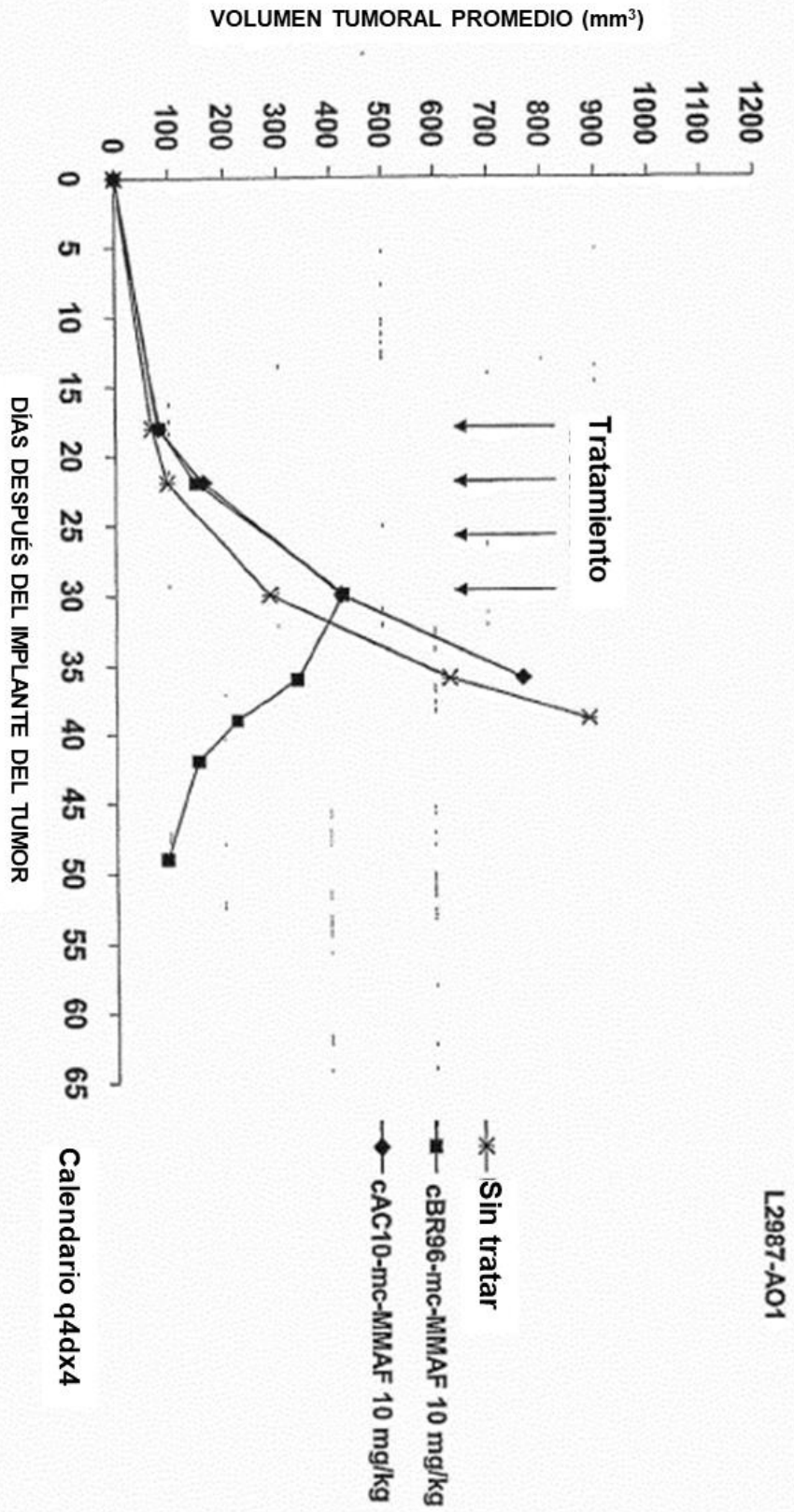


Figura 3b

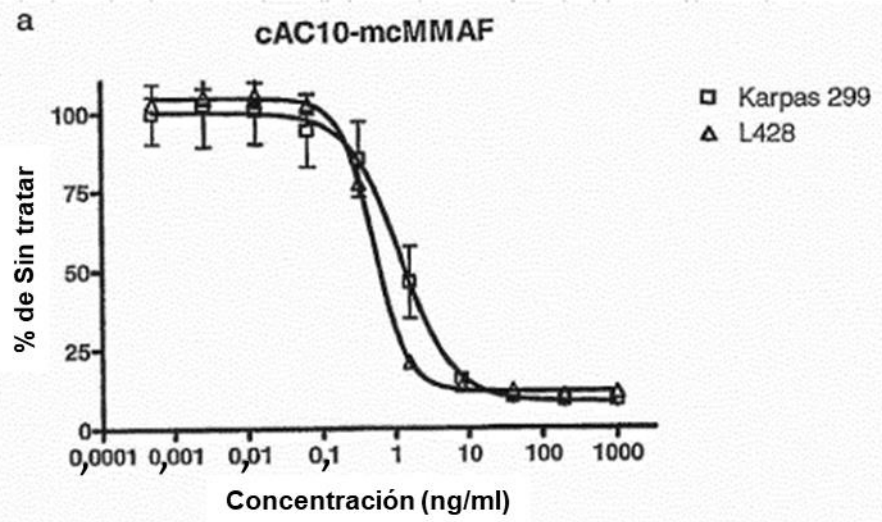


FIGURA 4a

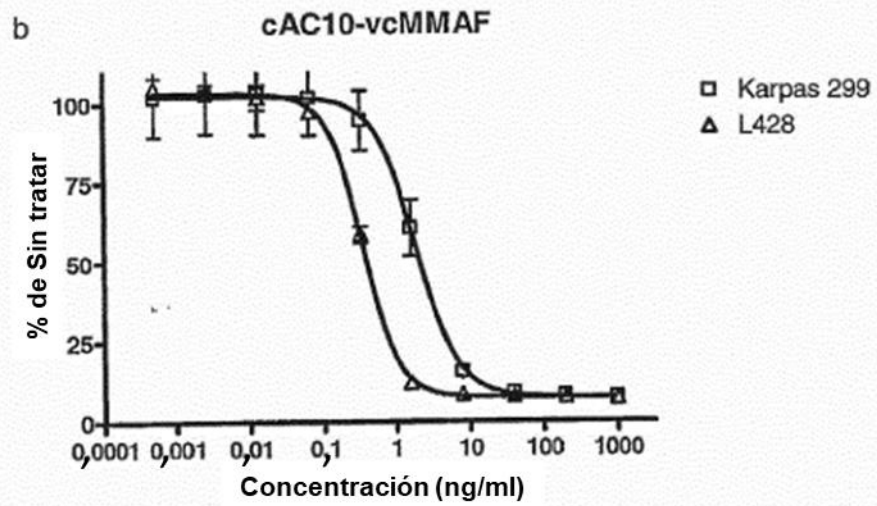


FIGURA 4b



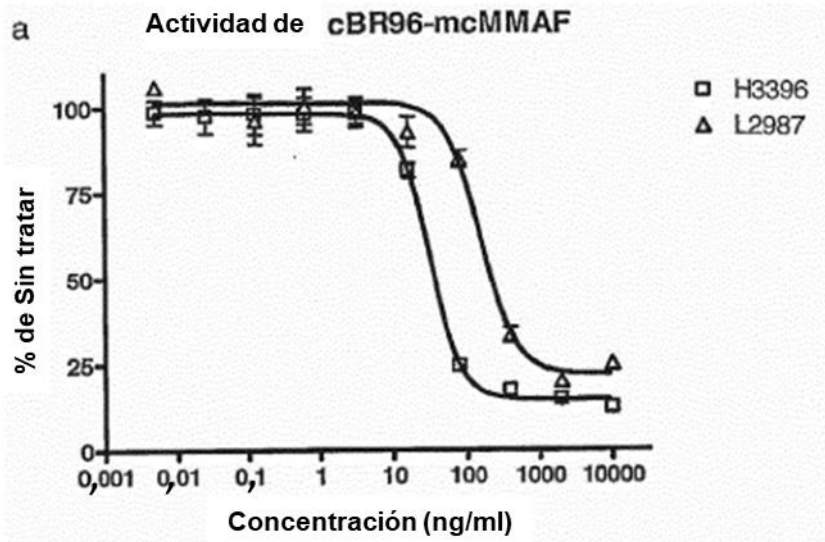


FIGURA 5a

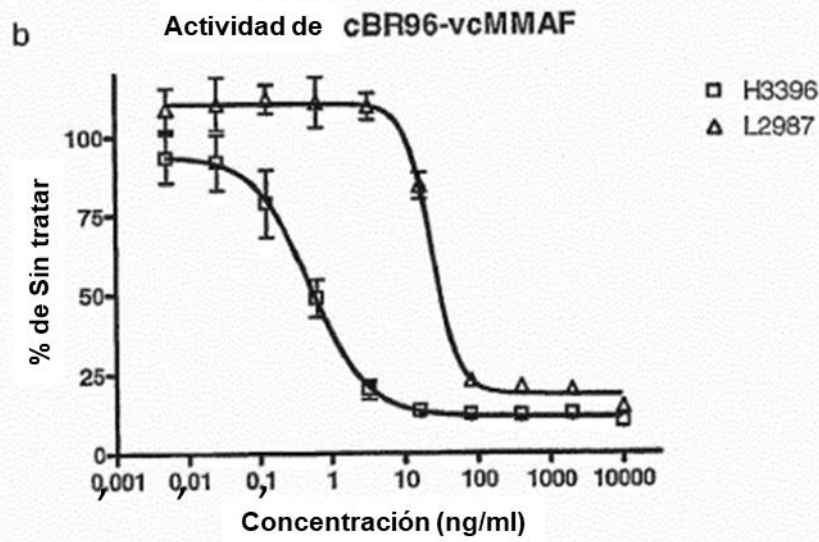


FIGURA 5b

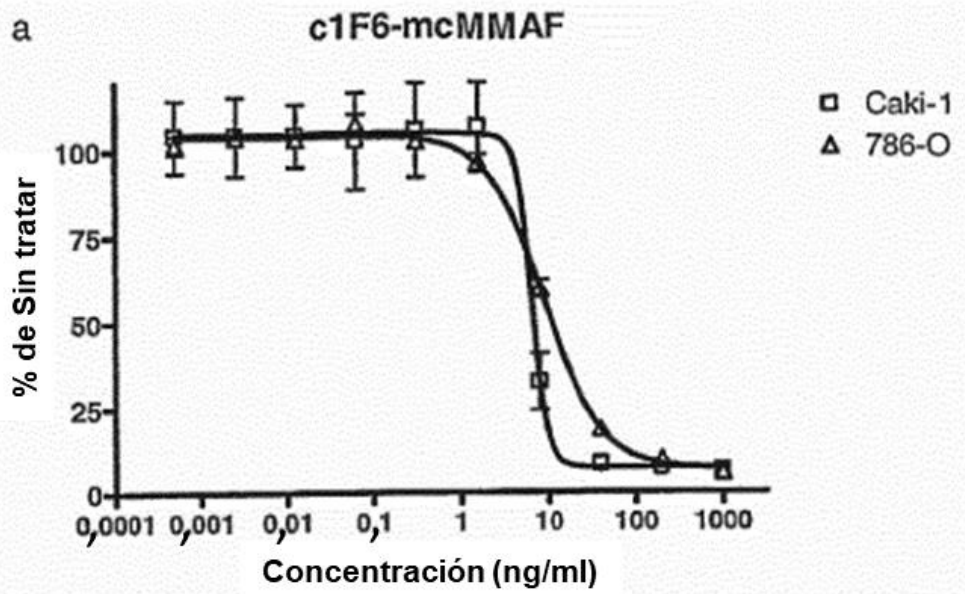


FIGURA 6a

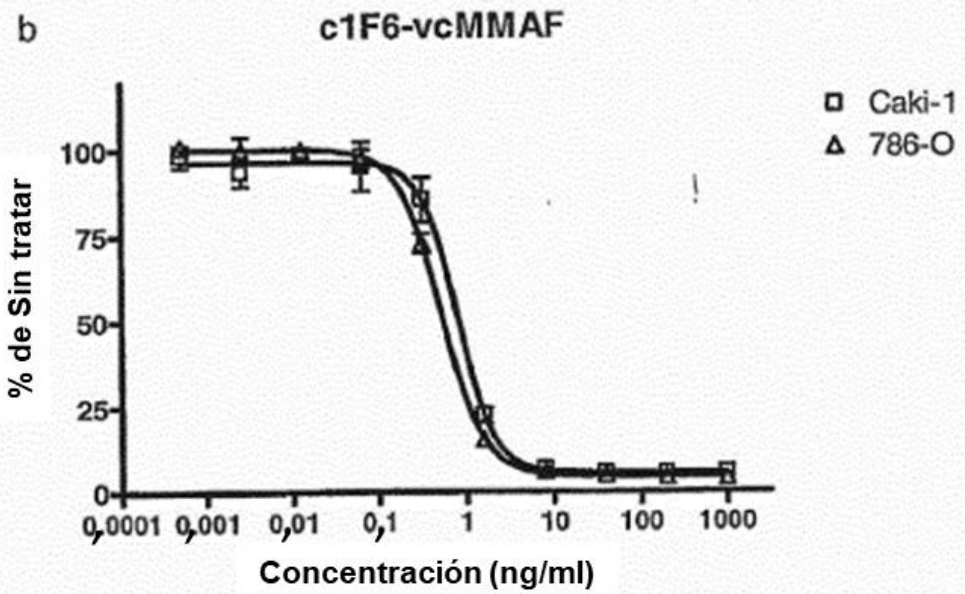


FIGURA 6b

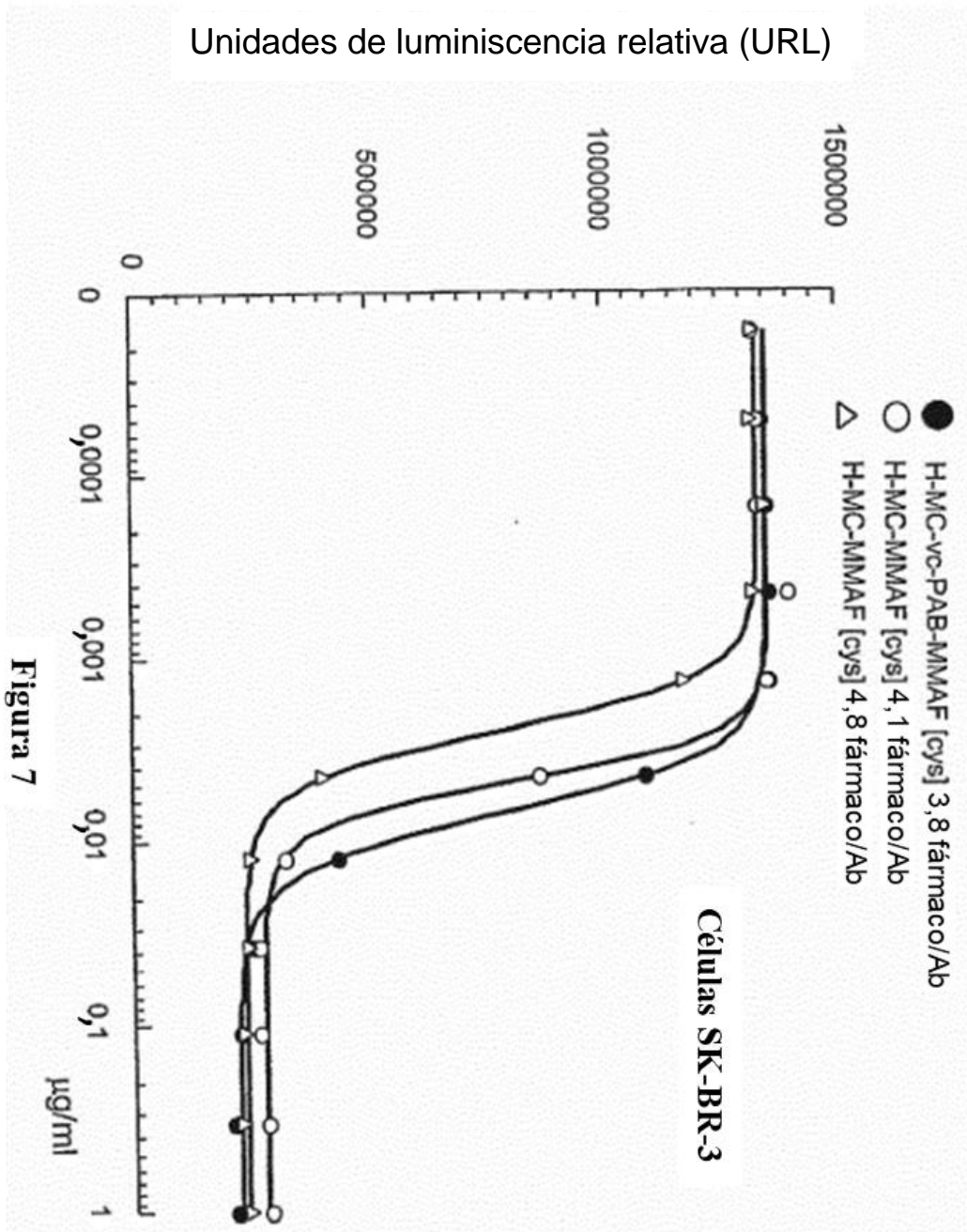
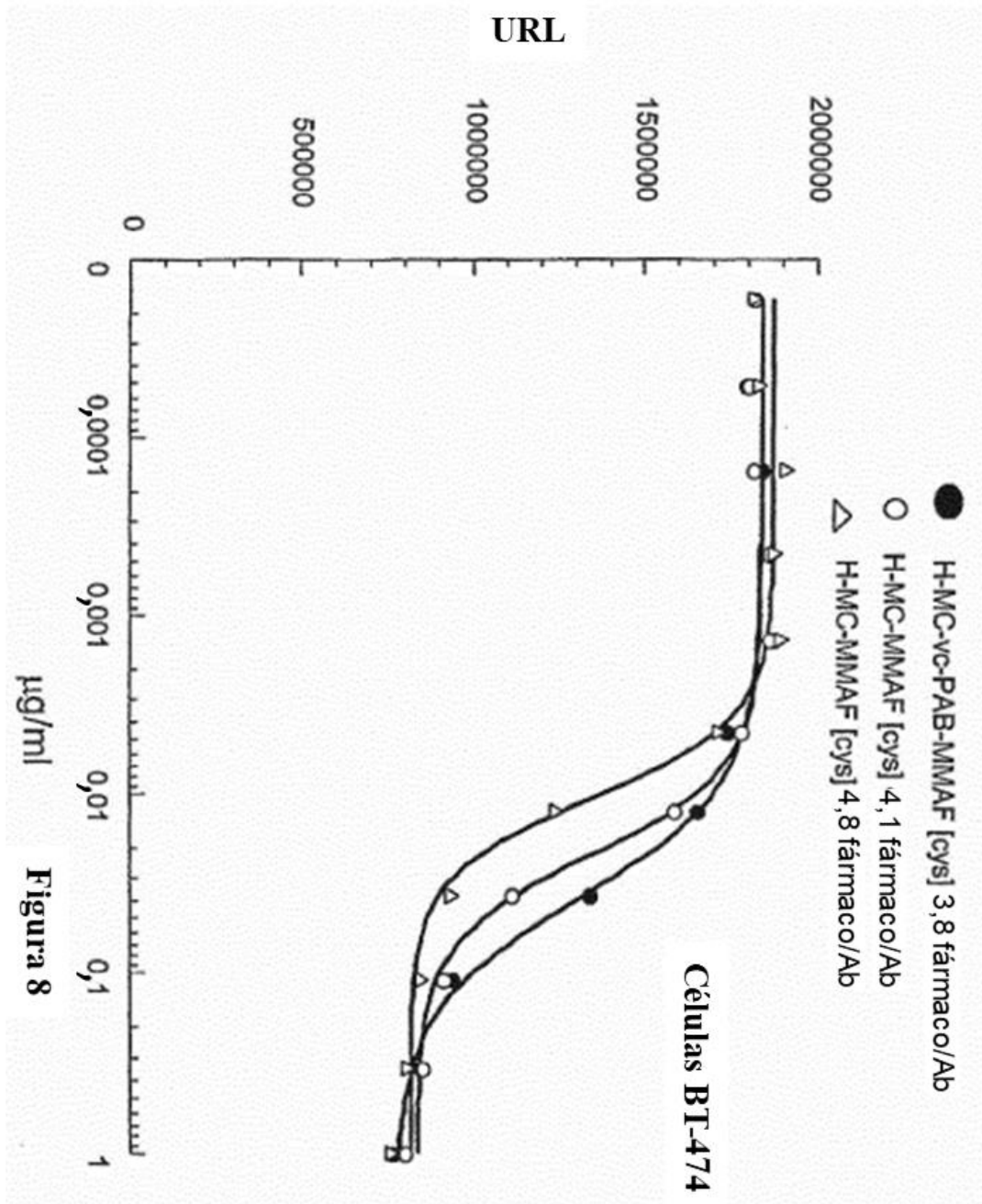
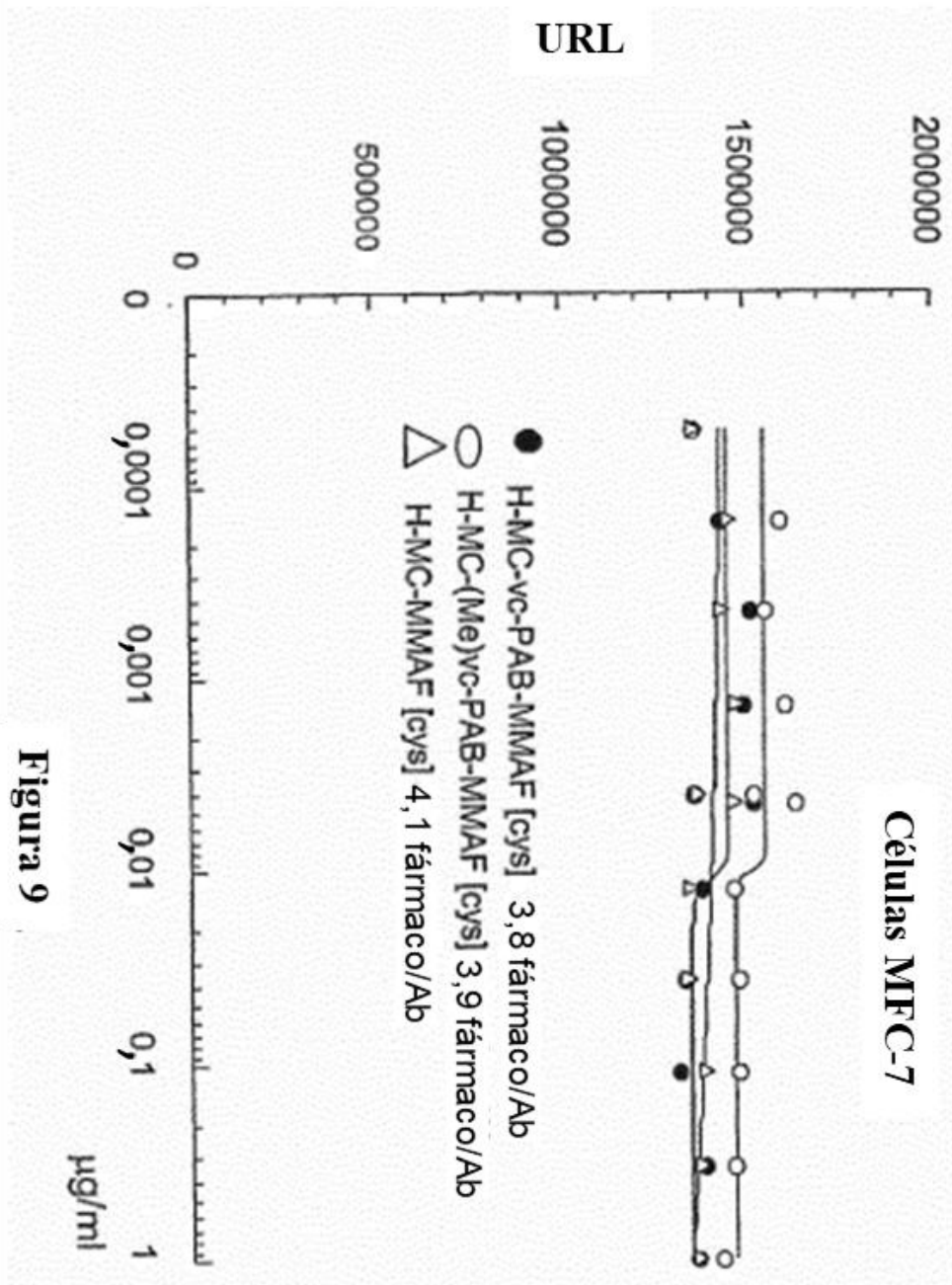
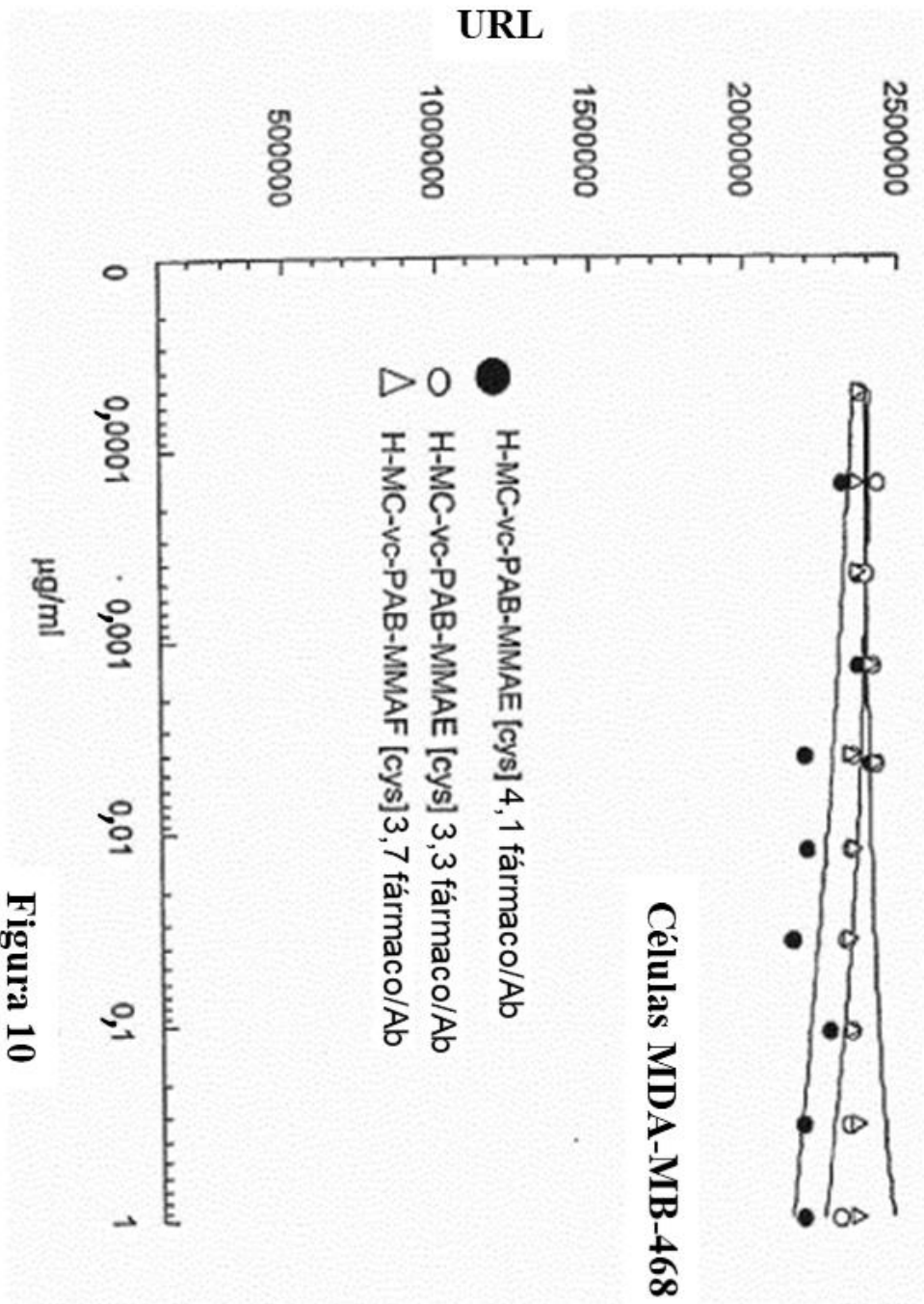


Figura 7





**Figura 9**



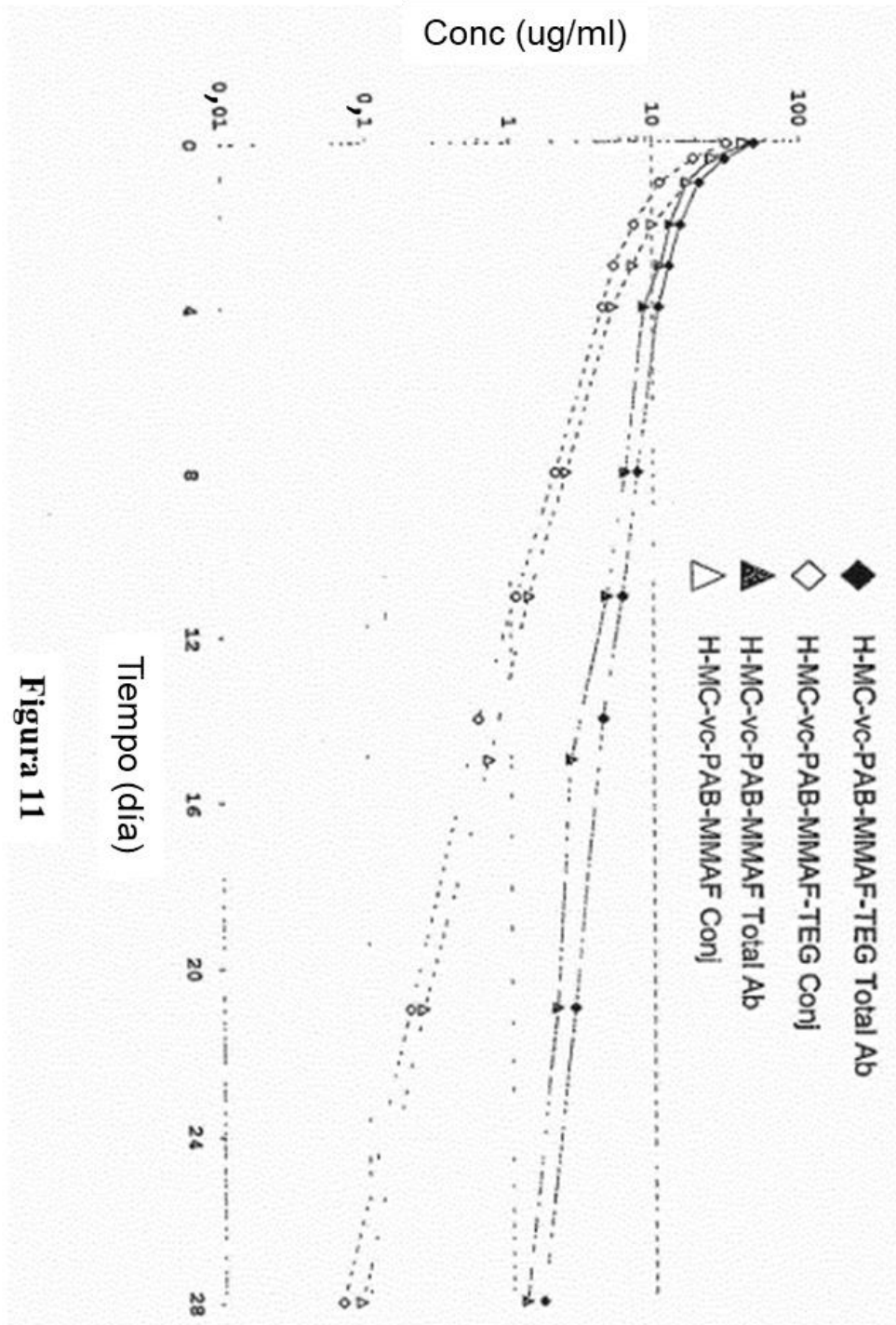
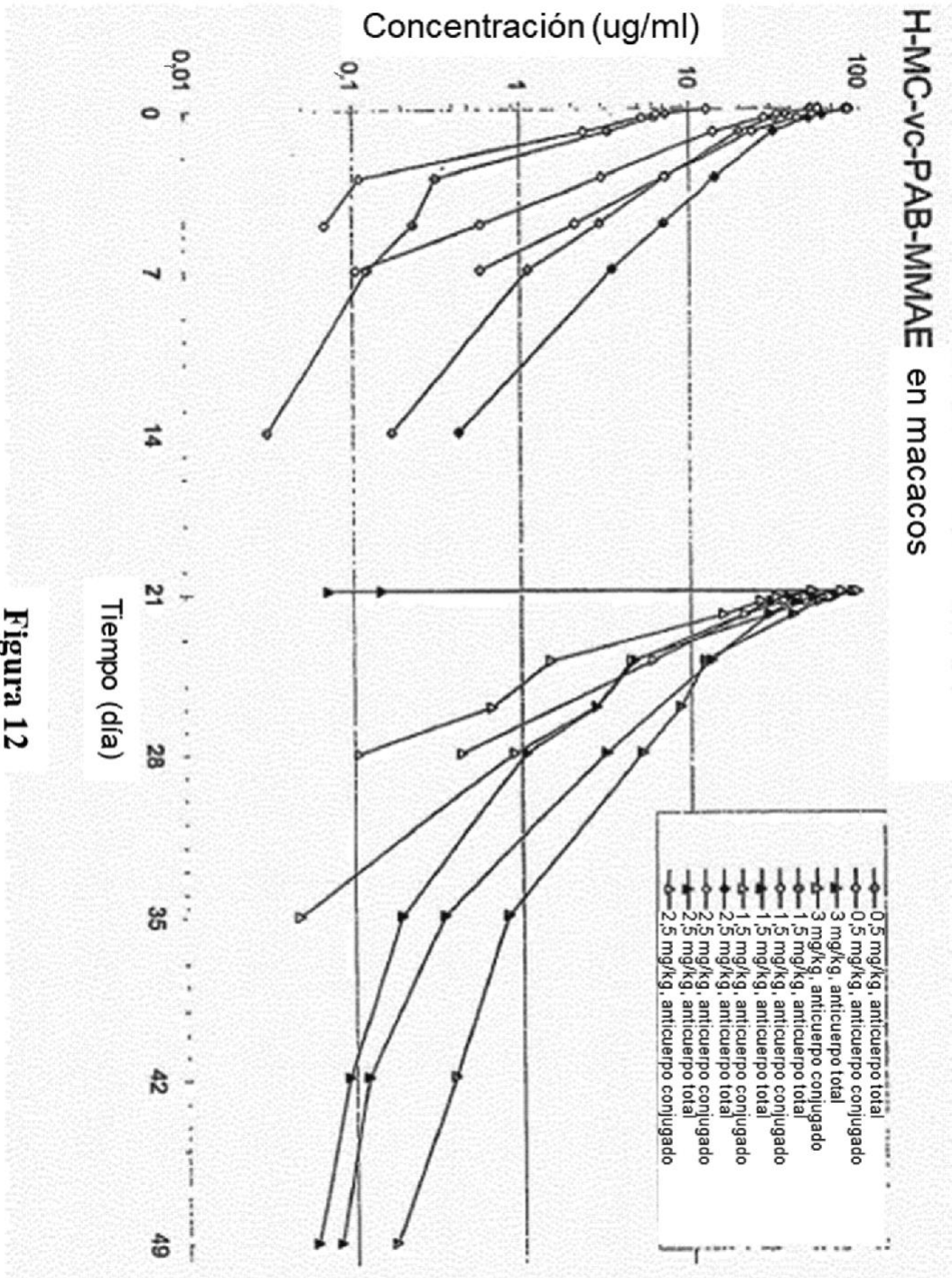


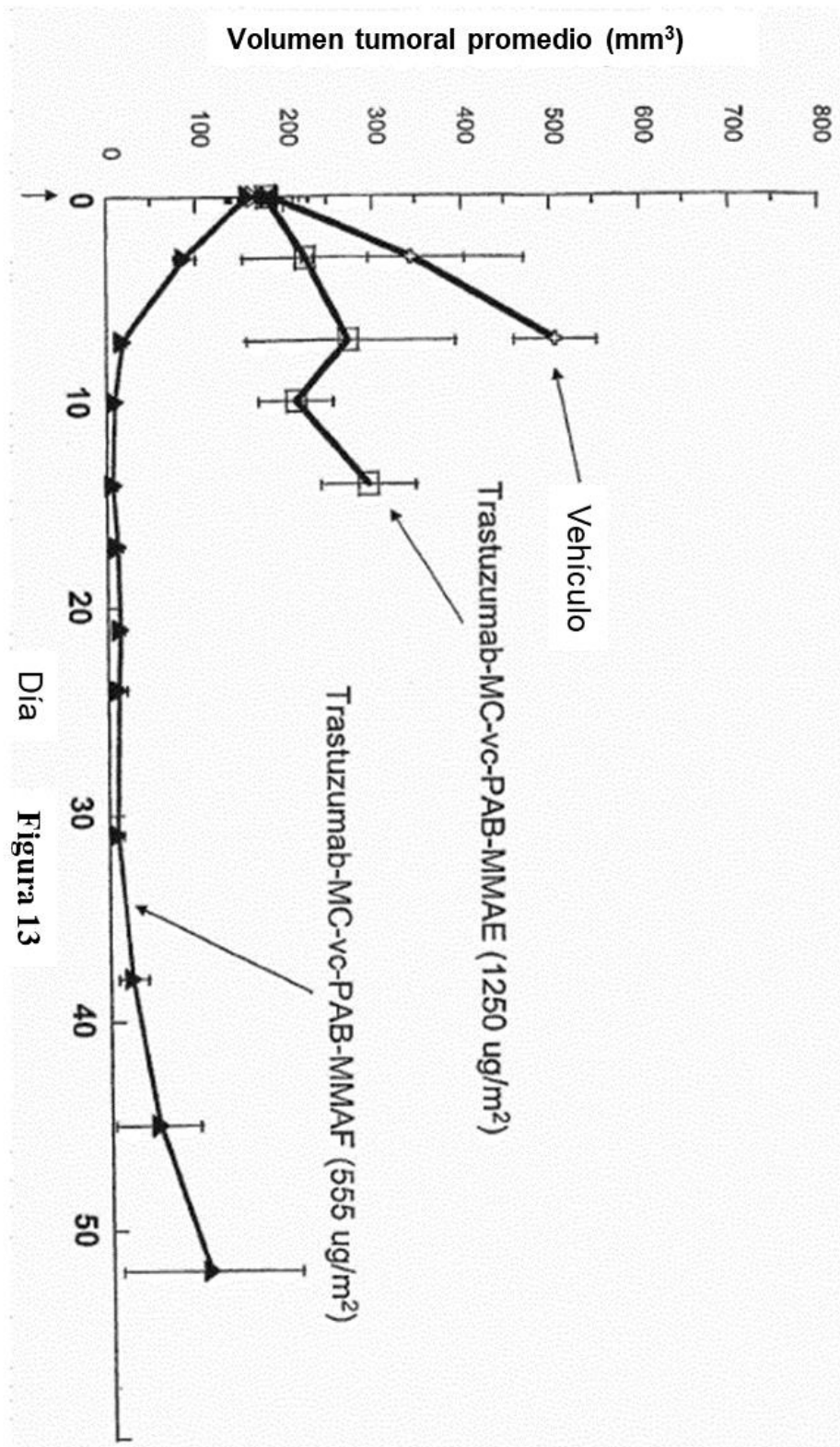
Figura 11





**Figura 12**





Día Figura 13

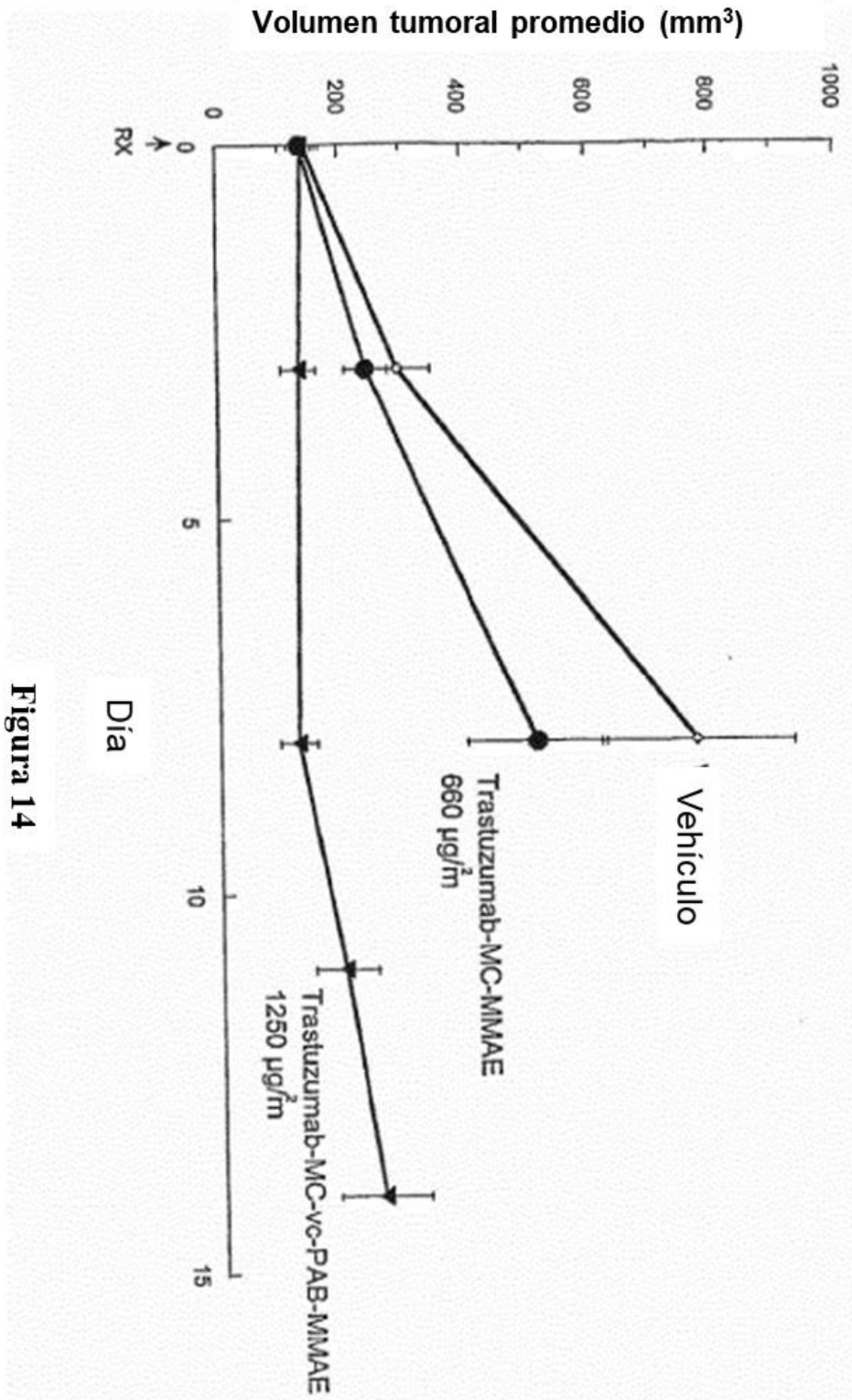


Figura 14

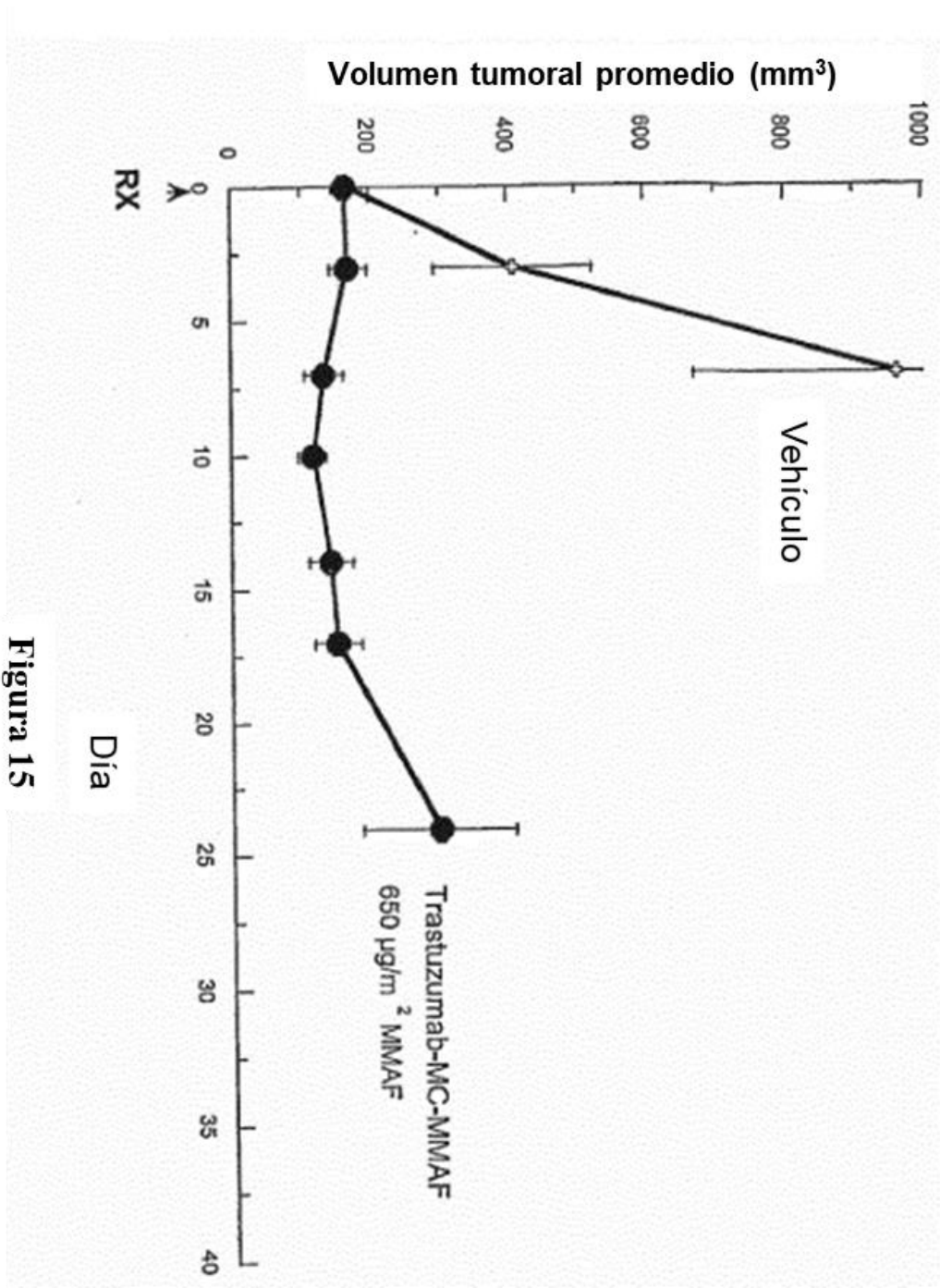
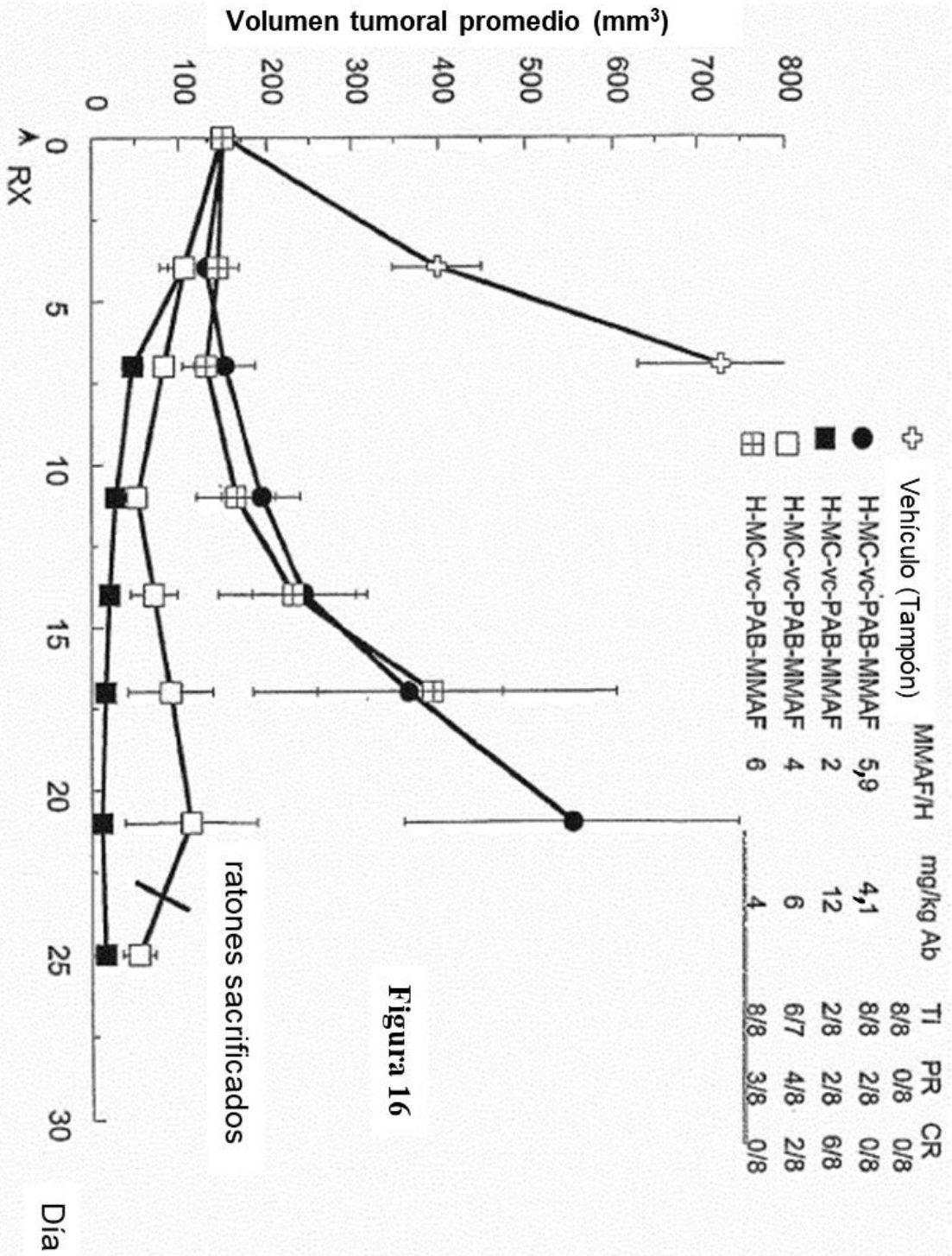


Figura 15



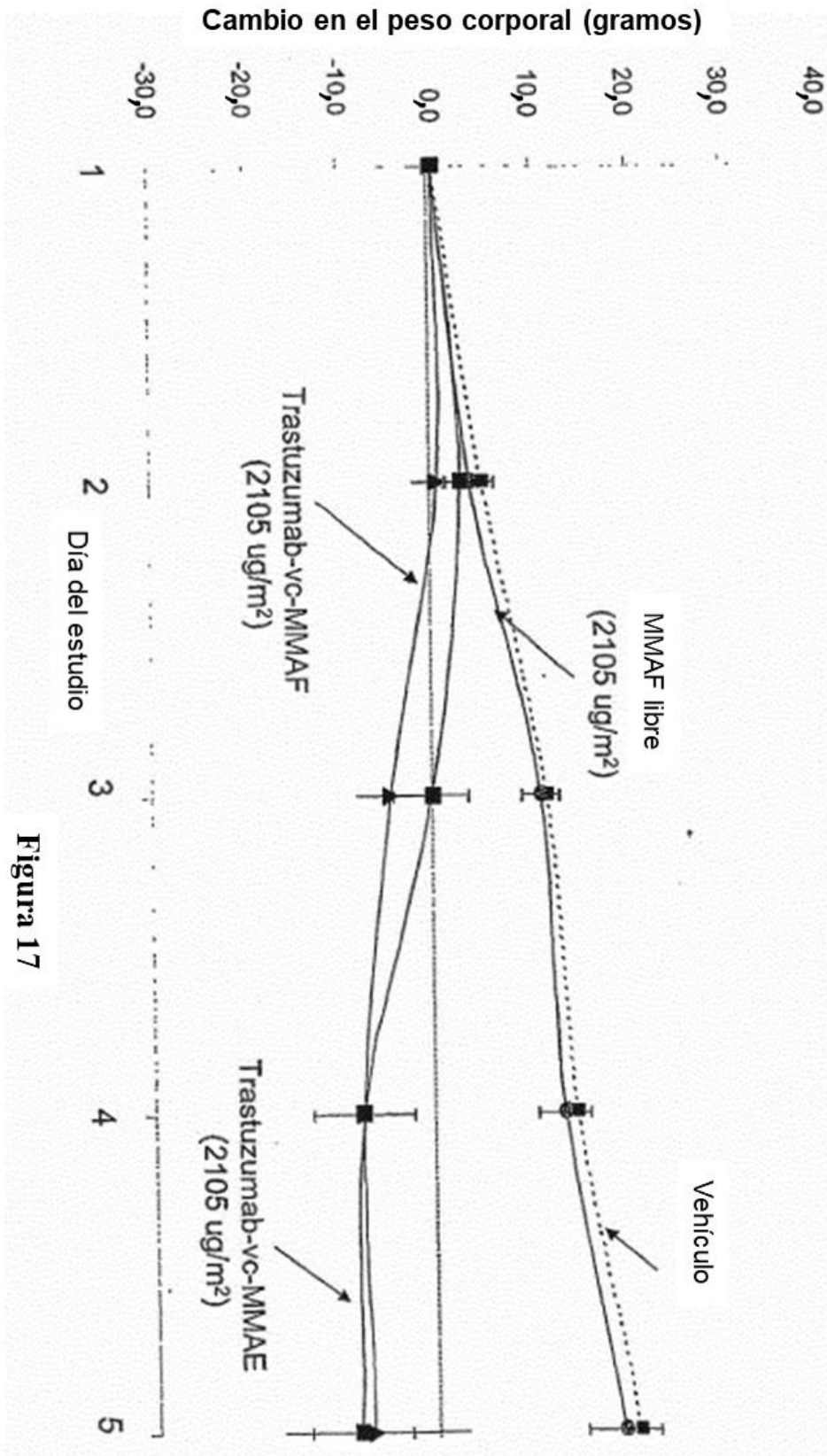
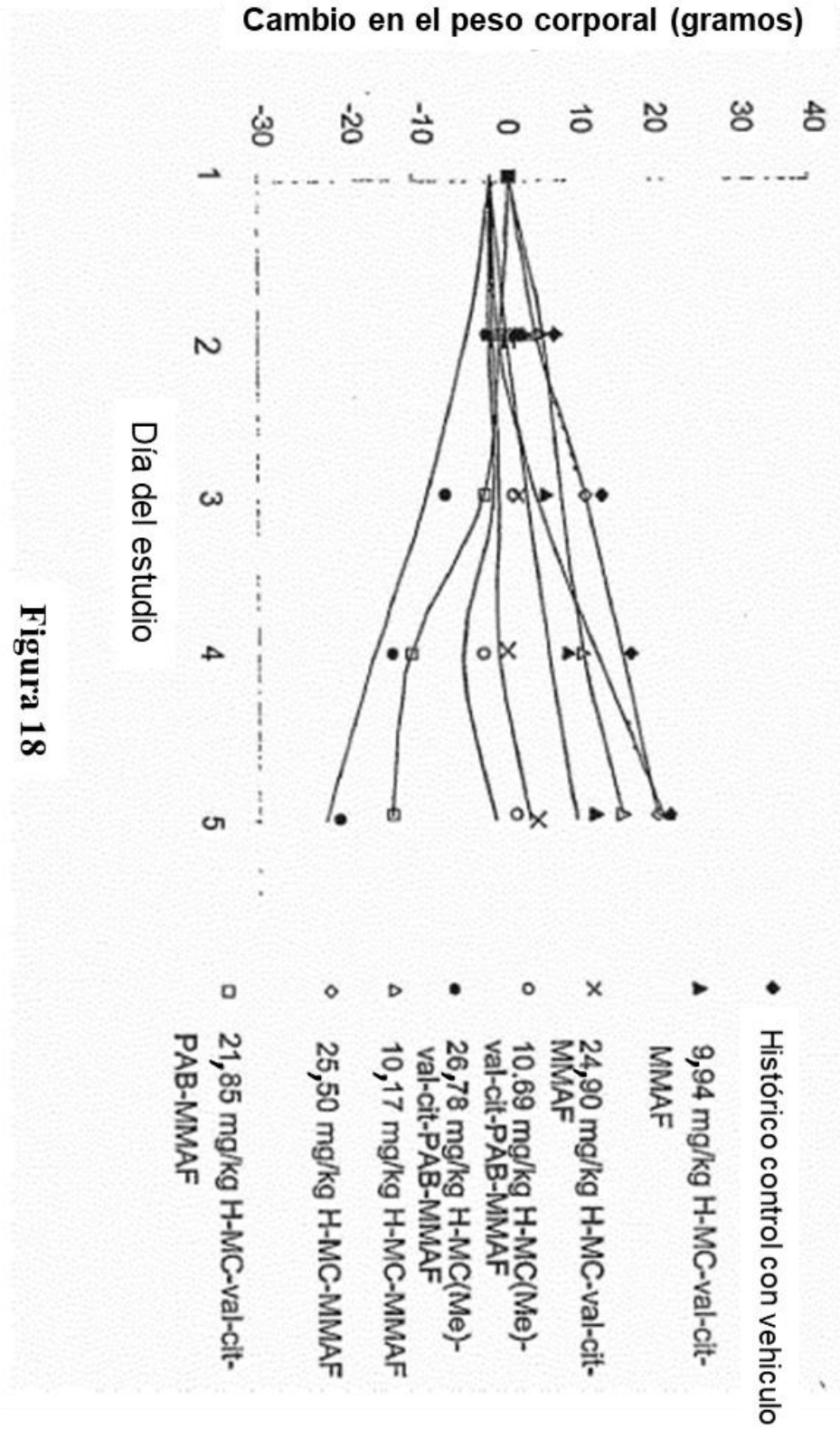
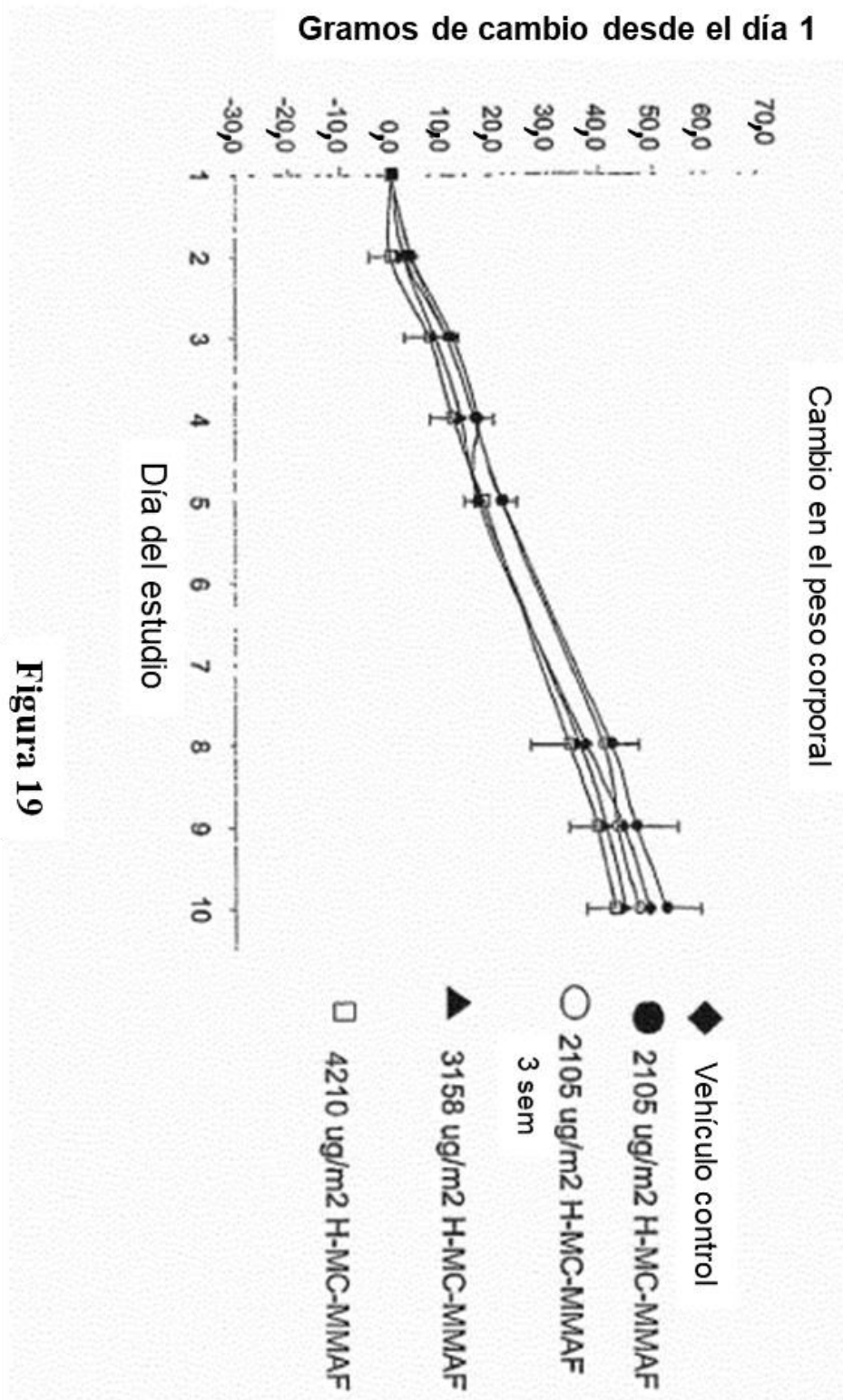


Figura 17







**Figura 19**