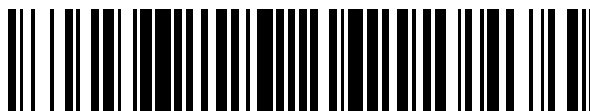


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 316**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2017 PCT/EP2017/052988**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.08.2017 WO17137553**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2017 E 17704263 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3413923**

54 Título: **Conjugados de pirrolobenzodiazepina**

30 Prioridad:

10.02.2016 GB 201602356

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

03.11.2020

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)
Milstein Building Granta Park
Cambridge, Cambridgeshire CB21 6GH, GB**

72 Inventor/es:

**HOWARD, PHILIP WILSON;
DUNNY, ELIZABETH y
MASTERSON, LUKE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 791 316 T3

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

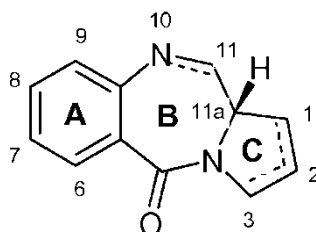
DESCRIPCIÓN

Conjugados de pirrolobenzodiazepina

- 5 La presente invención se refiere a conjugados que comprenden una pirrolobenzodiazepina (PBD) específica y el enlazador de fármaco precursor usado para fabricar tales conjugados.

Antecedentes de la invención

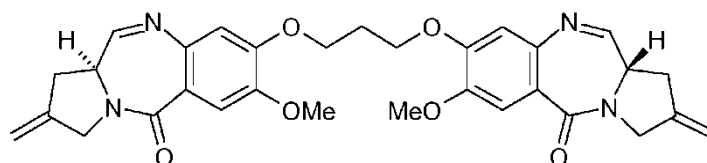
- 10 Algunas pirrolobenzodiazepinas (PBD) tienen la capacidad de reconocer y unirse a secuencias específicas de ADN; la secuencia preferida es PuG_nPu. El primer antibiótico antitumoral de PBD, antramycin, fue descubierto en 1965 (Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5793-5795 (1965); Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5791-5793 (1965)). Desde entonces, se ha informado de una serie de PBD de origen natural y se han desarrollado más de 10
- 15 rutas sintéticas para diversos análogos (Thurston, et al., Chem. Rev. 1994, 433-465 (1994)). Los miembros de la familia incluyen abbeimicina (Hochlowski, et al., J. Antibiotics, 40, 145-148 (1987)), chicamicina (Konishi, et al., J. Antibiotics, 37, 200-206 (1984)), DC-81 (Patente Japonesa 58-180 487; Thurston, et al., Chem. Brit., 26, 767-772 (1990); Bose, et al., Tetrahedron, 48, 751-758 (1992)), macetramicina (Kuminoto, et al., J. Antibiotics, 33, 665-667 (1980)), neotramicinas A y B (Takeuchi, et al., J. Antibiotics, 29, 93-96 (1976)), porotramicina (Tsunakawa, et al., J. Antibiotics, 41, 1366-1373 (1988)), protracarcina (Shimizu, et al., J. Antibiotics, 29, 2492-2503 (1982); Langley y
- 20 Thurston, J. Org. Chem., 52, 91-97 (1987)), sibanomicina (DC-102) (Hara, et al., J. Antibiotics, 41, 702-704 (1988); Itoh, et al., J. Antibiotics, 41, 1281-1284 (1988)), sibiromicina (Leber, et al., J. Am. Chem. Soc., 110, 2992-2993 (1988)) y tomamicina (Arima, et al., J. Antibiotics, 25, 437-444 (1972)). Las PBD son de estructura general:



- 25 Se diferencian en el número, el tipo y la posición de los sustituyentes, tanto en sus anillos A aromáticos como en los anillos C de pirrolo, y en el grado de saturación del anillo C. En el anillo B hay una imina (N=C), una carbinolamina (NH-CH(OH)), o un metil éter de carbinolamina (NH-CH(OMe)) en la posición N10-C11 que es el centro electrófilo responsable de alquilar el ADN. Todos los productos naturales conocidos tienen una configuración (S) en la posición
- 30 quiral C11a que les proporciona un giro hacia la derecha cuando se ven desde el anillo C hacia el anillo A. Esto les da la forma tridimensional adecuada para la isohelicidad con el surco menor de la forma B del ADN, dando lugar a un ajuste ceñido en el sitio de unión (Kohn, en Antibiotics III. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 3-11 (1975); Hurley y Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res., 19, 230-237 (1986)). Su capacidad para formar un aducto en el surco menor, les permite interferir con el procesamiento del ADN, de ahí su uso como agentes antitumorales.

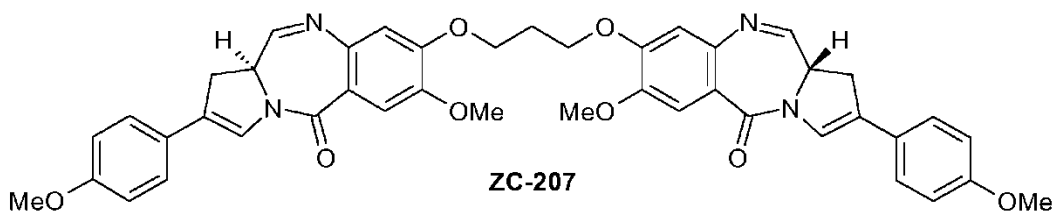
- 35 Se ha divulgado anteriormente que la actividad biológica de estas moléculas puede potenciarse uniendo dos unidades PBD entre sí a través de sus funcionalidades C8/C'-hidroxilo a través de un enlazador de alqueno flexible (Bose, D.S., et al., J. Am. Chem. Soc., 114, 4939-4941 (1992); Thurston, D.E., et al., J. Org. Chem., 61, 8141-8147 (1996)). Se cree que los dímeros de PBD forman lesiones en el ADN selectivas de la secuencia tales como la
- 40 reticulación 5'-Pu-GATC-Py-3' palindrómica intracatenaria (Smellie, M., et al., Biochemistry, 42, 8232-8239 (2003); Martin, C., et al., Biochemistry, 44, 4135-4147) que se cree que es el principal responsable de su actividad biológica.

Un ejemplo de un dímero PBD es SG2000 (SJG-136):

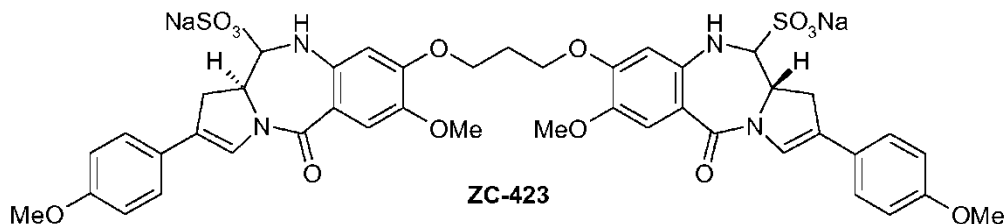


- 45 (Gregson, S., et al., J. Med. Chem., 44, 737-748 (2001); Alley, M.C., et al., Cancer Research, 64, 6700-6706 (2004); Hartley, J.A., et al., Cancer Research, 64, 6693-6699 (2004)) que ha estado implicado en ensayos clínicos como agente independiente, por ejemplo, NCT02034227 investigando su uso en el tratamiento de la leucemia mieloide
- 50 aguda y la leucemia linfocítica crónica (véase: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02034227>).

Los compuestos de PBD diméricos que llevan sustituyentes arilo C2, tales como SG2202 (ZC-207), se desvelan en el documento WO 2005/085251:



y en el documento WO2006/111759, bisulfitos de dichos compuestos de PBD, por ejemplo SG2285 (ZC-423):



Se ha demostrado que estos compuestos son agentes citotóxicos altamente útiles (Howard, P.W., et al., Bioorg. Med. Chem. (2009), doi: 10.1016/j.bmcl.2009.09.012).

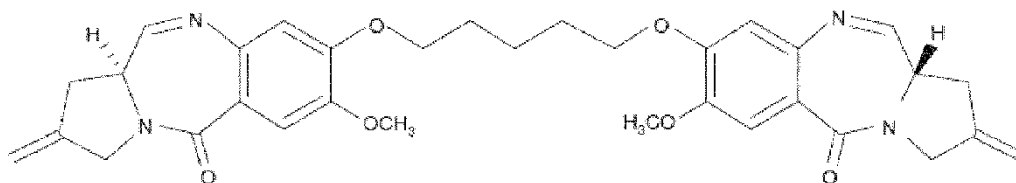
10 En un estudio de impacto presentado al Research Excellence Framework (REF) de 2014 en el Reino Unido por University College London (disponible en <http://impact.ref.ac.uk/casestudies2/refservice.svc/GetCaseStudyPDF/35393>), se comentó que:

15 "La próxima generación de dímeros PBD, que son más potentes que SG2000, se ha desarrollado, incluyendo SG2057 y SG2202. Exhiben actividad picomolar/sub-picomolar contra un abanico de líneas celulares tumorales humanas y demuestran actividad curativa en modelos de xenoinjerto de tumor humano", haciendo referencia a: Hartley JA, et al., DNA interstrand cross-linking and *in vivo* antitumor activity of the extended pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine dimer SG2057. Invest New Drugs. jun 2012; 30(3):950-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s10637-011-9647-z> (en lo sucesivo en el presente documento "Hartley et al (2012)") y:

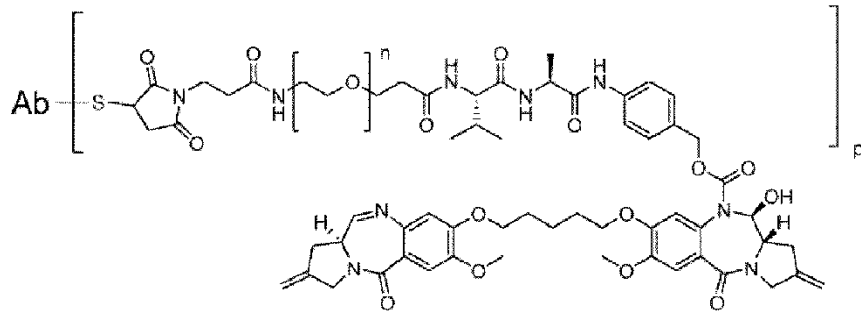
20 "La capacidad de generar dichas moléculas citotóxicas que muestran una potencia exquisita sugirió un papel potencial en las estrategias dirigidas a marcar como diana y liberar agentes altamente citotóxicos directamente en el sitio del tumor. Un ejemplo es como el componente 'ojiva' de un conjugado de anticuerpo fármaco (ADC). Los dímeros PBD totalmente sintéticos son ideales para el papel de la ojiva en un enfoque ADC".

25 El artículo de Hartley et al (2012) comenta en su sumario que "SG2057 es, por lo tanto, un agente antitumoral altamente activo, con actividad *in vitro* más potente y actividad *in vivo* superior a SG2000, garantizando un desarrollo adicional".

SG2057 tiene la estructura:



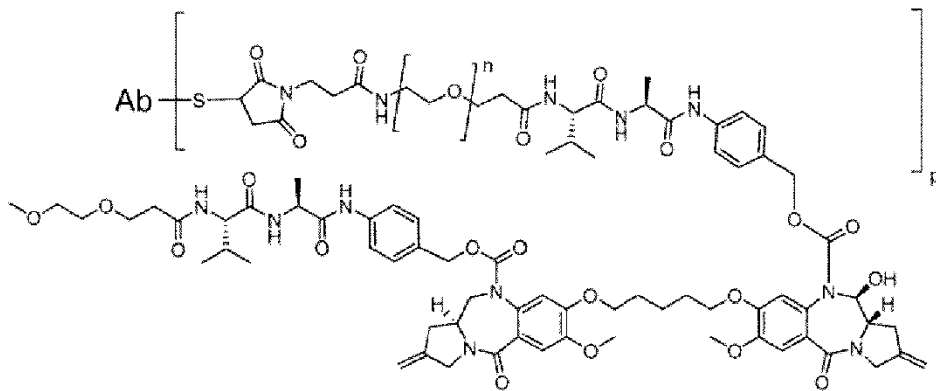
30 Los conjugados de fármaco anticuerpo que usan SG2057 como ojiva se desvelaron por primera vez en el documento WO 2011/130598. Por ejemplo, la reivindicación 54 de esta solicitud incluye la fórmula:



en donde n es de 1 a 24, más preferentemente de 4 a 8. Se ejemplificaron los siguientes enlazadores de fármacos: n=4, 15c; n=8, 15d; n=24, 15e.

5

La reivindicación 54 de esta solicitud también incluye la fórmula:

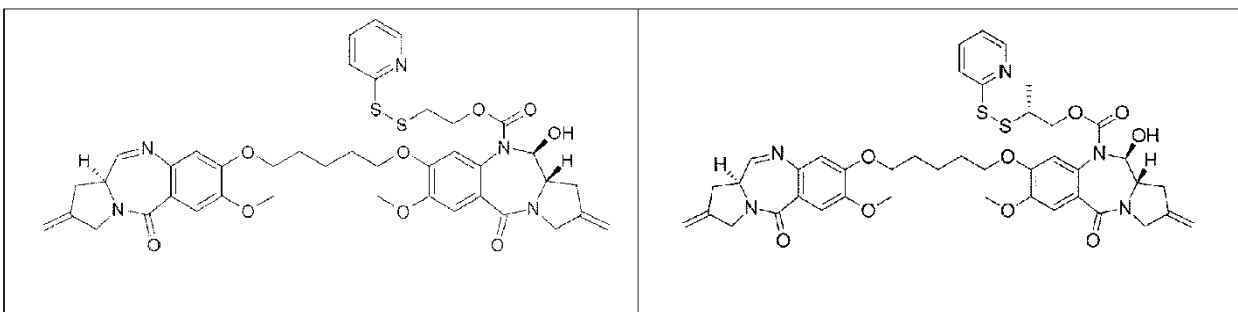


10 en donde n es de 1 a 24, más preferentemente de 4 a 8. Se ejemplificaron los siguientes enlazadores de fármacos: n=8, 58; n=24, 61.

El documento WO 2011/130598 también desvela conjugados de anticuerpo-fármaco que incluyen estos enlazadores de fármacos, por ejemplo 110 (antiSteap1-15d), ejemplo 114 (tastuzumab-15d) y ejemplo 115 (tastuzumab-58).

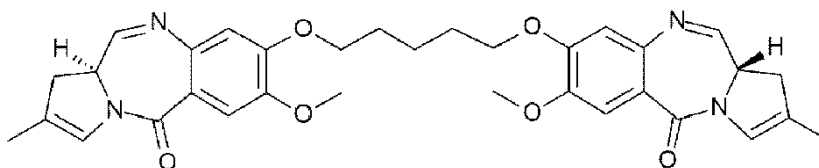
15

El documento WO 2013/055987 desvela los enlazadores de fármacos 14 y 22:



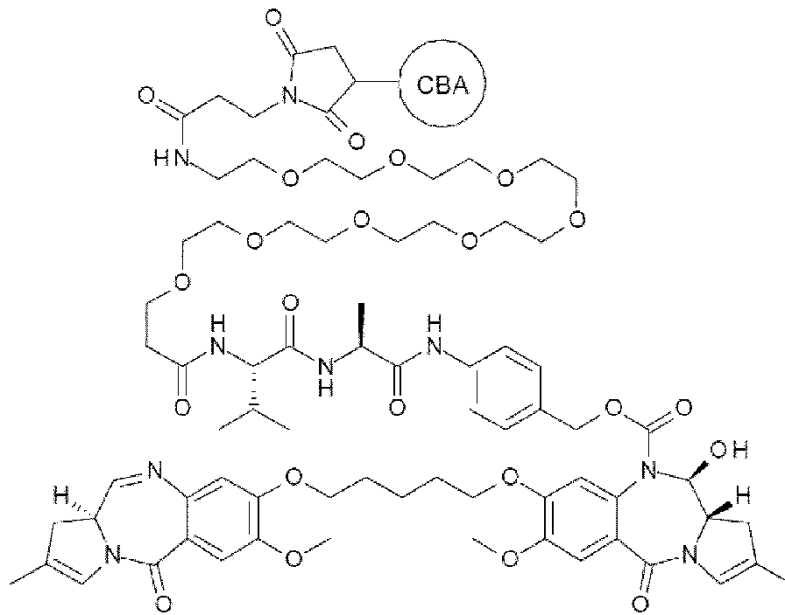
20 y su uso en conjugados anticuerpo-fármaco.

Más recientemente, la ojiva:



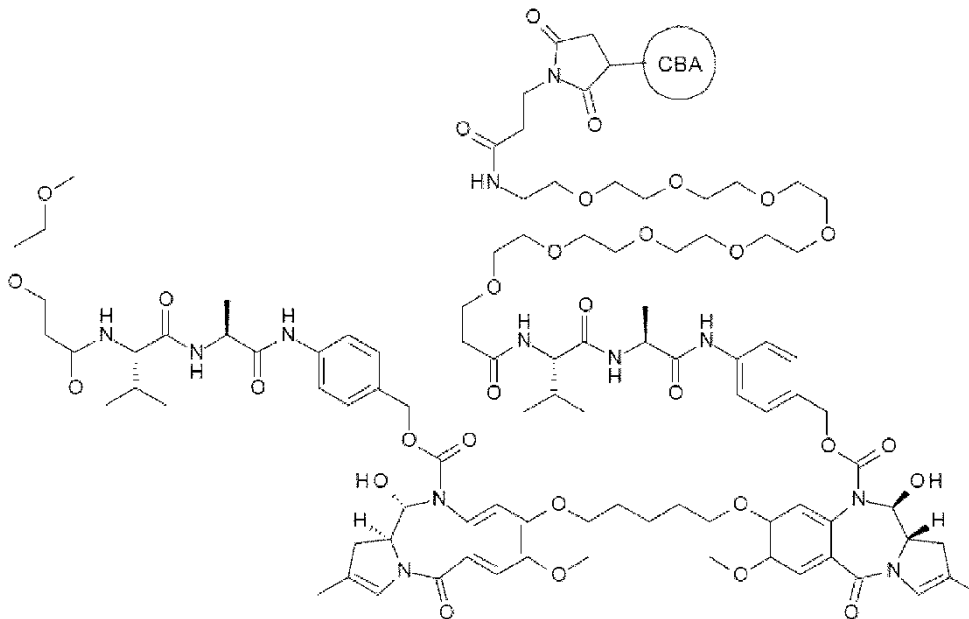
25

se ha usado en enlazadores de fármacos y conjugados de anticuerpo-fármaco. El documento WO 2014/057074 desvela:



El documento WO2015/052322 desvela:

5



Divulgación de la invención

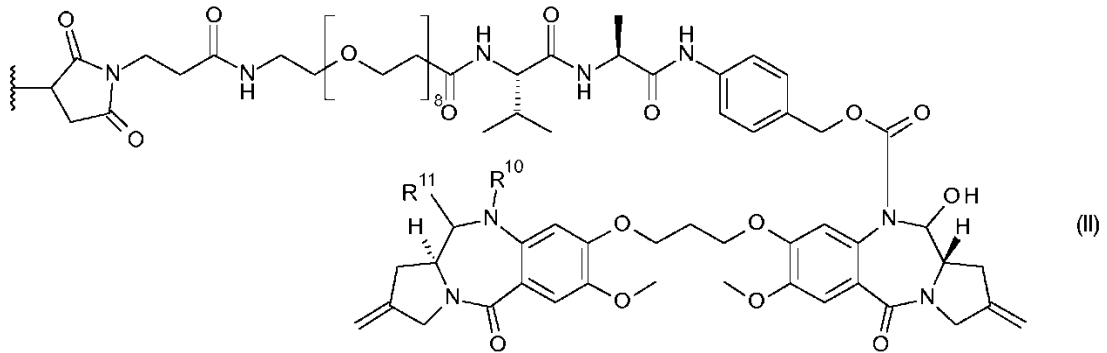
10 Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que, aunque SG2000 es al menos 10 veces menos citotóxico que SG2057 (véase Hartley et al 2012), los conjugados de anticuerpo-fármaco particulares parecen mostrar al menos una actividad comparable. Se ha demostrado que estos conjugados se han tolerado sorprendentemente bien en estudios de toxicidad en diversas especies. Esto da lugar a que los conjugados exhiban altos índices terapéuticos y, por lo tanto, son candidatos clínicos prometedores.

15

En un primer aspecto, la presente invención proporciona Conjugados de fórmula I:

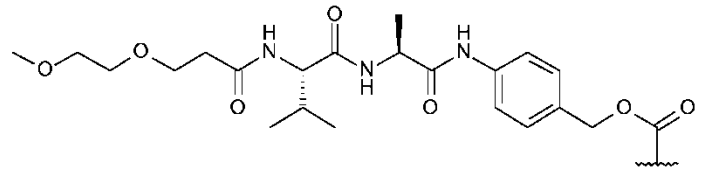


20 en donde L es una unidad de Ligando (es decir, un agente de direccionamiento), D es una unidad de Ligando de Fármaco de fórmula II:



en donde
bien:

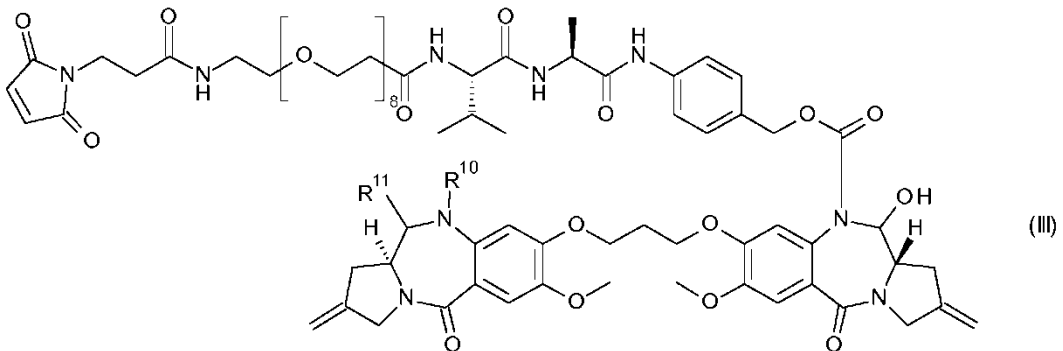
- 5 (a) R^{10} y R^{11} forman un doble enlace nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y carbono a los que están unidos; o
(b) R^{10} es OH y R^{11} es:



- 10 p es un número entero de 1 a 20.

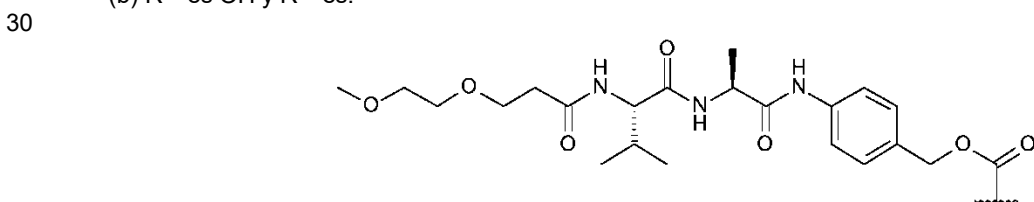
15 La unidad de Ligando, descrita más completamente a continuación, es un agente de direccionamiento que se une a un resto diana. La unidad de Ligando puede, por ejemplo, unirse específicamente a un componente celular (un agente de unión a célula) o a otras moléculas diana de interés. La unidad de Ligando puede ser, por ejemplo, una proteína, un polipéptido o un péptido, tales como un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo u otro agente de unión, tales como una proteína de fusión Fc.

20 Un segundo aspecto de la presente invención proporciona un compuesto de fórmula III:



25 en donde
bien:

- (a) R^{10} y R^{11} forman un doble enlace nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y carbono a los que están unidos; o
(b) R^{10} es OH y R^{11} es:



Un tercer aspecto de la presente invención proporciona el uso de un conjugado del primer aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad proliferativa. El tercer aspecto también proporciona un conjugado del primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa. El tercer aspecto también proporciona un método para tratar una enfermedad proliferativa que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado del primer aspecto de la invención a un paciente que lo necesite.

Un experto en la técnica es capaz de determinar fácilmente si un conjugado candidato trata o no una afección proliferativa para cualquier tipo de célula particular. Por ejemplo, los ensayos que pueden usarse de manera práctica para evaluar la actividad ofrecida por un compuesto particular se describen en los ejemplos a continuación.

Un cuarto aspecto de la presente invención proporciona la síntesis de un conjugado del primer aspecto de la invención que comprende conjugar un compuesto (enlazador de fármacos) del segundo aspecto de la invención con una Unidad de Ligando.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el efecto sobre el volumen de un tumor BT474 después del tratamiento con un conjugado de la presente invención;

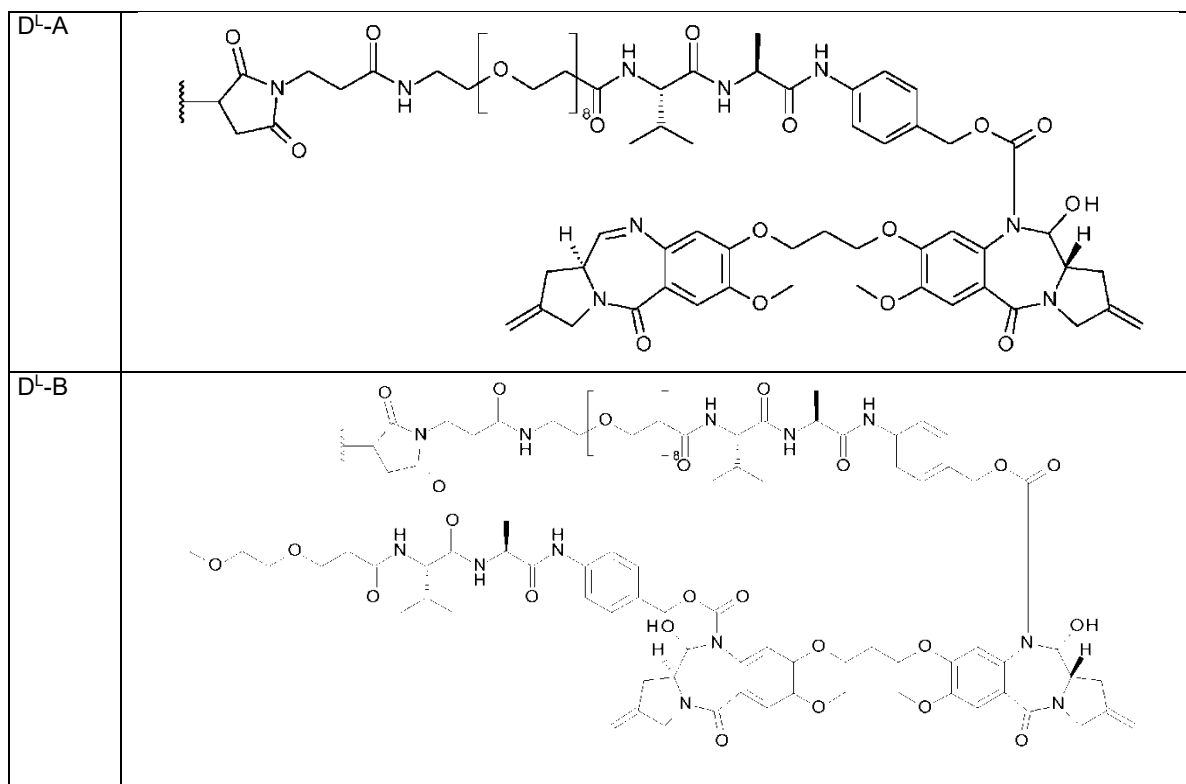
La Figura 2 muestra el efecto sobre el volumen de un tumor BT474 después del tratamiento con un conjugado diferente de la presente invención;

La Figura 3 muestra el efecto sobre el volumen de un tumor NCI-N87 después del tratamiento con un conjugado de la presente invención;

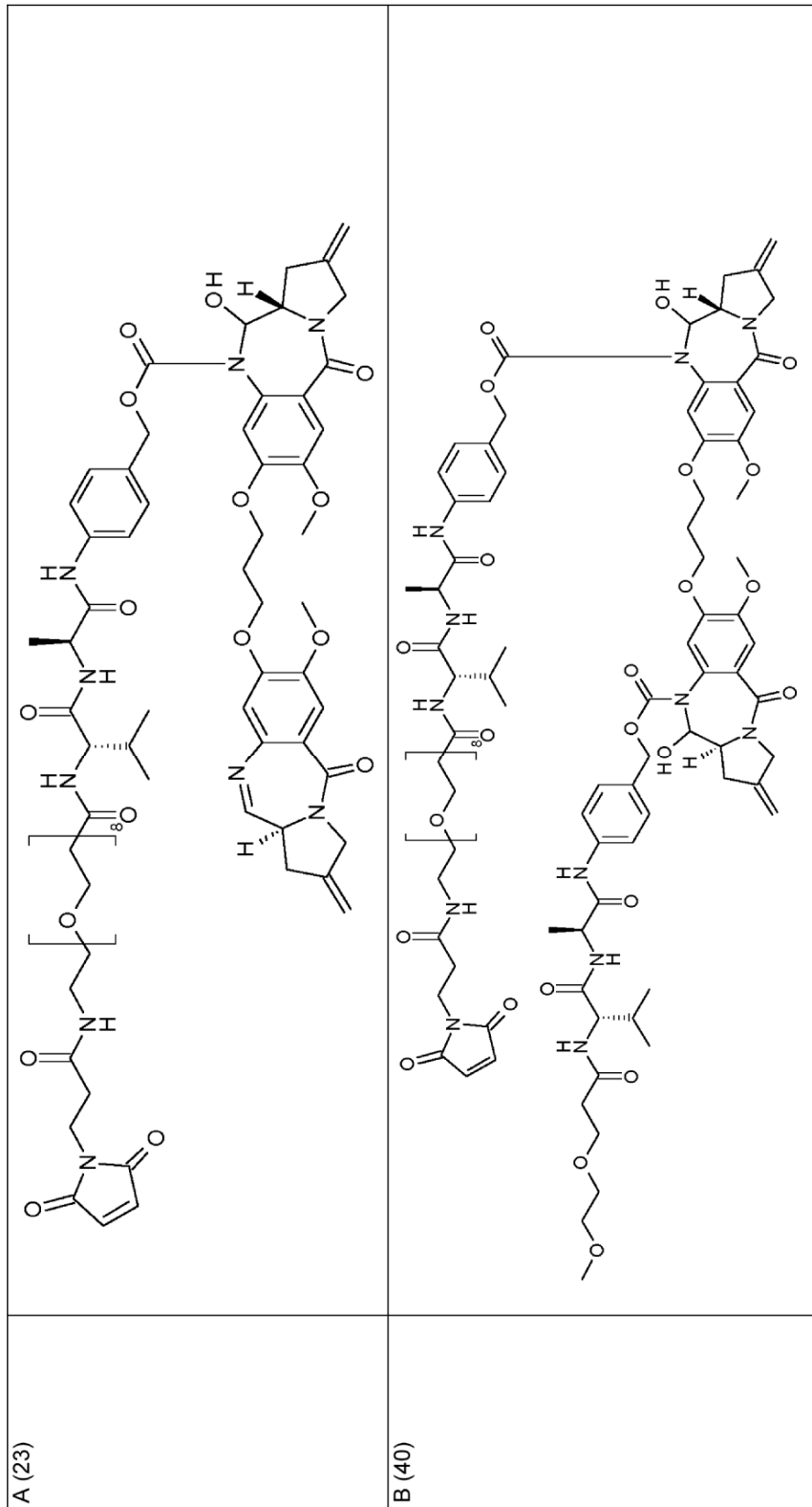
La Figura 4 muestra el efecto sobre el volumen de un tumor NCI-N87 después del tratamiento con un conjugado diferente de la presente invención.

D^L

En el primer aspecto D^L se selecciona de D^L-A y D^L-B:



En el segundo aspecto, el compuesto se selecciona de A y B:



Unidad de ligando

La Unidad de Ligando puede ser de cualquier tipo e incluye una proteína, un polipéptido, un péptido y un agente no peptídico que se une específicamente a una molécula diana. En algunas realizaciones, la Unidad de ligando puede ser una proteína, un polipéptido o un péptido. En algunas realizaciones, la Unidad de ligando puede ser un polipéptido cíclico. Estas Unidades de ligando pueden incluir anticuerpos o un fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión a moléculas diana, linfocinas, hormonas, factores de crecimiento o cualquier otra molécula o sustancia de unión celular que pueda unirse específicamente a una diana.

Las frases "se une específicamente" y "unión específica" se refieren a la unión de un anticuerpo u otra proteína, polipéptido o péptido a una molécula predeterminada (por ejemplo, un antígeno). Normalmente, el anticuerpo u otra molécula se une con una afinidad de al menos aproximadamente $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1}$ y se une a la molécula predeterminada con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por la unión a una molécula no específica (por ejemplo, ASB, caseína) distinta de la molécula predeterminada o una molécula estrechamente relacionada.

Algunos ejemplos de Unidades de ligando incluyen aquellos agentes descritos para su uso en el documento WO 2007/085930.

En algunas realizaciones, la Unidad de ligando es un Agente de unión a célula que se une a una diana extracelular en una célula. Dicho Agente de unión a célula puede ser una proteína, un polipéptido, un péptido o un agente no peptídico. En algunas realizaciones, el Agente de unión a célula puede ser una proteína, un polipéptido o un péptido. En algunas realizaciones, el Agente de unión a célula puede ser un polipéptido cíclico. El Agente de unión a célula también puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo. De esta manera, en una realización, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC).

Agente de unión celular

Un agente de unión celular puede ser de cualquier tipo e incluye péptidos y no péptidos. Estos pueden incluir anticuerpos o un fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión, linfocinas, hormonas, miméticos hormonales, vitaminas, factores de crecimiento, moléculas transportadoras de nutrientes o cualquier otra molécula o sustancia de unión a célula.

Péptidos

En una realización, el agente de unión a célula es un péptido lineal o cíclico que comprende 4-30, preferentemente 6-20, restos de aminoácidos contiguos. En esta realización, se prefiere que un agente de unión a célula se enlace a un monómero o dímero de un compuesto de pirrolobenzodiazepina.

En una realización, el agente de unión a célula comprende un péptido que se une a la integrina $\alpha_v\beta_6$. El péptido puede ser selectivo para $\alpha_v\beta_6$ sobre XYS.

En una realización, el agente de unión a célula comprende el polipéptido A20FMDV-Cys. El A20FMDV-Cys tiene la secuencia: NAVPNLRGDLQVLAQKVARTC. Como alternativa, puede usarse una variante de la secuencia A20FMDV-Cys en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez restos de aminoácidos se sustituyen con otro resto de aminoácido. Adicionalmente, el polipéptido puede tener la secuencia NAVXXXXXXXXXXXXXXXXXRTC.

Anticuerpos

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y específicamente abarca anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Miller et al (2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanas, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunitario que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immuno Biology, 5ª Ed., Garland Publishing, Nueva York). Un antígeno diana tiene generalmente numerosos sitios de unión, también denominados epítomos, reconocidos por las CDR en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítopo diferente tiene una estructura diferente. De esta manera, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno de una diana de interés o parte de la misma, incluyendo dichas dianas pero no limitadas a, una célula o células cancerosas que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados a una enfermedad autoinmunitaria. La inmunoglobulina 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 derivar de cualquier especie, incluyendo origen humano, murino o de conejo.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a antígeno o variable del mismo. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y scFv; diacuerpos; anticuerpos lineales; fragmentos producidos mediante una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de la complementariedad) y fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anteriores que se unen inmunoespecíficamente a antígenos de células cancerosas, antígenos víricos o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La expresión "anticuerpo monoclonal" 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 excepto por las posibles mutaciones que tienen lugar de manera natural que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Adicionalmente, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin estar contaminados por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. 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 pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, el documento US 4816567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse a partir de bibliotecas de fagos de anticuerpos usando las técnicas descritas en Clackson et al. (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597 o de ratones transgénicos que llevan un sistema de inmunoglobulina completamente humano (Lonberg (2008) Curr. Opin. 20(4):450-459).

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en donde una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el grupo de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (documento US 4816567; y Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo o simio) y secuencias de región constante humanas.

Un "anticuerpo intacto" en el presente documento es uno que comprende dominios VL y VH, así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de la secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de la secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. El 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 secuencia nativa o una región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Algunos 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; y regulación negativa de los receptores de la superficie celular tales como el receptor de células B y BCR.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos pueden asignarse a diferentes "clases". Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas 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 α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Humanización

Las técnicas para reducir la inmunogenicidad *in vivo* de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo no humano incluye aquellas denominadas "humanización".

Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un polipéptido que comprende al menos una porción de una región variable modificada de un anticuerpo humano en donde una porción de la región variable, preferentemente una porción sustancialmente menor que el dominio variable humano intacto, se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana y en donde la región variable modificada está unida a al menos otra parte de otra proteína, preferentemente la región constante de un anticuerpo humano. La expresión "anticuerpos humanizados" incluye anticuerpos humanos en donde uno o más restos de aminoácidos de la región determinante de complementariedad

("CDR") y/o uno o más restos de aminoácidos de la región marco ("FW" o "FR") están sustituidos por restos de aminoácidos de sitios análogos en roedores u otros anticuerpos no humanos. La expresión "anticuerpo humanizado" también incluye una variante de secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina o fragmento de la misma que comprende una FR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una CDR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. O, mirado de otra manera, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo humano que también contiene secuencias seleccionadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) en lugar de las secuencias humanas. Un anticuerpo humanizado puede incluir sustituciones conservativas de aminoácidos o restos no naturales de la misma especie o de especies diferentes que no alteren significativamente su unión y/o actividad biológica. Dichos anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulinas no humanas.

Hay un abanico de técnicas de humanización, incluyendo 'injerto CDR', 'selección guiada', 'desinmunización', 'rechapado' (también conocido como 'rebarnizado'), 'anticuerpos compuestos', 'Optimización de contenido de cadena humana' y barajado de marcos.

Injerto de CDR

En esta técnica, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en donde los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo receptor se reemplazan por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tales como ratón, rata, camello, bovino, cabra o conejo que tiene las propiedades deseadas (en efecto, las CDR no humanas se 'injertan' en el marco humano). En algunos casos, los restos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los restos no humanos correspondientes (esto puede suceder cuando, por ejemplo, un resto FR particular tiene un efecto significativo sobre la unión al antígeno).

Adicionalmente, Los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las CDR o secuencias marco importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar y maximizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. De esta manera, en general, un anticuerpo humanizado comprenderá todos de al menos uno, y en un aspecto dos, dominios variables, en donde todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc) o aquella de una inmunoglobulina humana.

Selección guiada

El método consiste en combinar el dominio V_H o V_L de un anticuerpo no humano dado específico para un epítipo particular con una biblioteca de V_H o V_L humanos y los dominios V humanos específicos se seleccionan contra el antígeno de interés. Este V_H humano seleccionado se combina luego con una biblioteca de V_L para generar una combinación de $V_H V_L$ completamente humana. El método se describe en Nature Biotechnology (N.Y.) 12, (1994) 899-903.

Anticuerpos compuestos

En este método, dos o más segmentos de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano se combinan dentro de la molécula de anticuerpo final. Se construyen combinando múltiples segmentos de secuencia de V_H y V_L humanos en combinaciones que limitan o evitan los epítipos de células T humanas en las regiones V de anticuerpos compuestos finales. Donde sea requerido, Los epítipos de células T se limitan o evitan intercambiando segmentos de la región V que contribuyen a o codifican un epítipo de células T con segmentos alternativos que evitan epítipos de células T. Este método se describe en el documento US 2008/0206239 A1.

Desinmunización

Este método implica la retirada de epítipos de células T humanas (u otra segunda especie) de las regiones V del anticuerpo terapéutico (u otra molécula). La secuencia de la región V de anticuerpos terapéuticos se analiza para detectar la presencia de motivos de unión a MHC de clase II mediante, por ejemplo, comparación con bases de datos de motivos de unión a MHC (como la base de datos "motivos" alojada en www.wehi.edu.au). Como alternativa, los motivos de unión a MHC de clase II pueden identificarse usando métodos de subprocesamiento computacional como los diseñados por Altuvia et al. (J. Mol. Biol. 249 244-250 (1995)); en estos métodos, se están probando las energías de unión de los péptidos superpuestos consecutivos de las secuencias de la región V a proteínas MHC de clase II. Estos datos pueden combinarse con información sobre otras características de secuencia que se refieren a péptidos presentados con éxito, tales como anfipaticidad, motivos de Rothbard y sitios de escisión para la catepsina B y otras enzimas de procesamiento.

Una vez que se han identificado los epítopos potenciales de células T de la segunda especie (por ejemplo, ser humano), se eliminan por la alteración de uno o más aminoácidos. Los aminoácidos modificados están generalmente dentro del propio epítipo de células T, pero también puede ser adyacente al epítipo en términos de la estructura primaria o secundaria de la proteína (y, por lo tanto, puede no ser adyacente en la estructura primaria). Lo más normalmente, la alteración es a modo de sustitución pero, en algunas circunstancias, la adición o delección de aminoácidos será más apropiada.

Todas las alteraciones pueden lograrse mediante tecnología de ADN recombinante, para que la molécula final pueda prepararse mediante la expresión de un hospedador recombinante usando métodos bien establecidos tales como la mutagénesis dirigida al sitio. Sin embargo, también es posible el uso de la química de proteínas o cualquier otro medio de alteración molecular.

Rechapado

Este método implica:

- (a) determinar la estructura conformacional de la región variable del anticuerpo no humano (por ejemplo, roedor) (o fragmento del mismo) mediante la construcción de un modelo tridimensional de la región variable del anticuerpo no humano;
- (b) generar alineamientos de secuencia usando distribuciones de accesibilidad relativa a partir de estructuras cristalográficas de rayos X de un número suficiente de cadenas pesadas y ligeras de la región variable de anticuerpos no humanos y humanos para dar un conjunto de posiciones marco de cadena pesada y ligera en donde las posiciones de alineación son idénticas en el 98 % del número suficiente de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos no humanos;
- (c) definir el anticuerpo no humano que se humanizará, un conjunto de restos de aminoácidos expuestos a la superficie de la cadena pesada y ligera usando el conjunto de posiciones marco generadas en la etapa (b);
- (d) identificar a partir de secuencias de aminoácidos de anticuerpos humanos un conjunto de restos de aminoácidos expuestos a la superficie de la cadena pesada y ligera que es más idéntico al conjunto de restos de aminoácidos expuestos a la superficie definidos en la etapa (c), en donde la cadena pesada y ligera del anticuerpo humano están o no emparejadas de forma natural;
- (e) sustituir, en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo no humano a humanizar, el conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de la cadena pesada y ligera definidos en la etapa (c) con el conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de la cadena pesada y ligera identificados en la etapa (d);
- (f) construir un modelo tridimensional de la región variable del anticuerpo no humano resultante de la sustitución especificada en la etapa (e);
- (g) identificar, comparando los modelos tridimensionales construidos en las etapas (a) y (f), cualquier resto de aminoácido de los conjuntos identificados en las etapas (c) o (d), que están dentro de 5 Angstroms de cualquier átomo de cualquier resto de las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo no humano a humanizar; y
- (h) cambiar cualquier resto identificado en la etapa (g) del resto de aminoácido humano al no humano original para definir de ese modo un conjunto humanizante de anticuerpos no humanos de restos de aminoácidos expuestos a la superficie; con la condición de que la etapa (a) no necesita llevarse a cabo en primer lugar, pero debe llevarse a cabo antes de la etapa (g).

Sobrehumanización

El método compara la secuencia no humana con el repertorio funcional del gen de la línea germinal humana. Se seleccionan aquellos genes humanos que codifican estructuras canónicas idénticas o estrechamente relacionadas con las secuencias no humanas. Esos genes humanos seleccionados con mayor homología dentro de las CDR se eligen como donadores FR. Finalmente, las CDR no humanas se injertan en estas FR humanas. Este método se describe en la patente WO 2005/079479 A2.

Optimización de contenido de cadena humana

Este método compara la secuencia no humana (por ejemplo, de ratón) con el repertorio de genes de la línea germinal humana y las diferencias se puntúan como Contenido de cadena humana (HSC) que cuantifica una secuencia al nivel de epítopos potenciales de MHC/células T. La secuencia diana se humaniza después maximizando su HSC en lugar de usar una medida de identidad global para generar múltiples variantes humanizadas diversas (descritas en Molecular Immunology, 44, (2007) 1986-1998).

Barajado de marco

Las CDR del anticuerpo no humano se fusionan en el marco de las agrupaciones de ADNc que abarcan todos los marcos de genes de la línea germinal humana de cadena pesada y ligera conocidos. Los anticuerpos humanizados se seleccionan después, por ejemplo, haciendo una panorámica de la biblioteca de anticuerpos mostrada en fagos.

Esto se describe en Methods 36, 43-60 (2005).

Algunos ejemplos de agentes de unión a célula incluyen aquellos agentes descritos para su uso en el documento WO 2007/085930.

5 Los antígenos asociados a tumores y los anticuerpos afines para su uso en las realizaciones de la presente invención se listan a continuación.

10 ANTIGENOS ASOCIADOS A TUMOR Y ANTICUERPOS AFINES

(1) *BMPR1B* (receptor de la proteína morfogenética ósea tipo IB)

Nucleótido

15 n.º de registro GenBank NM_001203
n.º de versión Genbank NM_001203.2 GI:169790809
Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Sep, 2012 02:06 PM

Polipéptido

20 n.º de registro GenBank NP_001194
n.º de versión Genbank NP_001194.1 GI:4502431
Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Sep, 2012 02:06 PM

25 Referencias cruzadas

ten Dijke,P., et al Science 264 (5155): 101-104 (1994), Oncogene 14 (11):1377-1382 (1997)); documento WO2004/063362 (reivindicación 2); documento WO2003/042661 (reivindicación 12); documento US2003/134790-A1 (páginas 38-39); documento WO2002/102235 (reivindicación 13; página 296); documento WO2003/055443 (páginas 91-92); documento WO2002/99122 (Ejemplo 2; página 528-530); documento WO2003/029421 (reivindicación 6); documento WO2003/024392 (reivindicación 2; Figura 112); documento WO2002/98358 (reivindicación 1; página 183); documento WO2002/54940 (página 100-101); documento WO2002/59377 (página 349-350); documento WO2002/30268 (reivindicación 27; página 376); documento 15 WO2001/48204 (Ejemplo; Figura 4); receptor de proteína morfogenética ósea NP_001194, tipo IB /pid=NP_001194.1.; MIM:603248; AY065994

(2) *E16* (*LAT1, SLC7A5*)

40 Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_003486
n.º de versión Genbank NM_003486.5 GI:71979931
Fecha de actualización del registro de Genbank: 27 Jun, 2012 12:06 PM

45 Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_003477
n.º de versión Genbank NP_003477.4 GI:71979932
50 Fecha de actualización del registro de Genbank: 27 Jun, 2012 12:06 PM

Referencias cruzadas

Biochem. Biophys. Res.

55 Commun. 255 (2), 283-288 (1999), Nature 395 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, H.W., et al (1992) J. Biol. Chem. 267 (16): 11267-11273); documento WO2004/048938 (Ejemplo 2); documento WO2004/032842 (Ejemplo IV); documento WO2003/042661 (reivindicación 12); documento WO2003/016475 (reivindicación 1); documento WO2002/78524 (Ejemplo 2); documento WO2002/99074 (reivindicación 19; página 127-129); documento WO2002/86443 (reivindicación 27; páginas 222, 393); documento WO2003/003906 (reivindicación 10; página 293); documento WO2002/64798 (reivindicación 33; página 93-95); documento WO2000/14228 (reivindicación 5; página 133-136); documento US2003/224454 (Figura 3); documento 25 WO2003/025138 (reivindicación 12; página 150); familia del transportador de soluto 7 NP_003477 (transportador de aminoácidos catiónicos, sistema y+), miembro 5 /pid=NP_003477.3 - Homo sapiens; MIM:600182;; NM_015923.

65 (3) *STEAP1* (antígeno epitelial seis transmembrana de próstata)

Nucleótido

5 n.º de registro GenBank NM_012449
 n.º de versión Genbank NM_012449.2 GI:22027487
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 9 sep, 2012 02:57 PM

Polipéptido

10 n.º de registro GenBank NP_036581
 n.º de versión Genbank NP_036581.1 GI:9558759
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 9 sep, 2012 02:57 PM

Referencias cruzadas

15 Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (25):14523-14528); documento WO2004/065577 (reivindicación 6); documento WO2004/027049 (Figura 1L); documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento WO2004/016225 (reivindicación 2); documento WO2003/042661 (reivindicación 12); documento US2003/157089 (Ejemplo 5); documento US2003/185830 (Ejemplo 5); documento
 20 US2003/064397 (Figura 2); documento WO2002/89747 (Ejemplo 5; página 618-619); documento WO2003/022995 (Ejemplo 9; Figura 13A, 35 Ejemplo 53; página 173, Ejemplo 2; Figura 2A); antígeno epitelial seis transmembrana de próstata; MIM:604415.

(4) 0772P (CA125, MUC16)

25

Nucleótido

30 n.º de registro GenBank AF361486
 n.º de versión Genbank AF361486.3 GI: 34501466
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 11 mar, 2010 07:56 AM

Polipéptido

35 n.º de registro GenBank AAK74120
 n.º de versión Genbank AAK74120.3 GI: 34501467
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 11 mar, 2010 07:56 AM

Referencias cruzadas

40 J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375 (2001)); documento WO2004/045553 (reivindicación 14); documento WO2002/92836 (reivindicación 6; Figura 12); documento WO2002/83866 (reivindicación 15; página 116-121); documento US2003/124140 (Ejemplo 16); GI:34501467;

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina)

45

Nucleótido

50 n.º de registro GenBank NM_005823
 n.º de versión Genbank NM_005823.5 GI:293651528
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 2 sep, 2012 01:47 PM

Polipéptido

55 n.º de registro GenBank NP_005814
 n.º de versión Genbank NP_005814.2 GI:53988378
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 2 sep, 2012 01:47 PM

Referencias cruzadas

60 Yamaguchi, N., et al Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (20):11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1):136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37):21984-21990 (1995)); documento WO2003/101283 (reivindicación 14); (documento WO2002/102235 (reivindicación 13; página 287-288); documento WO2002/101075 (reivindicación 4; página 308-309); documento WO2002/71928 (página 320-321); documento WO94/10312 (página 52-57); IM:601051.

65

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, familia 34 del transportador de soluto (fosfato sódico), miembro 2,

transportador 3b de fosfato dependiente de sodio de tipo II)

Nucleótido

5 n.º de registro GenBank NM_006424
n.º de versión Genbank NM_006424.2 GI:110611905
Fecha de actualización del registro de Genbank: 22 jul, 2012 03:39 PM

Polipéptido

10 n.º de registro GenBank NP_006415
n.º de versión Genbank NP_006415.2 GI:110611906
Fecha de actualización del registro de Genbank: 22 jul, 2012 03:39 PM

15 Referencias cruzadas

J. Biol. Chem. 277 (22): 19665-19672 (2002), Genomics 62 (2):281-284 (1999), Feild, J.A., et al (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3):578-582; documento WO2004/022778 (reivindicación 2); documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento WO2002/102235 (reivindicación 13; página 326); documento EP0875569 (reivindicación 1; página 17-19); documento WO2001/57188 (reivindicación 20; página 329); documento WO2004/032842 (Ejemplo IV); documento WO2001/75177 (reivindicación 24; página 139-140); MIM:604217.

25 **(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio 25 sema, siete repeticiones de tromboespondina (tipo 1 y análogo al tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto, (semaforina) 5B)**

Nucleótido

30 n.º de registro GenBank AB040878
n.º de versión Genbank AB040878.1 GI: 7959148
Fecha de actualización del registro de Genbank: 2 ago, 2006 05:40 PM

Polipéptido

35 n.º de registro GenBank BAA95969
n.º de versión Genbank BAA95969.1 GI: 7959149
Fecha de actualización del registro de Genbank: 2 ago, 2006 05:40 PM

Referencias cruzadas

40 Nagase T., et al (2000) DNA Res. 7 (2):143-150; documento WO2004/000997 (reivindicación 1); documento WO2003/003984 (reivindicación 1); documento WO2002/06339 (reivindicación 1; página 50); documento WO2001/88133 (reivindicación 1; página 41-43, 48-58); documento WO2003/054152 (reivindicación 20); documento WO2003/101400 (reivindicación 11); Registro: 30 Q9P283; Genew; HGNC:10737

45 **(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, ADNc RIKEN 2700050C12, ADNc RIKEN gen 2700050C12)**

Nucleótido

50 n.º de registro GenBank AY358628
n.º de versión Genbank AY358628.1 GI: 37182377
Fecha de actualización del registro de Genbank: 1 dic, 2009 04:15 AM

Polipéptido

55 n.º de registro GenBank AAQ88991
n.º de versión Genbank AAQ88991.1 GI: 37182378
Fecha de actualización del registro de Genbank: 1 dic, 2009 04:15 AM

60 Referencias cruzadas

65 Ross et al (2002) Cancer Res. 62:2546-2553; documento US2003/129192 (reivindicación 2); documento US2004/044180 (reivindicación 12); documento US2004/044179 (reivindicación 11); documento US2003/096961 (reivindicación 11); documento US2003/232056 (Ejemplo 5); documento WO2003/105758 16 (reivindicación 12); documento US2003/206918 (Ejemplo 5); documento EP1347046 (reivindicación 1); documento WO2003/025148 (reivindicación 20); GI:37182378.

(9) ETBR (receptor de endotelina tipo B)

Nucleótido

5 n.º de registro GenBank AY275463
 n.º de versión Genbank AY275463.1 GI: 30526094
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 11 mar, 2010 02:26 AM

Polipéptido

n.º de registro GenBank AAP32295
 n.º de versión Genbank AAP32295.1 GI: 30526095
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 11 mar, 2010 02:26 AM

Referencias cruzadas

20 Nakamuta M., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 248-255, 1991; Arai H., et al Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992; Arai H., et al J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656-663, 1991; Elshourbagy N.A., et al J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., et al J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., et al Gene 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C., et al J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., et al Biol. Chem. 272, 21589-21596, 1997; Verheij 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 WO2004/045516 (reivindicación 1); documento WO2004/048938 (Ejemplo 2); documento WO2004/040000 (reivindicación 151); documento WO2003/087768 (reivindicación 1); documento WO2003/016475 (reivindicación 1); documento WO2003/016475 (reivindicación 1); documento WO2002/61087 (Figura 1); documento WO2003/016494 (Figura 6); documento WO2003/025138 (reivindicación 12; página 144); documento WO2001/98351 (reivindicación 1; página 124-125); documento EP0522868 (reivindicación 8; Figura 2); documento WO2001/77172 (reivindicación 1; página 297-299); documento US2003/109676; documento US6518404 (Figura 3); documento US5773223 (reivindicación 1a; Col 31-34); documento WO2004/001004.

(10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315)

Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_017763
 n.º de versión Genbank NM_017763.4 GI:167830482
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 22 jul, 2012 12:34 AM

Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_060233
 n.º de versión Genbank NP_060233.3 GI:56711322
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 22 jul, 2012 12:34 AM

Referencias cruzadas

55 Documento WO2003/104275 (reivindicación 1); documento WO2004/046342 (Ejemplo 2); documento WO2003/042661 (reivindicación 12); documento WO2003/083074 (reivindicación 14; página 61); documento WO2003/018621 (reivindicación 1); documento WO2003/024392 (reivindicación 2; Figura 93); documento WO2001/66689 (Ejemplo 6); LocusID:54894.

(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 próstata 2, proteína seis transmembrana de próstata)

Nucleótido

65 n.º de registro GenBank AF455138
 n.º de versión Genbank AF455138.1 GI: 22655487

Fecha de actualización del registro de Genbank: 11 mar, 2010 01:54 AM

Polipéptido

5 n.º de registro GenBank AAN04080
 n.º de versión Genbank AAN04080.1 GI: 22655488
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 11 mar, 2010 01:54 AM

Referencias cruzadas

10 Lab. Invest. 82 (11):1573-1582 (2002)); documento WO2003/087306; documento US2003/064397 (reivindicación 1; Figura 1); documento WO2002/72596 (reivindicación 13; página 54-55); documento WO2001/72962 (reivindicación 1; Figura 4B); documento WO2003/104270 (reivindicación 11); documento WO2003/104270 (reivindicación 16); documento US2004/005598 (reivindicación 22); documento WO2003/042661 (reivindicación 12); documento US2003/060612 (reivindicación 12; Figura 10); documento WO2002/26822 (reivindicación 23; Figura 2); documento WO2002/16429 (reivindicación 12; Figura 10); GI:22655488.

(12) *TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal 5 catiónico receptor de potencial transitorio, subfamilia M, miembro 4)*

Nucleótido

20 n.º de registro GenBank NM_017636
 n.º de versión Genbank NM_017636.3 GI:304766649
 25 Fecha de actualización del registro de Genbank: 29 Jun, 2012 11:27 AM

Polipéptido

30 n.º de registro GenBank NP_060106
 n.º de versión Genbank NP_060106.2 GI:21314671
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 29 Jun, 2012 11:27 AM

Referencias cruzadas

35 Xu, X.Z., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (19):10692-10697 (2001), Cell 109 (3):397-407 (2002), J. Biol. Chem. 278 (33):30813-30820 (2003)); documento US2003/143557 (reivindicación 4); documento WO2000/40614 (reivindicación 14; página 100-103); documento WO2002/10382 (reivindicación 1; Figura 9A); documento WO2003/042661 (reivindicación 12); documento WO2002/30268 (reivindicación 27; página 391); documento US2003/219806 (reivindicación 4); documento WO2001/62794 (reivindicación 14; Figura 1A-D); MIM:606936.

(13) *CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma)*

Nucleótido

45 n.º de registro GenBank NM_003212
 n.º de versión Genbank NM_003212.3 GI:292494881
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 sep, 2012 02:27 PM

Polipéptido

50 n.º de registro GenBank NP_003203
 n.º de versión Genbank NP_003203.1 GI:4507425
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 sep, 2012 02:27 PM

Referencias cruzadas

55 Ciccodicola, A., et al EMBO J. 8 (7):1987-1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555-565 (1991)); documento US2003/224411 (reivindicación 1); documento WO2003/083041 (Ejemplo 1); documento WO2003/034984 (reivindicación 12); documento WO2002/88170 (reivindicación 2; página 52-53); documento WO2003/024392 (reivindicación 2; Figura 58); documento WO2002/16413 (reivindicación 1; página 94-95, 105); documento WO2002/22808 (reivindicación 2; Figura 1); documento US5854399 (Ejemplo 2; Col 17-18); documento US5792616 (Figura 2); MIM:187395.

(14) *CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus de Epstein-Barr) o Hs. 73792)*

Nucleótido

n.º de registro GenBank M26004
 n.º de versión Genbank M26004.1 GI: 181939
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:47 AM

5

Polipéptido

n.º de registro GenBank AAA35786
 n.º de versión Genbank AAA35786.1 GI: 181940
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:47 AM

10

Referencias cruzadas

Fujisaku et al (1989) J. Biol. Chem. 264 (4):2118-2125); Weis J.J., et al J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988; Moore M., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9194-9198, 1987; Barel M., et al Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., et al (1993) J. Immunol. 150, 5311-5320; documento WO2004/045520 (Ejemplo 4); documento US2004/005538 (Ejemplo 1); documento WO2003/062401 (reivindicación 9); documento WO2004/045520 (Ejemplo 4); documento WO91/02536 (Figura 9.1-9.9); documento WO2004/020595 (reivindicación 1); Registro: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.

15

20

(15) *CD79b (CD79B, CD79β, Igb (beta asociada a inmunoglobulina), B29)*

Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_000626
 n.º de versión Genbank NM_000626.2 GI:90193589
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 26 Jun, 2012 01:53 PM

25

Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_000617
 n.º de versión Genbank NP_000617.1 GI:11038674
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 26 Jun, 2012 01:53 PM

30

Referencias cruzadas

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (7):4126-4131, Blood (2002) 100 (9):3068-3076, Muller et al (1992) Eur. J. Immunol. 22 (6):1621-1625); documento WO2004/016225 (reivindicación 2, Figura 140); documento WO2003/087768, documento US2004/101874 (reivindicación 1, página 102); documento WO2003/062401 (reivindicación 9); documento WO2002/78524 (Ejemplo 2); documento US2002/150573 (reivindicación 35 5, página 15); US5644033; documento WO2003/048202 (reivindicación 1, páginas 306 y 309); documento WO 99/58658, documento US6534482 (reivindicación 13, Figura 17A/B); documento WO2000/55351 (reivindicación 11, páginas 1145-1146); MIM:147245

40

45

(16) *FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (dominio SH2 que contiene la proteína de anclaje a fosfatasa 5 1a), SPAP1B, SPAP1C)*

Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_030764
 n.º de versión Genbank NM_030764.3 GI:227430280
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 Jun, 2012 12:30 AM

50

Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_110391
 n.º de versión Genbank NP_110391.2 GI:19923629
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 Jun, 2012 12:30 AM

55

60

Referencias cruzadas

AY358130); Genome Res. 13 (10):2265-2270 (2003), Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002), Blood 99 (8):2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J., et al (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768-775; documento WO2004/016225 (reivindicación 2); documento WO2003/077836; documento WO2001/38490 (reivindicación 5; Figura 18D-1-18D-2); documento WO2003/097803 (reivindicación 12);

65

documento 10 WO2003/089624 (reivindicación 25);: MIM:606509.

(17) HER2 (ErbB2)

5 Nucleótido

n.º de registro GenBank M11730
 n.º de versión Genbank M11730.1 GI: 183986
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:47 AM

10

Polipéptido

n.º de registro GenBank AAA75493
 n.º de versión Genbank AAA75493.1 GI: 306840
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:47 AM

15

Referencias cruzadas

20 Coussens L., et al Science (1985) 230(4730):1132-1139); Yamamoto T., et al Nature 319, 230-234, 1986; Semba K., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M., et al J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004; Kuhns 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 WO2004/048938 (Ejemplo 2); documento WO2004/027049 (Figura 1I); documento WO2004/009622; documento WO2003/081210; documento WO2003/089904 (reivindicación 9); documento WO2003/016475 (reivindicación 1); documento US2003/118592; documento WO2003/008537 (reivindicación 1); documento WO2003/055439 (reivindicación 29; Figura 1A-B); documento WO2003/025228 (reivindicación 37; Figura 5C); documento WO2002/22636 (Ejemplo 13; página 95-107); documento WO2002/12341 (reivindicación 68; Figura 7); documento WO2002/13847 (página 71-74); documento WO2002/14503 (página 114-117); documento WO2001/53463 (reivindicación 2; página 41-46); documento WO2001/41787 (Página 15); documento WO2000/44899 (reivindicación 52; Figura 7); documento WO2000/20579 (reivindicación 3; Figura 2); documento US5869445 (reivindicación 3; Col 31-38); documento WO9630514 (reivindicación 2; página 56-61); documento EP1439393 (reivindicación 7); documento WO2004/043361 (reivindicación 7); documento WO2004/022709; documento WO2001/00244 25 (Ejemplo 3; Figura 4); Registro: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1

35

ANTICUERPOS

Abbott: documento US20110177095

40

Por ejemplo, un anticuerpo que comprende CDR que tienen al menos un 80 % de identidad de secuencia global con CDR que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (CDR-H1), SEQ ID NO:4 (CDR-H2), SEQ ID NO:5 (CDR-H3), SEQ ID NO:104 y/o SEQ ID NO:6 (CDR-L1), SEQ ID NO: 7 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-L3), en donde el anticuerpo anti-HER2 o el fragmento de unión anti-HER2 tiene inmunogenicidad reducida en comparación con un anticuerpo que tiene una VH de SEQ ID NO: 1 y una VL de SEQ ID NO: 2.

45

Biogen: documento US20100119511

Por ejemplo, Números de registro ATCC: PTA-10355, PTA-10356, PTA-10357, documento PTA-10358

50

Por ejemplo, una molécula de anticuerpo purificada que se une a HER2 que comprende las seis CDR de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en BIIB71F10 (SEQ ID NO: 11, 13), BIIB69A09 (SEQ ID NO:15, 17); BIIB67F10 (SEQ ID NO:19, 21); BIIB67F11 (SEQ ID NO: 23, 25), BIIB66A12 (SEQ ID NO: 27, 29), BIIB66C01 (SEQ ID NO: 31, 33), BIIB65C10 (SEQ ID NO: 35, 37), BIIB65H09 (SEQ ID NO: 39, 41) y BIIB65B03 (SEQ ID NO: 43, 45) o CDR que son idénticas o que no tienen más de dos alteraciones de dichas CDR.

Herceptina (Genentech) - documento US6.054.297; n.º de registro ATCC CRL-10463 (Genentech)

55

Pertuzumab (Genentech)

documento US20110117097

por ejemplo, véanse las SEQ ID NO: 15 y 16, SEQ ID NO: 17 y 18, SEQ ID NO: 23 y 24 y números de registro ATCC HB-12215, HB-12216, CRL 10463, HB-12697.

60

documento US20090285837

documento US20090202546

por ejemplo, Números de registro ATCC: HB-12215, HB-12216, CRL 10463, HB-12698.

documento US20060088523

65

- por ejemplo, Números de registro ATCC: HB-12215, HB-12216

- por ejemplo, un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácido ligera variable y pesada variable en

SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente.

- por ejemplo, un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada de SEQ ID NO: 15 y 23, y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 16 y 24

5

documento US20060018899

- por ejemplo, Números de registro ATCC: (7C2) HB-12215, (7F3) HB-12216, (4D5) CRL-10463, (2C4) HB-12697.
- por ejemplo, un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 23 o una variante desamidada y/u oxidada de la misma.

10

documento US2011/0159014

- por ejemplo, un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena ligera que comprende las regiones hipervariables de SEQ ID NO: 1 "
- Por ejemplo, un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende las regiones hipervariables de SEQ ID NO: 2.

15

20

documento US20090187007

Glycotope: Anticuerpo TrasGEX <http://www.glycotope.com/pipeline>

Por ejemplo, véase International Joint Cancer Institute and Changhai Hospital Cancer Cent: HMTI-Fc Ab - Gao J., et al BMB Rep. 31 oct 2009;42(10):636-41.

25

Symphogen: documento US20110217305

Union Stem Cell &Gene Engineering, China - Liu HQ., et al Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi. mayo 2010;26(5):456-8.

30

(18) NCA (CEACAM6)

Nucleótido

35

n.º de registro GenBank M18728

n.º de versión Genbank M18728.1 GI: 189084

Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:48 AM

Polipéptido

40

n.º de registro GenBank AAA59907

n.º de versión Genbank AAA59907.1 GI: 189085

Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:48 AM

45

Referencias cruzadas

Barnett T., et al Genomics 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:16899-16903, 2002; documento WO2004/063709; documento EP1439393 (reivindicación 7); documento WO2004/044178 (Ejemplo 4); documento WO2004/031238; documento WO2003/042661 (reivindicación 12); documento WO2002/78524 (Ejemplo 2); documento WO2002/86443 (reivindicación 27; página 427); documento WO2002/60317 (reivindicación 2); Registro: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728.

50

55

(19) MDP (DPEP1)

Nucleótido

n.º de registro GenBank BC017023

n.º de versión Genbank BC017023.1 GI: 16877538

Fecha de actualización del registro de Genbank: 6 mar, 2012 01:00 PM

60

Polipéptido

65

n.º de registro GenBank AAH17023

n.º de versión Genbank AAH17023.1 GI: 16877539

Fecha de actualización del registro de Genbank: 6 mar, 2012 01:00 PM

Referencias cruzadas

- 5 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26):16899-16903 (2002)); documento WO2003/016475 (reivindicación 1); documento WO2002/64798 (reivindicación 33; página 85-87); documento JP05003790 (Figura 6-8); documento WO99/46284 (Figura 9); MIM:179780.

(20) IL20R-alfa (IL20Ra, ZCYTOR7)

10

Nucleótido

n.º de registro GenBank AF184971

n.º de versión Genbank AF184971.1 GI: 6013324

15

Fecha de actualización del registro de Genbank: 10 mar, 2010 10:00 PM

Polipéptido

n.º de registro GenBank AAF01320

20

n.º de versión Genbank AAF01320.1 GI: 6013325

Fecha de actualización del registro de Genbank: 10 mar, 2010 10:00 PM

Referencias cruzadas

- 25 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)
- 30 10 Biochemistry 42:12617-12624; Sheikh F., et al (2004) J. Immunol. 172, 2006-2010; documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento US2004/005320 (Ejemplo 5); documento WO2003/029262 (página 74-75); documento WO2003/002717 (reivindicación 2; página 63); documento WO2002/22153 (página 45-47); documento US2002/042366 (página 20-21); documento WO2001/46261 (página 57-59); documento WO2001/46232 (página 63-65); documento WO98/37193 (reivindicación 1; página 55-59); Registro: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.
- 35

(21) Brevican (BCAN, BEHAB)

Nucleótido

40

n.º de registro GenBank AF229053

n.º de versión Genbank AF229053.1 GI: 10798902

Fecha de actualización del registro de Genbank: 11 mar, 2010 12:58 AM

Polipéptido

45

n.º de registro GenBank AAG23135

n.º de versión Genbank AAG23135.1 GI: 10798903

Fecha de actualización del registro de Genbank: 11 mar, 2010 12:58 AM

50

Referencias cruzadas

- 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. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; documento US2003/186372 (reivindicación 11); documento US2003/186373 (reivindicación 11); documento US2003/119131 (reivindicación 1; Figura 52); documento US2003/119122 (reivindicación 1; Figura 52); documento US2003/119126 (reivindicación 1); documento US2003/119121 (reivindicación 1; Figura 52); documento US2003/119129 (reivindicación 1); documento US2003/119130 (reivindicación 1); documento US2003/119128 (reivindicación 1; Figura 52); documento US2003/119125 (reivindicación 1); documento WO2003/016475 (reivindicación 1); documento WO2002/02634 (reivindicación 1)
- 60

(22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5)

Nucleótido

65

n.º de registro GenBank NM_004442

n.º de versión Genbank NM_004442.6 GI:111118979

Fecha de actualización del registro de Genbank: 8 sep, 2012 04:43 PM

Polipéptido

5 n.º de registro GenBank NP_004433
 n.º de versión Genbank NP_004433.2 GI:21396504
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 8 sep, 2012 04:43 PM

Referencias cruzadas

10 Chan, J. and Watt, V.M., Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991) Oncogene 10 (5):897-905 (1995), Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998), Int. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000)); 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
 15 (reivindicación 1; página 42); MIM:600997.

(23) ASLG659 (B7h)

Nucleótido

20 n.º de registro GenBank AX092328
 n.º de versión Genbank AX092328.1 GI: 13444478
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 26 ene, 2011 07:37 AM

25 Referencias cruzadas

documento US2004/0101899 (reivindicación 2); documento WO2003104399 (reivindicación 11); documento WO2004000221 (Figura 3); documento US2003/165504 (reivindicación 1); documento US2003/124140 (Ejemplo 2); documento US2003/065143 (Figura 60); documento WO2002/102235 (reivindicación 13; página 299); documento US2003/091580 (Ejemplo 2); documento WO2002/10187 (reivindicación 6; Figura 10); documento WO2001/94641 (reivindicación 12; Figura 7b); documento WO2002/02624 (reivindicación 13; Figura 1A-1B); documento US2002/034749 (reivindicación 54; página 45-46); documento WO2002/06317 (Ejemplo 2; página 320-321, reivindicación 34; página 321-322); documento WO2002/71928 (página 468-469); documento WO2002/02587 (Ejemplo 1; Figura 1); documento WO2001/40269 (Ejemplo 3; páginas 190-192); documento WO2000/36107 (Ejemplo 2; página 205-207); documento WO2004/053079 (reivindicación 12); documento WO2003/004989 (reivindicación 1); documento WO2002/71928 (página 233-234, 452-453); documento WO 01/16318.

(24) PSCA (precursor de antígeno de células madre de próstata)

40 Nucleótido

n.º de registro GenBank AJ297436
 n.º de versión Genbank AJ297436.1 GI: 9367211
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 1 feb, 2011 11:25 AM

45 Polipéptido

n.º de registro GenBank CAB97347
 n.º de versión Genbank CAB97347.1 GI: 9367212
 50 Fecha de actualización del registro de Genbank: 1 feb, 2011 11:25 AM

Referencias cruzadas

Reiter R.E., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., et al Oncogene 19,1288-1296, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):783-788; documento WO2004/022709; documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento US2004/018553 (reivindicación 17); documento WO2003/008537 (reivindicación 1); documento WO2002/81646 (reivindicación 1; página 164); documento WO2003/003906 (reivindicación 10; página 288); documento WO2001/40309 (Ejemplo 1; Figura 17); documento US2001/055751 (Ejemplo 1; Figura 1b); documento WO2000/32752 (reivindicación 18; Figura 1); documento WO98/51805 (reivindicación 17; página 97); documento WO98/51824 (reivindicación 10; página 94); documento WO98/40403 (reivindicación 2; Figura 1B); Registro: O43653; EMBL; AF043498; AAC39607.1

(25) GEDA

65 Nucleótido

n.º de registro GenBank AY260763
 n.º de versión Genbank AY260763.1 GI: 30102448
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 11 mar, 2010 02:24 AM

5 Polipéptido

n.º de registro GenBank AAP14954
 n.º de versión Genbank AAP14954.1 GI: 30102449
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 11 mar, 2010 02:24 AM

10

Referencias cruzadas

lipoma AP14954 proteína similar al compañero de fusión HMGIC /pid=AAP14954.1 - Homo sapiens (humano); documento WO2003/054152 (reivindicación 20); documento WO2003/000842 (reivindicación 1); documento WO2003/023013 (Ejemplo 3, reivindicación 20); documento US2003/194704 (reivindicación 45); GI:30102449;

15

(26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, BLyS receptor 3, BR3)

Nucleótido

20

n.º de registro GenBank AF116456
 n.º de versión Genbank AF116456.1 GI: 4585274
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 10 mar, 2010 09:44 PM

25

Polipéptido

n.º de registro GenBank AAD25356
 n.º de versión Genbank AAD25356.1 GI: 4585275
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 10 mar, 2010 09:44 PM

30

Referencias cruzadas

receptor BAFF /pid=NP_443177.1 - Homo sapiens: Thompson, J.S., et al Science 293 (5537), 2108-2111 (2001); documento WO2004/058309; documento WO2004/011611; documento WO2003/045422 (Ejemplo; página 32-33); documento WO2003/014294 (reivindicación 35; Figura 6B); documento WO2003/035846 (reivindicación 70; página 615-616); documento WO2002/94852 (Col 136-137); documento WO2002/38766 (reivindicación 3; página 133); documento WO2002/24909 (Ejemplo 3; Figura 3); MIM:606269; NP_443177.1; NM_052945_1; AF132600

35

(27) CD22 (isoforma CD22-B del receptor de linfocitos B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814)

40

Nucleótido

n.º de registro GenBank AK026467
 n.º de versión Genbank AK026467.1 GI: 10439337
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 11 sep, 2006 11:24 PM

45

Polipéptido

n.º de registro GenBank BAB15489
 n.º de versión Genbank BAB15489.1 GI: 10439338
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 11 sep, 2006 11:24 PM

50

Referencias cruzadas

Wilson et al (1991) J. Exp. Med. 173:137-146; documento WO2003/072036 (reivindicación 1; Figura 1); IM:107266; NP_001762.1; NM_001771_1.

55

(27a) CD22 (molécula CD22)

60

Nucleótido

n.º de registro GenBank X52785
 n.º de versión Genbank X52785.1 GI: 29778
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 2 feb, 2011 10:09 AM

65

Polipéptido

n.º de registro GenBank CAA36988
 n.º de versión Genbank CAA36988.1 GI: 29779
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 2 feb, 2011 10:09 AM

5

Referencias cruzadas

Stamenkovic I. et al., Nature 345 (6270), 74-77 (1990)??

10 Otra información

Símbolo oficial: CD22
 Otros alias: SIGLEC-2, SIGLEC2
 Otras designaciones: receptor de células B CD22; molécula de adhesión celular de linfocitos B; BL-CAM; antígeno CD22; antígeno de superficie de células T Leu-14; lectina 2 similar a Ig que se une a ácido siálico; lectina 2 similar a Ig que se une al ácido siálico

15

ANTICUERPOS

20 G5/44 (Inotuzumab): DiJoseph JF., et al Cancer Immunol Immunother. ene 2005;54(1):11-24.

Epratuzumab-Goldenberg DM., et al Expert Rev Anticancer Ther. 6(10): 1341-53, 2006.

25 **(28)** *CD79a (CD79A, CD79alfa), alfa asociado a inmunoglobulina, una proteína específica de células B que interactúa covalentemente con la Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie con 35 moléculas de Ig M, transduce una señal implicada en la diferenciación de células B*, pl: 4,84, MW: 25028 TM: 2 [P] Cromosoma génico: 19q13.2).

30 Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_001783
 n.º de versión Genbank NM_001783.3 GI:90193587
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 26 Jun, 2012 01:48 PM

35 Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_001774
 n.º de versión Genbank NP_001774.1 GI:4502685
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 26 Jun, 2012 01:48 PM

40

Referencias cruzadas

45 Documento WO2003/088808, documento US2003/0228319; documento WO2003/062401 (reivindicación 9); documento US2002/150573 (reivindicación 4, páginas 13-14); documento WO99/58658 (reivindicación 13, Figura 16); documento WO92/07574 (Figura 1); US5644033; Ha et al (1992) J. Immunol. 148(5):1526-1531; Muller et al (1992) Eur. J. Immunol. 22:1621-1625; Hashimoto et al (1994) Immunogenetics 40(4):287-295; Preud'homme et al (1992) Clin. Exp.

50 5 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

55 **(29)** *CXCR5 (receptor 1 del linfoma de Burkitt, un receptor acoplado a proteína G que se activa mediante la quimiocina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y en la defensa humoral, juega un papel 10 en la infección por VIH-2 y quizás en el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma y leucemia)*; 372 aa, pl: 8,54 MW: 41959 TM: 7 [P] Cromosoma génico: 11q23.3,

Nucleótido

60 n.º de registro GenBank NM_001716
 n.º de versión Genbank NM_001716.4 GI:342307092
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 sep, 2012 01:49 PM

Polipéptido

65 n.º de registro GenBank NP_001707
 n.º de versión Genbank NP_001707.1 GI:4502415

Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 sep, 2012 01:49 PM

Referencias cruzadas

- 5 Documento WO2004/040000; documento WO2004/015426; documento US2003/105292 (Ejemplo 2); documento US6555339 (Ejemplo 2); documento WO2002/61087 (Figura 1); documento WO2001/57188 (reivindicación 20, página 269); documento WO2001/72830 (páginas 12-13); documento WO2000/22129 (Ejemplo 1, páginas 152-153, Ejemplo 2, páginas 254-256); documento WO99/28468 (reivindicación 1, página 38); documento US5440021 (Ejemplo 2, col 49-52); documento WO94/28931 (páginas 56-58); documento WO92/17497 (reivindicación 7, Figura 5); Dobner et al (1992) Eur. J. Immunol. 22:2795-2799; Barella et al (1995) Biochem. J. 309:773-779

(30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula de clase II de MHC (antígeno Ia) que se une a péptidos y los 20 presenta a linfocitos T CD4+); 273 aa, pl: 6,56, MW: 30820. TM: 1 [P] Cromosoma génico: 6p21.3)

15 Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_002120
n.º de versión Genbank NM_002120.3 GI:118402587
Fecha de actualización del registro de Genbank: 8 sep, 2012 04:46 PM

20

Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_002111
n.º de versión Genbank NP_002111.1 GI:4504403
Fecha de actualización del registro de Genbank: 8 sep, 2012 04:46 PM

25

Referencias cruzadas

- 30 Tonnelle et al (1985) EMBO J. 4(11):2839-2847; Jonsson et al (1989) Immunogenetics 29(6):411-413; Beck et al (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441; Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903; Servenius et al (1987) J. Biol. Chem. 262:8759-8766; Beck et al (1996) J. Mol. Biol. 255:1-13; Naruse et al (2002) Tissue Antigens 59:512-519; documento WO99/58658 (reivindicación 13, Figura 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

35

(31) P2X5 (Receptor purinérgico P2X del canal de iones controlado por ligando 5, un canal de iones controlado por ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión sináptica y en la neurogénesis, la deficiencia puede contribuir a la fisiopatología de la inestabilidad idiopática del detrusor); 422 aa, pl: 7,63, MW: 47206 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 17p13.3).

40

Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_002561
n.º de versión Genbank NM_002561.3 GI:325197202
Fecha de actualización del registro de Genbank: 27 Jun, 2012 12:41 AM

45

Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_002552
n.º de versión Genbank NP_002552.2 GI:28416933
Fecha de actualización del registro de Genbank: 27 Jun, 2012 12:41 AM

50

Referencias cruzadas

- 55 Le et al (1997) FEBS Lett. 418(1-2):195-199; documento WO2004/047749; documento WO2003/072035 (reivindicación 10); Touchman et al (2000) Genome Res. 10:165-173; documento WO2002/22660 (reivindicación 20); documento WO2003/093444 (reivindicación 1); documento WO2003/087768 (reivindicación 1); documento WO2003/029277 (página 82)

(32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de linfocitos B, Lyb-2); 359 aa, pl: 8,66, MW: 40225, TM: 1 5 [P] Cromosoma génico: 9p13.3).

Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_001782
n.º de versión Genbank NM_001782.2 GI:194018444

65

Fecha de actualización del registro de Genbank: 26 Jun, 2012 01:43 PM

Polipéptido

5 n.º de registro GenBank NP_001773
 n.º de versión Genbank NP_001773.1 GI:4502683
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 26 Jun, 2012 01:43 PM

Referencias cruzadas

10 Documento WO2004042346 (reivindicación 65); documento WO2003/026493 (páginas 51-52, 57-58); documento WO2000/75655 (páginas 105-106); Von Hoegen et al (1990) J. Immunol. 144(12):4870-4877; Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903.

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 a una actividad aumentada de la enfermedad en pacientes con lupus eritematoso sistémico); 661 aa, pl: 6,20, MW: 74147 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 5q12).*

20 Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_005582
 n.º de versión Genbank NM_005582.2 GI:167555126
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 2 sep, 2012 01:50 PM

25 Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_005573
 n.º de versión Genbank NP_005573.2 GI:167555127
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 2 sep, 2012 01:50 PM

30

Referencias cruzadas

35 Documento US2002/193567; documento WO97/07198 (reivindicación 11, páginas 39-42); Miura et al (1996) Genomics 38(3):299-304; Miura et al (1998) Blood 92:2815-2822; documento WO2003/083047; documento WO97/44452 (reivindicación 8, páginas 57-61); documento WO2000/12130 (páginas 24-26).

40 **(34)** *FcRH1 (proteína 1 análoga al receptor Fc, un receptor putativo para el dominio Fc de inmunoglobulinas que contiene los dominios de tipo C2 análogo a Ig e ITAM, puede tener un papel en la diferenciación 20 de linfocitos B); 429 aa, pl: 5,28, MW: 46925 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 1q21-1q22)*

Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_052938
 n.º de versión Genbank NM_052938.4 GI:226958543
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 2 sep, 2012 01:43 PM

45

Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_443170
 n.º de versión Genbank NP_443170.1 GI: 16418419
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 2 sep, 2012 01:43 PM

50

Referencias cruzadas

55 Documento WO2003/077836; documento WO2001/38490 (reivindicación 6, Figura 18E-1-18-E-2); Davis et al (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):9772-9777; documento WO2003/089624 (reivindicación 8); documento EP1347046 (reivindicación 1); documento WO2003/089624 (reivindicación 7).

60 **(35)** *IRTA2 (superfamilia del receptor de translocación 2 asociado a inmunoglobulina, un inmunorreceptor putativo con posibles papeles en el desarrollo de células B y en la linfomagénesis; la desregulación del gen por translocación se produce en algunas neoplasias malignas de células B); 977 aa, pl: 6,88, MW: 106468, TM: 1 [P] Cromosoma génico: 1q21)*

65 Nucleótido

ES 2 791 316 T3

n.º de registro GenBank AF343662
n.º de versión Genbank AF343662.1 GI: 13591709
Fecha de actualización del registro de Genbank: 11 mar, 2010 01:16 AM

5 Polipéptido

n.º de registro GenBank AAK31325
n.º de versión Genbank AAK31325.1 GI: 13591710
Fecha de actualización del registro de Genbank: 11 mar, 2010 01:16 AM

10

Referencias cruzadas

AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; Ratón: AK089756, AY158090, AY506558; NP_112571.1; documento WO2003/024392 (reivindicación 2, Figura 97); Nakayama et al (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124-127; documento WO2003/077836; documento WO2001/38490 (reivindicación 3, Figura 18B-1-18B-2).

15

(36) TENB2 (TMEFF2, tomoregulina, TPEF, HPP1, TR, proteoglicano 35 transmembrana putativo, relacionado con la familia de factores de crecimiento EGF/herregulina y folistatina); 374 aa)

20

Nucleótido

n.º de registro GenBank AF179274
n.º de versión Genbank AF179274.2 GI: 12280939
Fecha de actualización del registro de Genbank: 11 mar, 2010 01:05 AM

25

Polipéptido

n.º de registro GenBank AAD55776
n.º de versión Genbank AAD55776.2 GI: 12280940
Fecha de actualización del registro de Genbank: 11 mar, 2010 01:05 AM

30

Referencias cruzadas

Registro NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, SecRef NCBI: NP_057276; Gen NCBI: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; AY358907, CAF85723, CQ782436; documento WO2004/074320; JP2004113151; documento WO2003/042661; documento WO2003/009814; documento EP1295944 (páginas 69-70); documento WO2002/30268 (página 329); documento WO2001/90304; documento US2004/249130; documento US2004/022727; documento WO2004/063355; documento US2004/197325; documento US2003/232350; documento US2004/005563; documento US2003/124579; Horie et al (2000) Genomics 67:146-152; Uchida et al (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593-602; Liang et al (2000) Cancer Res. 60:4907-12; Glynn-Jones et al (2001) Int J Cancer. 15 oct; 94(2):178-84.

40

(37) PSMA - FOLH1 (folato hidrolasa (antígeno de membrana específico de próstata) 1)

45

Nucleótido

n.º de registro GenBank M99487
n.º de versión Genbank M99487.1 GI: 190663
Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:48 AM

50

Polipéptido

n.º de registro GenBank AAA60209
n.º de versión Genbank AAA60209.1 GI: 190664
Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:48 AM

55

Referencias cruzadas

Israeli R.S., et al Cancer Res. 53 (2), 227-230 (1993)

60

Otra información

Símbolo oficial: FOLH1

65

Otros alias: GIG27, FGCP, FOLH, GCP2, GCPII, NAALAD1, NAALadase, PSM, PSMA, mGCP

Otras designaciones: dipeptidasa ácida ligada a alfa N-acetilada 1; dipeptidasa ácida ligada a alfa N-acetilada I; NAALADasa I; proteína 27 del gen inhibidor del crecimiento celular; folilpoli-gamma-glutamato carboxipeptidasa; glutamato carboxilasa II; glutamato carboxipeptidasa 2; glutamato carboxipeptidasa II; glutamato carboxipeptidasa de membrana; variante de antígeno prostático específico de membrana F; pteroilpoli-gamma-glutamato carboxipeptidasa

ANTICUERPOS

10 documento US 7.666.425:
Anticuerpos producidos por hibridomas que tienen las siguientes referencias ATCC: N.º de registro ATCC HB-12101, N.º de registro ATCC HB-12109, N.º de registro ATCC HB-12127 y N.º de registro ATCC HB-12126.

15 Proscan: un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en 8H12, 3E11, 17G1, 29B4, 30C1 y 20F2 (documento US 7.811.564; Moffett S., et al Hybridoma (Larchmt). dic 2007;26(6):363-72).

Cytogen: anticuerpos monoclonales 7E11-C5 (N.º de registro ATCC HB 10494) y 9H10-A4 (N.º de registro ATCC HB11430) - documento US 5.763.202

20 GlycoMimetics: NUH2 - N.º de registro ATCC HB 9762 (documento US 7.135.301)

Human Genome Science: HPRAJ70 - N.º de registro ATCC 97131 (US 6.824.993); Secuencia de aminoácidos codificada por el clon de ADNc (HPRAJ70) depositada como Depósito la American Type Culture Collection ("ATCC") N.º 97131

25 Medarex: Anticuerpos anti-PSMA que carecen de residuos de fucosilo - documento US 7.875.278

30 Los anticuerpos anti-PSMA de ratón incluyen los anticuerpos 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6, 4C8B9 y monoclonales. Los hibridomas que secretan 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6 o 4C8B9 se han depositado públicamente y se describen en la patente de EE.UU. N.º 6.159.508. Los hibridomas relevantes se han depositado públicamente y se describen en la patente de EE.UU. N.º 6,107,090. Por otra parte, los anticuerpos anti-PSMA humanizados, incluyendo una versión humanizada de J591, se describen con más detalle en la publicación PCT WO 02/098897.

35 Se han descrito otros anticuerpos anti-PSMA de ratón en la técnica, tales como mAb 107-1A4 (Wang, S. et al. (2001) Int. J. Cancer 92:871-876) y mAb 2C9 (Kato, K. et al. (2003) Int. J. Urol. 10:439-444).

40 Los ejemplos de anticuerpos monoclonales humanos anti-PSMA incluyen los anticuerpos 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3, aislados y caracterizados estructuralmente como se describió originalmente en las publicaciones PCT WO 01/09192 y WO 03/064606 y en la Solicitud provisional de EE.UU. 60/654.125, titulada "Human Monoclonal Antibodies to Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA)", presentada el 18 de febrero de 2005. Las secuencias de aminoácidos V.sub.H de 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3 se muestran en SEQ ID NO: 1-9, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos V.sub.L de 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3 se muestran en SEQ ID NO: 10-18, respectivamente.

Otros anticuerpos humanos anti-PSMA incluyen los anticuerpos desvelados en la Publicación PCT WO 03/034903 y la Solicitud de EE.UU. N.º 2004/0033229.

50 NW Biotherapeutics: Una línea celular de hibridoma seleccionada del grupo que consiste en 3F5.4G6 que tiene el número de registro ATCC HB12060, 3D7-1.1. que tiene el número de registro ATCC HB12309, 4E10-1.14 que tiene el número de registro ATCC HB12310, 3E11 (ATCC HB12488), 4D8 (ATCC HB12487), 3E6 (ATCC HB12486), 3C9 (ATCC HB12484), 2C7 (ATCC HB12490), 1G3 (ATCC HB12489), 3C4 (ATCC HB12494), 3C6 (ATCC HB12491), 4D4 (ATCC HB12493), 1G9 (ATCC HB12495), 5C8B9 (ATCC HB12492) y 3G6 (ATCC HB12485) - véase el documento US 6.150.508

60 PSMA Development Company / Progenics / Cytogen - Seattle Genetics: mAb 3.9, producido por el hibridoma depositado con el número de registro ATCC PTA-3258 o mAb 10.3, producido por el hibridoma depositado bajo el número de registro ATCC PTA-3347 - documento US 7.850.971

PSMA Development Company-Composiciones de anticuerpos PSMA (documento US 20080286284, Tabla 1)
Esta solicitud es una división de la solicitud de patente de EE.UU. con N.º de Ser. 10/395.894, presentada el 21 de marzo de 2003 (documento US 7.850.971)

65 University Hospital Freiburg, Alemania - mAb 3/A12, 3/E7 y 3/F11 (Wolf P., et al Prostate. 1 abr 2010;70(5):562-9).

(38) SST (receptor de somatostatina; nótese que hay 5 subtipos) (38.1) SSTR2 (receptor 2 de somatostatina)

Nucleótido

5 n.º de registro GenBank NM_001050
n.º de versión Genbank NM_001050.2 GI:44890054
Fecha de actualización del registro de Genbank: 19 ago, 2012 01:37 PM

Polipéptido

10 n.º de registro GenBank NP_001041
n.º de versión Genbank NP_001041.1 GI:4557859
Fecha de actualización del registro de Genbank: 19 ago, 2012 01:37 PM

15 Referencias cruzadas

Yamada Y., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89 (1), 251-255 (1992); Susini C., et al Ann Oncol. dic 2006;17(12):1733-42

20 Otra información

Símbolo oficial: SSTR2
Otras designaciones: SRIF-1; SS2R; receptor de somatostatina tipo 2

25 (38.2) SSTR5 (receptor 5 de somatostatina)

Nucleótido

30 n.º de registro GenBank D16827
n.º de versión Genbank D16827.1 GI: 487683
Fecha de actualización del registro de Genbank: 1 ago, 2006 12:45 PM

Polipéptido

35 n.º de registro GenBank BAA04107
n.º de versión Genbank BAA04107.1 GI: 487684
Fecha de actualización del registro de Genbank: 1 ago, 2006 12:45 PM

Referencias cruzadas

40 Yamada, Y., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 195 (2), 844-852 (1993)

Otra información

45 Símbolo oficial: SSTR5
Otros alias: SS-5-R
Otras designaciones: Receptor de somatostatina subtipo 5; receptor de somatostatina tipo 5

50 (38.3) SSTR1
(38.4) SSTR3
(38.5) SSTR4

AvB6 - Ambas subunidades (39+40)

55 **(39) ITGAV (Integrina, alfa V;**

Nucleótido

60 n.º de registro Genbank M14648 J02826 M18365
n.º de versión Genbank M14648.1 GI: 340306
Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:56 AM

Polipéptido

65 n.º de registro GenBank AAA36808
n.º de versión Genbank AAA36808.1 GI: 340307

Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:56 AM

Referencias cruzadas

- 5 Suzuki S., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83 (22), 8614-8618 (1986)

Otra información

- 10 Símbolo oficial: ITGAV
Otros alias: CD51, MSK8, VNRA, VTNR
Otras designaciones: antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal L230; integrina alfa-V; integrina alfaVbeta3; integrina, alfa V (receptor de vitronectina, polipéptido alfa, antígeno CD51); subunidad alfa del receptor de vitronectina

- 15 **(40)** *ITGB6 (Integrina, beta 6)*

Nucleótido

- 20 n.º de registro GenBank NM_000888
n.º de versión Genbank NM_000888.3 GI:9966771
Fecha de actualización del registro de Genbank: 27 Jun, 2012 12:46 AM

Polipéptido

- 25 n.º de registro GenBank NP_000879
n.º de versión Genbank NP_000879.2 GI:9625002
Fecha de actualización del registro de Genbank: 27 Jun, 2012 12:46 AM

Referencias cruzadas

- 30 Sheppard D.J., et al Biol. Chem. 265 (20), 11502-11507 (1990)

Otra información

- 35 Símbolo oficial: ITGB6
Otras designaciones: integrina beta-6

ANTICUERPOS

- 40 Biogen: documento US 7.943.742 - Los clones de hibridoma 6.3G9 y 6.8G6 se depositaron en la ATCC, números de registro ATCC PTA-3649 y -3645, respectivamente.

- 45 Biogen: documento US7.465.449 - En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las mismas secuencias de polipéptidos de cadena pesada y ligera que un anticuerpo producido por hibridoma 6.1A8, 6.3G9, 6.8G6, 6.2B1, 6.2B10, 6.2A1, 6.2E5, 7.1G10, 7.7G5, o 7.1C5.

- 50 Centocor (J&J): documento US7.550.142; documento US7.163.681
Por ejemplo, en el documento US 7.550.142, un anticuerpo que tiene regiones variables de cadena pesada humana y cadena ligera humana que comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.

Seattle Genetics: 15H3 (Ryan MC., et al Cancer Res 15 de abril de 2012; 72 (Suplemento 8): 4630)

- 55 **(41)** *CEACAM5 (molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 5)*

Nucleótido

- 60 n.º de registro GenBank M17303
n.º de versión Genbank M17303.1 GI: 178676
Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:47 AM

Polipéptido

- 65 n.º de registro GenBank AAB59513
n.º de versión Genbank AAB59513.1 GI: 178677
Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:47 AM

Referencias cruzadas

Beauchemin N., et al Mol. Cell. Biol. 7 (9), 3221-3230 (1987)

5

Otra información

Símbolo oficial: CEACAM5

Otros alias: CD66e, CEA

10 Otras designaciones: antígeno meconio 100

ANTICUERPOS

AstraZeneca-MedImmune: documento US 20100330103; documento US20080057063;
15 documento US20020142359

- por ejemplo, un anticuerpo que tiene regiones determinantes de complementariedad (CDR) con las siguientes
secuencias: cadena pesada; CDR1 - DNYMH, CDR2 - WIDPENGDT E YAPKFRG, CDR3 - LIYAGYLAMD Y; y
20 cadena ligera CDR1 - SASSSVTYMH, CDR2 - STSNLAS, CDR3 - QQRSTYPLT.

- Hibridoma 806.077 depositado como depósito de la European Collection of Cell Cultures (ECACC) n.º 96022936.

Research Corporation Technologies, Inc.: documento US5.047.507

Bayer Corporation: documento US6.013.772

25

BioAlliance: documento US7.982.017; documento US7.674.605

• documento US 7.674.605

30 - un anticuerpo que comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la secuencia de
aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la secuencia de
aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

- un anticuerpo que comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la secuencia de
35 aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la secuencia de
aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

Celltech Therapeutics Limited: documento US5.877.293

The Dow Chemical Company: documento US5.472.693; documento US6.417.337; documento US6.333.405

40

documento US5.472.693 - por ejemplo, N.º ATCC CRL-11215

documento US6.417.337 - por ejemplo, ATCC CRL-12208

documento US6.333.405, por ejemplo, ATCC CRL-12208

45 Immunomedics, Inc: documento US7.534.431; documento US7.230.084; documento US7.300.644; documento
US6.730.300;

documento US20110189085

50 - un anticuerpo que tiene CDR de la región variable de la cadena ligera comprende: CDR1 comprende
KASQDVGTSVA (SEQ ID NO: 20); CDR2 comprende WTSTRHT (SEQ ID NO: 21); y CDR3 comprende
QQYSLYRS (SEQ ID NO: 22); y las CDR de la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo anti-
CEA comprenden: CDR1 comprende TYWMS (SEQ ID NO: 23); CDR2 comprende EIHPDSSTINYAPSLKD
55 (SEQ ID NO: 24); y CDR3 comprende LYFGF-PWFAY (SEQ ID NO: 25).

Documento US20100221175; documento US20090092598; documento US20070202044; documento
US20110064653;

documento US20090185974; documento US20080069775.

60 **(42) MET (met protooncogén; receptor del factor de crecimiento de hepatocitos)**

Nucleótido

n.º de registro GenBank M35073

n.º de versión Genbank M35073.1 GI: 187553

Fecha de actualización del registro de Genbank: 6 mar, 2012 11:12 AM

65

Polipéptido

5 n.º de registro GenBank AAA59589
 n.º de versión Genbank AAA59589.1 GI: 553531
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 6 mar, 2012 11:12 AM

Referencias cruzadas

10 Dean M., et al Nature 318 (6044), 385-388 (1985)

Otra información

15 Símbolo oficial: MET
 Otros alias: AUTS9, HGFR, RCCP2, c-Met
 Otras designaciones: receptor de HGF; receptor HGF/SF; receptor de SF; receptor del factor de crecimiento de hepatocitos; met protooncogén tirosina quinasa; protooncogén c-Met; receptor del factor de dispersión; tirosina-proteína quinasa Met

20 *ANTICUERPOS*

Abgenix/Pfizer: documento US20100040629
 por ejemplo, el anticuerpo producido por el hibridoma 13.3.2 que tiene el número de registro de la American Type Culture Collection (ATCC) PTA-5026; el anticuerpo producido por el hibridoma 9.1.2 que tiene el número de registro ATCC PTA-5027; el anticuerpo producido por el hibridoma 8.70.2 que tiene el número de registro ATCC PTA-5028; o el anticuerpo producido por el hibridoma 6.90.3 que tiene el número de registro ATCC PTA-5029.

Amgen/Pfizer: documento US20050054019
 por ejemplo, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 2 donde X2 es glutamato y X4 es serina y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4 donde X8 es alanina, sin las secuencias señal; un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 6 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 8, sin las secuencias señal; un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 10 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 12, sin las secuencias señal; o un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 16, sin las secuencias señal.

40 Agouron Pharmaceuticals (ahora Pfizer): documento US20060035907

Eli Lilly: documento US20100129369

45 Genentech: documento US5.686.292; documento US20100028337; documento US20100016241; documento US20070129301; documento US20070098707; US20070092520, documento US20060270594; documento US20060134104; documento US20060035278; documento US20050233960; documento US20050037431

50 documento US 5.686.292 - por ejemplo, ATCC HB-11894 y ATCC HB-11895
 documento US 20100016241 - por ejemplo, ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6)

National Defense Medical Center, Taiwan: Lu RM., et al Biomaterials. Abr 2011;32(12):3265-74.

55 Novartis: documento US20090175860

60 - por ejemplo, un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada 4687, en donde las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada 4687 son los restos 26-35, 50-65 y 98-102, respectivamente, de SEQ ID NO: 58; y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera 5097, en donde las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera 5097 son los restos 24-39,55-61 y 94-100 de SEQ ID NO: 37.

Pharmacia Corporation: documento US20040166544

65 Pierre Fabre: US20110239316, US20110097262, documento US20100115639

Samsung: documento US 20110129481 - por ejemplo, un anticuerpo monoclonal producido a partir de una célula de

hibridoma que tiene el número de acceso KCLRF-BP-00219 o el número de registro de KCLRF-BP-00223.

Samsung: documento US 20110104176 - por ejemplo, un anticuerpo producido por una célula de hibridoma que tiene Número de Registro: KCLRF-BP-00220.

5

University of Turin Medical School: DN-30 Pacchiana G., et al J Biol Chem. 12 de nov de 2010;285(46):36149-57

Van Andel Research Institute: Jiao Y., et al Mol Biotechnol. sep 2005;31(1):41-54.

10 **(43) MUC1** (*Mucina 1 asociada a la superficie celular*)

Nucleótido

15 n.º de registro GenBank J05581
n.º de versión Genbank J05581.1 GI: 188869
Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:48 AM

Polipéptido

20 n.º de registro GenBank AAA59876
n.º de versión Genbank AAA59876.1 GI: 188870
Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:48 AM

Referencias cruzadas

25 Gendler S.J., et al J. Biol. Chem. 265 (25), 15286-15293 (1990)

Otra información

30 Símbolo oficial: documento MUC1
Otros alias: RP11-263K19.2, CD227, EMA, H23AG, KL-6, MAM6, MUC-1, MUC-1/SEC, MUC-1/X, MUC1/ZD, PEM, PEMT, PUM
Otras designaciones: antígeno DF3; antígeno H23; antígeno asociado a carcinoma de mama DF3; mucina asociada a carcinoma; episialina; krebs von den Lungen-6; mucina 1, transmembrana; mucina-1; mucina urinaria reactiva de cacahuete; mucina epitelial polimórfica; mucina epitelial asociada a tumor; antígeno de membrana epitelial asociado a tumor; mucina asociada a tumor

35

ANTICUERPOS

40 AltaRex-Quest Pharma Tech: documento US 6.716.966 - por ejemplo, un anticuerpo Alt-1 producido por el hibridoma ATCC N.º PTA-975.

AltaRex-Quest Pharma Tech: documento US7.147.850

45 CRT: 5E5 - Sorensen AL., et al Glycobiology vol. 16 n.º 2 pp. 96-107, 2006; HMFG2-Burchell J., et al Cancer Res., 47, 5476-5482 (1987); véase el documento WO2015/159076

Glycotope GT-MAB: GT-MAB 2.5-GEX (Sitio web: <http://www.glycotope.com/pipeline/pankomab-gex>)

50 Immunogen: documento US7.202.346

- por ejemplo, anticuerpo MJ-170: línea celular de hibridoma MJ-170 n.º de registro ATCC PTA-5286 anticuerpo monoclonal MJ-171: línea celular de hibridoma MJ-171 ATCC n.º. PTA-5287; anticuerpo monoclonal MJ-172: línea celular de hibridoma MJ-172 ATCC n.º. PTA-5288; o anticuerpo monoclonal MJ-173: línea celular de hibridoma MJ-173 ATCC n.º PTA-5302

55

Immunomedics: documento US 6.653.104

Ramot Tel Aviv Uni: documento US7.897.351

60

Regents Uni. CA: documento US 7.183.388; documento US20040005647; documento US20030077676.

Roche GlycArt: documento US8.021.856

65 Russian National Cancer Research Center: Imuteran-Ivanov PK., et al Biotechnol J. jul 2007;2(7):863-70

Technische Univ Braunschweig: (IIB6, HT186-B7, HT186-D11, HT186-G2, HT200-3A-C1, HT220-M-D1, HT220-M-G8) - Thie H., et al PLoS One. 14 ene 2011;6(1):e15921

(44) CA9 (anhidrasa carbónica IX)

5 Nucleótido
 n.º de registro Genbank X66839
 n.º de versión Genbank X66839.1 GI: 1000701
 10 Fecha de actualización del registro de Genbank: 2 feb, 2011 10:15 AM

Polipéptido

15 n.º de registro GenBank CAA47315
 n.º de versión Genbank CAA47315.1 GI: 1000702
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 2 feb, 2011 10:15 AM

Referencias cruzadas

20 Pastorek J., et al Oncogene 9 (10), 2877-2888 (1994)

Otra información

25 Símbolo oficial: documento CA9
 Otros alias: CAIX, MN
 Otras designaciones: CA-IX; P54/58N; antígeno G250 asociado a RCC; proteína G250 asociada a RCC; carbonato deshidratasa IX; anhidrasa carbónica 9; deshidratasa carbónica; antígeno de membrana MN; pMW1; antígeno asociado a carcinoma de células renales G250

30 **ANTICUERPOS**

Abgenix/Amgen: documento US20040018198

35 Affibody: moléculas anti-CAIX Affibody (<http://www.affibody.com/en/Product-Portfolio/Pipeline/>)

Bayer: documento US7.462.696

Bayer/Morphosys: 3ee9 mAb - Petrul HM., et al Mol Cancer Ther. feb 2012;11(2):340-9

40 Harvard Medical School: Anticuerpos G10, G36, G37, G39, G45, G57, G106, G119, G6, G27, G40 y G125. Xu C., et al PLoS One. 10 mar 2010;5(3):e9625

Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences (Bayer) - documento US5.955.075

45 - por ejemplo, M75-ATCC N.º de registro HB 11128 o MN12 - ATCC N.º de registro HB 11647

Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences: documento US7.816.493

50 - por ejemplo, el anticuerpo monoclonal M75 que se secreta del hibridoma VU-M75, que se depositó en la American Type Culture Collection bajo ATCC N.º HB 11128; o el anticuerpo monoclonal V/10 secretado del hibridoma V/10-VU, que se depositó en la International Depository Authority of the Belgian Coordinated Collection of Microorganisms (BCCM) en el Laboratorium voor Moleculaire Biologie-Plasmidencollectie (LMBP) en la Univeriteit Gent en Gent, Bélgica, bajo el N.º de registro LMBP 6009CB.

55 Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences documento US20080177046; documento US20080176310; documento US20080176258; documento US20050031623

Novartis: documento US20090252738

60 Wilex: documento US7.691.375 - por ejemplo, el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma DSM ASC 2526.

Wilex: documento US20110123537; Rencarex: Kennett RH., et al Curr Opin Mol Ther. feb 2003;5(1):70-5

65 Xencor: documento US20090162382

(45) *EGFRVIII (receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), variante de transcrito 3,*

Nucleótido

5 n.º de registro GenBank NM_201283
 n.º de versión Genbank NM_201283.1 GI:41327733
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 sep, 2012 01:47 PM

Polipéptido

10 n.º de registro GenBank NP_958440
 n.º de versión Genbank NP_958440.1 GI:41327734
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 sep, 2012 01:47 PM

15 Referencias cruzadas

Batra SK., et al Cell Growth Differ 1995;6:1251-1259.

ANTICUERPOS:

20 Documentos US7.628.986 y US7.736.644 (Amgen)
 Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 142 y variantes y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 144 y variantes.

25 Documento US20100111979 (Amgen)
 Por ejemplo, un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende:

30 CDR1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos para la región CDR1 de los anticuerpos 13.1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16) y 333 (SEQ ID NO: 17); CDR2 que
 35 consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos para la región CDR2 de los anticuerpos 13.1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16) y 333 (SEQ ID NO: 17); y
 CDR3 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos para la región CDR3 de los anticuerpos 13.1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4),
 40 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16) y 333 (SEQ ID NO: 17).

Documento US20090240038 (Amgen)
 Por ejemplo, un anticuerpo que tiene al menos uno de los polipéptidos de cadena pesada o ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144 y cualquier combinación de las mismas.

Documento US20090175887 (Amgen)
 Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo 13.1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16) y 333 (SEQ ID NO: 17).

Documento US20090156790 (Amgen)
 Por ejemplo, un anticuerpo que tiene un polipéptido de cadena pesada y un polipéptido de cadena ligera, en donde al menos uno de los polipéptidos de cadena pesada o ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144 y cualquier combinación de las mismas.

60 Documentos US20090155282, US20050059087 y US20050053608 (Amgen)
 Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de un anticuerpo seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo 13.1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16) y 333 (SEQ ID NO: 17).

MR1-1 (documento US7.129.332; Duke)

Por ejemplo, un anticuerpo variante que tiene la secuencia de SEQ ID NO:18 con las sustituciones S98P-T99Y en la CDR3 VH y F92W en la CDR3 VL.

5

Documentos L8A4, Documentos H10, Y10 (Wikstrand C.J., et al Cancer Res. 15 jul 1995;55(14):3140-8; Duke)

Documento US20090311803 (Universidad de Harvard)

Por ejemplo, SEQ ID NO: 9 para la región variable de la cadena pesada del anticuerpo y SEQ ID NO: 3 para las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera

10

Documento US20070274991 (EMD72000, también conocido como matuzumab; Universidad de Harvard)

Por ejemplo, SEQ ID NO: 3 y 9 para cadena ligera y cadena pesada respectivamente

15

Documento US6.129.915 (Schering)

Por ejemplo, SEQ. ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

mAb CH12 - Wang H., et al FASEB J. ene 2012;26(1):73-80 (Shanghai Cancer Institute).

20

RABDMvIII - Gupta P., et al BMC Biotechnol. 7 oct 2010;10:72 (Stanford University Medical Center).

mAb Ua30 - Ohman L., et al Tumour Biol. mar-abr 2002;23(2):61-9 (Uppsala University).

Han DG., et al Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. ene 2010;30(1):25-9 (Xi'an Jiaotong University).

25

(46) CD33 (molécula CD33)

Nucleótido

30

n.º de registro GenBank M_23197

n.º de versión Genbank NM_23197.1 GI:180097

Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:47 AM

Polipéptido

35

n.º de registro GenBank AAA51948

n.º de versión Genbank AAA51948.1 GI: 188098

Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:47 AM

40

Referencias cruzadas

Simmons D., et al J. Immunol. 141 (8), 2797-2800 (1988)

45

Otra información

Símbolo oficial: CD33

Otros alias: SIGLEC-3, SIGLEC3, p67

Otras designaciones: antígeno CD33 (gp67); gp67; antígeno de superficie celular mieloide CD33; lectina 3 similar a Ig que se une a ácido siálico; lectina similar a Ig que se une al ácido siálico

50

ANTICUERPOS

H195 (Lintuzumab)- Raza A., et al Leuk Lymphoma. ago 2009;50(8):1336-44; documento US6.759.045 (Seattle Genetics/Immunomedics)

55

mAb OKT9: Sutherland, D.R. et al. Proc Natl Acad Sci USA 78(7): 4515-4519 1981, Schneider, C., et al J Biol Chem 257, 8516-8522 (1982)

60

mAb E6: Hoogenboom, H.R., et al J Immunol 144, 3211-3217 (1990)

documento US6.590.088 (Human Genome Sciences)

Por ejemplo, SEQ ID NO: 1 y 2 y el n.º de registro de ATCC 97521

65

Documento US7.557.189 (Immunogen)

Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-3 y una región variable de cadena

ligera que comprende tres CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4-6.

(47) CD19 (molécula CD19)

5 Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_001178098
 n.º de versión Genbank NM_001178098.1 GI:296010920
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 10 sep 2012 12:43 AM

10

Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_001171569
 n.º de versión Genbank NP_001171569.1 GI:296010921
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 10 sep 2012 12:43 AM

15

Referencias cruzadas

Tedder TF., et al J. Immunol. 143 (2): 712-7 (1989)

20

Otra información

Símbolo oficial: CD19
 Otros alias: B4, CVID3
 Otras designaciones: antígeno de linfocitos B CD19; antígeno de superficie de linfocitos B B4; antígeno de superficie de células T Leu-12; antígeno de diferenciación CD19

25

ANTICUERPOS

Immunogen: HuB4 - Al-Katib AM., et al Clin Cancer Res. 15 jun 2009;15(12):4038-45.

30

4G7: Kügler M., et al Protein Eng Des Sel. mar 2009;22(3):135-47
 Por ejemplo, secuencias en la Figura 3 de Knappik, A. et al. J Mol Biol 2000 Feb;296(1):57-86 AstraZeneca /MedImmune: MEDI-551 - Herbst R., et al J Pharmacol Exp Ther. oct 2010;335(1):213-22

35

Glenmark Pharmaceuticals: GBR-401 - Hou S., et al Mol Cancer Ther noviembre de 2011 (Meeting Abstract Supplement) C164

Documento US7.109.304 (Immunomedics)
 Por ejemplo, un anticuerpo que comprende la secuencia de hA19Vk (SEQ ID NO: 7) y la secuencia de hA19VH (SEQ ID NO: 10)

40

Documento US7.902.338 (Immunomedics)
 Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las secuencias CDR de la región determinante de complementariedad de la cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 16 (KASQSVVDYDGDSYLN); CDR2 de SEQ ID NO: 17 (DASNLVS); y CDR3 de SEQ ID NO: 18 (QQSTEDPWT) y las secuencias CDR de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 19 (SYWMN); CDR2 de SEQ ID NO: 20 (QIWPGDGDNTNYNGKFKG) y CDR3 de SEQ ID NO: 21 (RETTTVGRRYYAMDY) y también comprende secuencias del marco de anticuerpos humanos (FR) y de región constante con uno o más restos de aminoácidos de la región marco sustituidos de las secuencias de la región marco correspondiente del anticuerpo murino original y en donde dichos restos FR sustituidos comprenden la sustitución de serina por fenilalanina en el resto 91 de Kabat de la región variable de la cadena pesada.

45

50

Medarex: MDX-1342 - Cardarelli PM., et al Cancer Immunol Immunother. feb 2010;59(2):257-65.

MorphoSys /Xencor: MOR-208/XmAb-5574 - Zalevsky J., et al Blood. 16 abr 2009;113(16):3735-43

55

Documento US7.968.687 (Seattle Genetics)
 Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

60

4G7 chim - Lang P., et al Blood. 15 may 2004;103(10):3982-5 (University of Tübingen) Por ejemplo, figura 6 y SEQ ID NO: 80 del documento US20120082664

Zhejiang University School of Medicine: 2E8 - Zhang J., et al J Drug Target. nov 2010;18(9):675-8

65

(48) *IL2RA* (receptor de interleucina 2, alfa); secuencia de referencia de NCBI: NM_000417.2);

Nucleótido

5 n.º de registro GenBank NM_000417
 n.º de versión Genbank NM_000417.2 GI:269973860
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 09 sep 2012 04:59 PM

Polipéptido

10 n.º de registro GenBank NP_000408
 n.º de versión Genbank NP_000408.1 GI:4557667
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 09 sep 2012 04:59 PM

15 Referencias cruzadas

Kuziel W.A., et al J. Invest. Dermatol. 94 (6 SUPPL), 27S-32S (1990)

Otra información

20 Símbolo oficial: *IL2RA*
 Otros alias: RP11-536K7.1, CD25, IDDM10, *IL2R*, TCGFR
 Otras designaciones: Subunidad alfa del receptor *FIL-2*; *IL-2-RA*; subunidad alfa *IL-2R*; *IL2-RA*; antígeno TAC;
 subunidad alfa del receptor de interleucina-2; p55

25 **ANTICUERPOS**

Documento US6.383.487 (Novartis/UCL: Baxilisimab [Simulect])

30 Documento US6.521.230 (Novartis/UCL: Baxilisimab [Simulect])
 Por ejemplo, un anticuerpo que tiene un sitio de unión a antígeno comprende al menos un dominio que
 comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos en SEQ. ID. NO: 7, CDR2 que tiene la secuencia de
 aminoácidos en SEQ. ID. NO: 8 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos en SEQ. ID. NO: 9; o dichas
 CDR1, CDR2 y CDR3 tomadas en secuencia como un todo comprenden una secuencia de aminoácidos que es
 35 al menos un 90 % idéntica a SEQ. ID. NO: 7, 8 y 9 tomadas en secuencia como un todo.

Daclizumab - Rech AJ., et al Ann N Y Acad Sci. sep 2009;1174:99-106 (Roche)

(49) *AXL* (receptor *AXL* tirosina quinasa)

40 Nucleótido

n.º de registro GenBank M76125
 n.º de versión Genbank M76125.1 GI: 292869
 45 Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:53 AM

Polipéptido

50 n.º de registro GenBank AAA61243
 n.º de versión Genbank AAA61243.1 GI: 29870
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:53 AM

Referencias cruzadas

55 O'Bryan J.P., et al Mol. Cell. Biol. 11 (10), 5016-5031 (1991); Bergsagel P.L., et al J. Immunol. 148 (2), 590-596
 (1992)

Otra información

60 Símbolo oficial: *AXL*
 Otros alias: JTK11, UFO
 Otras designaciones: oncogén *AXL*; secuencia/gen transformante *AXL*; *AXL* oncogén; receptor tirosina-proteína
 quinasa UFO

65 **ANTICUERPOS**

YW327.6S2 - Ye X., et al Oncogene. 23 Sep 2010;29(38):5254-64. (Genentech)

BergenBio: BGB324 (<http://www.bergenbio.com/BGB324>)

5 **(50) CD30 - TNFRSF8 (Superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 8) Nucleótido**

n.º de registro GenBank M83554

n.º de versión Genbank M83554.1 GI: 180095

Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:53 AM

10

Polipéptido

n.º de registro GenBank AAA51947

n.º de versión Genbank AAA51947.1 GI: 180096

Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:53 AM

15

Referencias cruzadas

Durkop H., et al Cell 68 (3), 421-427 (1992)

20

Otra información

Símbolo oficial: TNFRSF8

Otros alias: CD30, D1S166E, Ki-1

Otras designaciones: receptor CD30L; antígeno Ki-1; receptor de citocina CD30; antígeno de activación de linfocitos CD30; miembro 8 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral

25

(51) BCMA (antígeno de maduración de células B) - TNFRSF17 (Superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 17)

30

Nucleótido

n.º de registro GenBank Z29574

n.º de versión Genbank Z29574.1 GI: 471244

Fecha de actualización del registro de Genbank: 02 feb, 2011 10:40 AM

35

Polipéptido

n.º de registro GenBank CAA82690

n.º de versión Genbank CAA82690.1 GI: 471245

Fecha de actualización del registro de Genbank: 02 feb, 2011 10:40 AM

40

Referencias cruzadas

Laabi Y., et al Nucleic Acids Res. 22 (7), 1147-1154 (1994)

45

Otra información

Símbolo oficial: TNFRSF17

Otros alias: BCM, BCMA, CD269

Otras designaciones: antígeno de maduración de células B; factor de maduración de células B; proteína de maduración de células B; miembro 17 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral

50

(52) Ag CT - CTA (antígenos de cáncer de testículo)

55

Referencias cruzadas

Fratta E., et al. Mol Oncol. abr 2011;5(2):164-82; Lim SH., et al Am J Blood Res. 2012;2(1):29-35.

60

(53) CD174 (Lewis Y) - FUT3 (fucosiltransferasa 3 (galactósido 3 (4) -L-fucosiltransferasa, Grupo sanguíneo de Lewis)

Nucleótido

n.º de registro GenBank NM000149

n.º de versión Genbank NM000149.3 GI: 148277008

65

Fecha de actualización del registro de Genbank: 26 Jun, 2012 04:49 PM

Polipéptido

5 n.º de registro GenBank NP_000140
n.º de versión Genbank NP_000140.1 GI:4503809
Fecha de actualización del registro de Genbank: 26 Jun, 2012 04:49 PM

Referencias cruzadas

10 Kukowska-Latallo, J.F., et al Genes Dev. 4 (8), 1288-1303 (1990)

Otra información

15 Símbolo oficial: FUT3
Otros alias: CD174, FT3B, FucT-III, LE, Les
Otras designaciones: Lewis FT; alfa-(1,3/1,4)-fucosiltransferasa; grupo sanguíneo de Lewis alfa-4-fucosiltransferasa; fucosiltransferasa III; galactósido 3(4)-L-fucosiltransferasa

20 **(54) CLEC14A** (familia 14 de dominios de lectina de tipo C, miembro A; n.º de registro GenBank NM175060)

Nucleótido

25 n.º de registro GenBank NM175060
n.º de versión Genbank NM175060.2 GI: 371123930
Fecha de actualización del registro de Genbank: 01 abr 2012 03:34 PM

Polipéptido

30 n.º de registro GenBank NP_778230
n.º de versión Genbank NP_778230.1 GI:28269707
Fecha de actualización del registro de Genbank: 01 abr 2012 03:34 PM

Otra información

35 Símbolo oficial: CLEC14A
Otros alias: UNQ236/PRO269, C14orf27, CEG1, EGFR-5
Otras designaciones: familia 14 de dominio de lectina de tipo C miembro A; proteína que contiene el dominio CIECT y similar a EGF; receptor 5 del factor de crecimiento epidérmico

40 **(55) GRP78 - HSPA5** (proteína 5 de choque térmico de 70 kDa (proteína regulada por glucosa, 78 kDa) Nucleótido

45 n.º de registro GenBank NM005347
n.º de versión Genbank NM005347.4 GI: 305855105
Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 sep, 2012 01:42 PM

Polipéptido

50 n.º de registro GenBank NP_005338
n.º de versión Genbank NP_005338.1 GI:16507237
Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 sep, 2012 01:42 PM

Referencias cruzadas

55 Ting J., et al DNA 7 (4), 275-286 (1988)

Otra información

60 Símbolo oficial: HSPA5
Otros alias: BIP, GRP78, MIF2
Otras designaciones: proteína regulada por glucosa de 78 kDa; proteína grp78 de unión a Ca(2+) lumenal del retículo endoplasmático; proteína de unión a la cadena pesada de inmunoglobulina

65 **(56) CD70** (molécula CD70) L08096

Nucleótido

n.º de registro GenBank L08096
n.º de versión Genbank L08096.1 GI: 307127
Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2012 08:54 AM

5

Polipéptido

n.º de registro GenBank AAA36175
n.º de versión Genbank AAA36175.1 GI: 307128
Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2012 08:54 AM

10

Referencias cruzadas

Goodwin R.G., et al Cell 73 (3), 447-456 (1993)

15

Otra información

Símbolo oficial: CD70
Otros alias: CD27L, CD27LG, TNFSF7
Otras designaciones: ligando CD27; CD27-L; antígeno CD70; antígeno Ki-24; antígeno de superficie CD70; superfamilia (ligando) de factor de necrosis tumoral, miembro 7; miembro 7 de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral

20

ANTICUERPOS

25

MDX-1411 contra CD70 (Medarex)

h1F6 (Oflazoglu, E., et al, Clin Cancer Res. 1 oct 2008;14(19):6171-80; Seattle Genetics) Por ejemplo, véase el documento US20060083736 SEQ ID NO: 1, 2, 11 y 12 y la Figura 1.

30

(57) Antígenos específicos de células madre. Por ejemplo:

- 5T4 (véase la entrada (63) a continuación)
- CD25 (véase la entrada (48) anteriormente)
- CD32
 - Polipéptido
 - N.º de registro Genbank. ABK42161
 - N.º de versión Genbank ABK42161.1 GI:117616286
 - Fecha de actualización del registro de Genbank: 25 jul, 2007 03:00 PM

35

40

- LGR5/GPR49

- Nucleótido
 - N.º de registro Genbank. NM_003667
 - N.º de versión Genbank versión NM_003667.2 GI:24475886
 - Fecha de actualización del registro de Genbank: 22 jul, 2012 03:38 PM

45

- Polipéptido
 - N.º de registro Genbank. NP_003658
 - N.º de versión Genbank versión NP_003658.1 GI:4504379
 - Fecha de actualización del registro de Genbank: 22 jul, 2012 03:38 PM

50

- Prominina/CD133

- Nucleótido
 - N.º de registro Genbank. NM_006017
 - N.º de versión Genbank versión NM_006017.2 GI:224994187
 - Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 sep, 2012 01:47 PM

60

- Polipéptido

65

- N.º de registro Genbank. NP_006008
- N.º de versión Genbank versión NP_006008.1 GI:5174387
- Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 sep, 2012 01:47 PM

5 (58) ASG-5

Referencias cruzadas

10 (Smith L.M., et.al AACR 2010 Annual Meeting (resumen n.º 2590); Gudas J.M., et.al. AACR 2010 Annual Meeting (resumen n.º 4393)

ANTICUERPOS

15 Anticuerpo anti-AGS-5: M6.131 (Smith, L.M., et.al AACR 2010 Annual Meeting (resumen n.º 2590)

(59) *ENPP3 (Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 3)*

Nucleótido

20 n.º de registro GenBank AF005632
n.º de versión Genbank AF005632.2 GI: 4432589
Fecha de actualización del registro de Genbank: 10 mar, 2010 09:41 PM

Polipéptido

25 n.º de registro GenBank AAC51813
n.º de versión Genbank AAC51813.1 GI: 2465540
Fecha de actualización del registro de Genbank: 10 mar, 2010 09:41 PM

30 Referencias cruzadas

Jin-Hua P., et al Genomics 45 (2), 412-415 (1997)

Otra información

35 Símbolo oficial: ENPP3
Otros alias: RP5-988G15.3, B10, CD203c, NPP3, PD-IBETA, PDNP3
Otras designaciones: E-NPP 3; dJ1005H11.3 (fosfodiesterasa I/nucleótido pirofosfatasa 3); dJ914N13.3 (fosfodiesterasa I/nucleótido pirofosfatasa 3); miembro 3 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; gp130RB13-6; fosfodiesterasa I beta; fosfodiesterasa I/nucleótido pirofosfatasa 3; fosfodiesterasa-I beta

40

(60) *PRR4 (rico en prolina 4 (lagrimal))*

45 Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_007244
n.º de versión Genbank NM_007244.2 GI:154448885
Fecha de actualización del registro de Genbank: 28 Jun, 2012 12:39 AM

50

Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_009175
n.º de versión Genbank NP_009175.2 GI:154448886
Fecha de actualización del registro de Genbank: 28 Jun, 2012 12:39 AM

55

Referencias cruzadas

60 Dickinson D.P., et al Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36 (10), 2020-2031 (1995)

Otra información

Símbolo oficial: PRR4
Otros alias: LPRP, PROL4
Otras designaciones: proteína rica en prolina lagrimal; proteína rica en prolina asociada a carcinoma nasofaríngeo 4; polipéptido rico en prolina 4; proteína rica en prolina 4

65

(61) GCC - GUCY2C (guanilato ciclasa 2C (receptor de enterotoxina termoestable))

Nucleótido

5 n.º de registro GenBank NM_004963
n.º de versión Genbank NM_004963.3 GI:222080082
Fecha de actualización del registro de Genbank: 02 sep, 2012 01:50 PM

10 Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_004954
n.º de versión Genbank NP_004954.2 GI:222080083
Fecha de actualización del registro de Genbank: 02 sep, 2012 01:50 PM

15 Referencias cruzadas

De Sauvage F.J., et al J. Biol. Chem. 266 (27), 17912-17918 (1991); Singh S., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 179 (3), 1455-1463 (1991)

20 Otra información

Símbolo oficial: GUCY2C
Otros alias: DIAR6, GUC2C, MUCIL, STAR
25 Otras designaciones: GC-C; receptor de STA; guanilil ciclasa C; hSTAR; receptor de enterotoxina termoestable; guanilato ciclasa intestinal

(62) Liv-1 - SLC39A6 (familia de transportador de solutos 39 (transportador de cinc), miembro 6)

30 Nucleótido

n.º de registro GenBank U41060
n.º de versión Genbank U41060.2 GI: 12711792
Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 nov, 2009 04:35 PM

35 Polipéptido

n.º de registro GenBank AAA96258
n.º de versión Genbank AAA96258.2 GI: 12711793
40 Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 nov, 2009 04:35 PM

Referencias cruzadas

Taylor KM., et al Biochim Biophys Acta. 1 abr 2003;1611(1-2):16-30

45 Otra información

Símbolo oficial: SLC39A6
Otros alias: LIV-1
50 Otras designaciones: proteína LIV-1, regulada por estrógeno; ZIP-6; proteína LIV-1 regulada por estrógenos; familia de transportadores de solutos 39 (transportador de iones metálicos), miembro 6; familia de transportadores de solutos 39 miembro 6; transportador de cinc ZIP6; proteína 6 similar a zrt e lrt

(63) 5T4, Glucoproteína trofoblástica, TPBG - TPBG (glucoproteína del trofoblasto)

55 Nucleótido

n.º de registro GenBank AJ012159
n.º de versión Genbank AJ012159.1 GI: 3805946
60 Fecha de actualización del registro de Genbank: 01 feb, 2011 10:27 AM

Polipéptido

n.º de registro GenBank CAA09930
n.º de versión Genbank CAA09930.1 GI: 3805947
65 Fecha de actualización del registro de Genbank: 01 feb, 2011 10:27 AM

Referencias cruzadas

King K.W., et al Biochim. Biophys. Acta 1445 (3), 257-270 (1999)

5

Otra información

- Símbolo oficial: TPBG
- Otros alias: 5T4, 5T4AG, M6P1
- Otras designaciones: antígeno oncofetal 5T4; glicoproteína del trofoblasto oncofetal 5T4; glicoproteína del oncotrofoblasto 5T4
- Véase el documento WO2015/155345

10

(64) CD56 - NCMA1 (molécula de adhesión celular neuronal 1)

15

Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_000615
 n.º de versión Genbank NM_000615.6 GI:336285433
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 sep, 2012 02:32 PM

20

Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_000606
 n.º de versión Genbank NP_000606.3 GI:94420689
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 sep, 2012 02:32 PM

25

Referencias cruzadas

Dickson,G., et al, Cell 50 (7), 1119-1130 (1987)

30

Otra información

Símbolo oficial: NCAM1
 Otros alias: CD56, MSK39, NCAM
 Otras designaciones: antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 5.1H11; molécula de adhesión a células neurales, NCAM

35

ANTICUERPOS

Immunogen: HuN901 (Smith SV., et al Curr Opin Mol Ther. ago 2005;7(4):394-401) Por ejemplo, véase humanizado a partir de anticuerpo murino N901. Véanse las Figuras 1b y 1e de Roguska, M.A., et al. Proc Natl Acad Sci USA feb 1994;91:969-973.

40

3(65) CanAg (antígeno asociado a tumor CA242)

45

Referencias cruzadas

Haglund C., et al Br J Cancer 60:845-851, 1989;Baeckstrom D., et al J Biol Chem 266:21537-21547, 1991

50

ANTICUERPOS

huC242 (TolcherAW et al., J Clin Oncol. 15 ene 2003;21(2):211-22; Immunogen) Por ejemplo, véase el documento US20080138898A1 SEQ ID NO: 1 y 2

55

(66) FOLR1 (Receptor de folato 1)

Nucleótido

n.º de registro GenBank J05013
 n.º de versión Genbank J05013.1 GI: 182417
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:47 AM

60

Polipéptido

n.º de registro GenBank AAA35823

65

n.º de versión Genbank AAA35823.1 GI: 182418

Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:47 AM

Referencias cruzadas

- 5 Elwood P.C., et al J. Biol. Chem. 264 (25), 14893-14901 (1989)

Otra información

- 10 Símbolo oficial: FOLR1
Otros alias: FBP, FOLR
Otras designaciones: FR-alfa; FBP células KB; proteína de unión a folato de adultos; proteína de unión a folato; receptor de folato alfa; receptor de folato, adulto; antígeno asociado a tumor ovárico MOv18

15 **ANTICUERPOS**

M9346A - Whiteman KR., et al Cancer Res 15 abr, 2012; 72 (Suplemento 8): 4628 (Immunogen)

(67) GPNMB (glucoproteína (transmembrana) nmb)

20 Nucleótido

n.º de registro GenBank X76534

n.º de versión Genbank X76534.1 GI: 666042

- 25 Fecha de actualización del registro de Genbank: 02 feb, 2011 10:10 AM

Polipéptido

n.º de registro GenBank CAA54044

n.º de versión Genbank CAA54044.1 GI: 666043

Fecha de actualización del registro de Genbank: 02 feb, 2011 10:10 AM

Referencias cruzadas

- 35 Weterman M.A., et al Int. J. Cancer 60 (1), 73-81 (1995)

Otra información

- 40 Símbolo oficial: GPNMB
Otros alias: UNQ1725/PRO9925, HGFIN, NMB
Otras designaciones: glicoproteína NMB; glicoproteína proteína similar a nmb; osteoactivina; glucoproteína transmembrana HGFIN; glucoproteína transmembrana NMB

ANTICUERPOS

- 45 Celldex Therapeutics: CR011 (Tse KF., et al Clin Cancer Res. 15 feb 2006;12(4):1373-82) Por ejemplo, véase el documento EP1827492B1 SEQ ID NO: 22, 24, 26, 31, 33 y 35

(68) TIM-1 - HAVCR1 (receptor celular del virus de la hepatitis A 1)

50 Nucleótido

n.º de registro GenBank AF043724

n.º de versión Genbank AF043724.1 GI: 2827453

- 55 Fecha de actualización del registro de Genbank: 10 mar, 2010 06:24 PM

Polipéptido

n.º de registro GenBank AAC39862

n.º de versión Genbank AAC39862.1 GI: 2827454

Fecha de actualización del registro de Genbank: 10 mar, 2010 06:24 PM

Referencias cruzadas

- 65 Feigelstock D., et al J. Virol. 72 (8), 6621-6628 (1998)

Otra información

Símbolo oficial: HAVCR1

Otros alias: HAVCR, HAVCR-1, KIM-1, KIM1, TIM, TIM-1, TIM1, TIMD-1, TIMD1

5 Otras designaciones: dominio de inmunoglobina de células T y proteína de dominio de mucina 1; proteína 1 de membrana de células T; molécula de lesión renal 1

(69) *RG-1/Mindina dirigida a tumor de próstata - Mindina/RG-1*

10 Referencias cruzadas

Parry R., et al Cancer Res. 15 sep 2005;65(18):8397-405

(70) *B7-H4 - VTCN1 (dominio V-set que contiene el inhibidor de activación de células T 1*

15 Nucleótido

n.º de registro GenBank BX648021

n.º de versión Genbank BX648021.1 GI: 34367180

20 Fecha de actualización del registro de Genbank: 02 feb, 2011 08:40 AM

Referencias cruzadas

Sica GL., et al Immunity. jun 2003;18(6):849-61

25 Otra información

Símbolo oficial: VTCN1

Otros alias: RP11-229A19.4, B7-H4, B7H4, B7S1, B7X, B7 h.5, PRO1291, VCTN1

30 Otras designaciones: miembro de la familia B7, H4; miembro 1 de la superfamilia B7; molécula B7x coestimuladora de células T; molécula B7x coestimuladora de células T; inhibidor 1 de activación de células T que contiene el dominio V-set; proteína B7 - H4 coestimuladora inmunitaria

(71) *PTK7 (proteína tirosina quinasa 7 PTK7)*

35 Nucleótido

n.º de registro GenBank AF447176

n.º de versión Genbank AF447176.1 GI: 17432420

40 Fecha de actualización del registro de Genbank: 28 nov, 2008 01:51 PM

Polipéptido

n.º de registro GenBank AAL39062

n.º de versión Genbank AAL39062.1 GI: 17432421

45 Fecha de actualización del registro de Genbank: 28 nov, 2008 01:51 PM

Referencias cruzadas

50 Park S.K., et al J. Biochem. 119 (2), 235-239 (1996)

Otra información

Símbolo oficial: PTK7

Otros alias: CCK-4, CCK4

55 Otras designaciones: quinasa 4 de carcinoma de colon; tirosina proteína quinasa 7 inactiva; receptor de pseudo tirosina quinasa 7; tirosina proteína quinasa tipo 7

(72) *CD37 (molécula CD37)*

60 Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_001040031

n.º de versión Genbank NM_001040031.1 GI:91807109

65 Fecha de actualización del registro de Genbank: 29 jul, 2012 02:08 PM

Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_001035120
n.º de versión Genbank NP_001035120.1 GI:91807110
5 Fecha de actualización del registro de Genbank: 29 jul, 2012 02:08 PM

Referencias cruzadas

10 Schwartz-Albiez R., et al J. Immunol. 140 (3), 905-914 (1988)

Otra información

Símbolo oficial: CD37
Otros alias: GP52-40, TSPAN26
15 Otras designaciones: antígeno CD37; antígeno de diferenciación celular 37; antígeno leucocitario CD37; antígeno de superficie de leucocitos CD37; tetraspanina-26; tspan-26

ANTICUERPOS

20 Boehringer Ingelheim: mAb 37.1 (Heider KH., et al Blood. 13 oct 2011;118(15):4159-68)

Trubion: CD37-SMIP (G28-1 scFv-Ig) ((Zhao X., et al Blood. 2007; 110: 2569-2577) Por ejemplo, véase el documento US20110171208A1 SEQ ID NO: 253

25 Immunogen: K7153A (Deckert J., et al Cancer Res 15 abr, 2012; 72 (Suplemento 8): 4625)

(73) CD138-SDC1 (sindecán 1)

Nucleótido

30 n.º de registro GenBank AJ551176
n.º de versión Genbank AJ551176.1 GI: 29243141
Fecha de actualización del registro de Genbank: 01 feb, 2011 12:09 AM

Polipéptido

n.º de registro GenBank CAD80245
n.º de versión Genbank CAD80245.1 GI: 29243142
40 Fecha de actualización del registro de Genbank: 01 feb, 2011 12:09 AM

Referencias cruzadas

O'Connell FP., et al Am J Clin Pathol. feb 2004;121(2):254-63

Otra información

Símbolo oficial: SDC1
Otros alias: CD138, SDC, SYND1, sindecán
50 Otras designaciones: antígeno CD138; receptor del factor de crecimiento de fibroblastos de heparán sulfato de proteoglicano; sindecán proteoglicano 1; sindecán-1

ANTICUERPOS

55 Biotest: MAb quimerizado (nBT062) - (Jagannath S., et al Poster ASH n.º 3060, 2010; Solicitud de Patente de WIPO WO/2010/128087)
Por ejemplo, véase el documento US20090232810 SEQ ID NO: 1 y 2

60 Immunogen: B-B4 (Tassone P., et al Blood 104_3688-3696)
Por ejemplo, véase el documento US20090175863A1 SEQ ID NO: 1 y 2

(74) CD74 (molécula CD74, complejo mayor de histocompatibilidad, cadena invariante de clase II)

Nucleótido

65 n.º de registro GenBank NM_004355
n.º de versión Genbank NM_004355.1 GI:343403784

Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 sep, 2012 02:30 PM

Polipéptido

5 n.º de registro GenBank NP_004346
n.º de versión Genbank NP_004346.1 GI:10835071
Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 sep, 2012 02:30 PM

Referencias cruzadas

10 Kudo,J., et al Nucleic Acids Res. 13 (24), 8827-8841 (1985)

Otra información

15 Símbolo oficial: CD74
Otros alias: DHLAG, HLADG, II, Ia-GAMMA
Otras designaciones: antígeno CD74 (polipéptido invariante del complejo mayor de histocompatibilidad, asociado a antígeno de clase II); cadena gamma del antígeno de histocompatibilidad HLA de clase II; cadena invariante asociada a antígenos HLA-DR; HLA-DR-gamma; cadena invariante asociada a Ia; cadena gamma MHC HLA-DR;
20 cadena gamma de antígenos de clase II; p33

ANTICUERPOS

25 Immunomedics: hLL1 (Milatuzumab,) - Berkova Z., et al Expert Opin Investig Drugs. ene 2010;19(1):141-9) Por ejemplo, véase el documento US20040115193 SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 y 24

Genmab: HuMax-CD74 (véase el sitio web)

(75) Claudinas - CL (Claudinas)

30 Referencias cruzadas

35 Offner S., et al Cancer Immunol Immunother. mayo 2005; 54(5):431-45, Suzuki H., et al Ann N Y Acad Sci. jul 2012;1258:65-70)

En seres humanos, se han descrito 24 miembros de la familia - véase la referencia bibliográfica.

(76) EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico)

40 Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_005228
n.º de versión Genbank NM_005228.3 GI:41927737
Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 sep, 2012 01:47 PM

45 Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_005219
n.º de versión Genbank NP_005219.2 GI:29725609
50 Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 sep, 2012 01:47 PM

Referencias cruzadas

55 Dhomen NS., et al Crit Rev Oncog. 2012;17(1):31-50

Otra información

Símbolo oficial: EGFR
Otros alias: ERBB, ERBB1, HER1, PIG61, mENA
60 Otras designaciones: homólogo oncogénico vírico de leucemia eritroblástica aviar (v-erb-b); proteína 40 inhibidora del crecimiento celular; proteína 61 que induce la proliferación celular; protooncogén c-ErbB-1; receptor tirosina-proteína quinasa erbB-1

ANTICUERPOS

65 BMS: Cetuximab (Erbix) - Broadbridge VT., et al Expert Rev Anticancer Ther. mayo 2012;12(5):555-65.

Por ejemplo, véase el documento US6217866 - N.º de depósito ATTC 9764.

Amgen: Panitumumab (Vectibix) - Argiles G., et al Future Oncol. abr 2012;8(4):373-89 Por ejemplo, véase el documento US6235883 SEQ ID NO: 23-38.

5

Genmab: Zalutumumab - Rivera F., et al Expert Opin Biol Ther. mayo 2009;9(5):667-74.

YM Biosciences: Nimotuzumab - Ramakrishnan MS., et al MAbs. ene-feb 2009;1(1):41-8.

Por ejemplo, véase el documento US5891996 SEQ ID NO: 27-34.

10

(77) Her3 (ErbB3) - ERBB3 (homólogo 3 de oncogén vírico de leucemia eritoblástica v-erb-b2 (aviar))

Nucleótido

15

n.º de registro GenBank M34309

n.º de versión Genbank M34309.1 GI: 183990

Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:47 PM

Polipéptido

20

n.º de registro GenBank AAA35979

n.º de versión Genbank AAA35979.1 GI: 306841

Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:47 PM

25

Referencias cruzadas

Plowman, G.D., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 (13), 4905-4909 (1990)

Otra información

30

Símbolo oficial: ERBB3

Otros alias: ErbB-3, HER3, LCCS2, MDA-BF-1, c-erbB-3, c-erbB3, erbB3-S, p180-ErbB3, p45-sErbB3, p85-sErbB3

35

Otras designaciones: proteína de tipo protooncogén c-ErbB-3; receptor tirosina-proteína quinasa erbB-3; receptor de superficie celular de tipo tirosina quinasa HER3

ANTICUERPOS

40

Merimack Pharma: MM-121 (Schoeberl B., et al Cancer Res. 15 mar 2010;70(6):2485-2494)

Por ejemplo, véase el documento US2011028129 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

(78) RON - MST1R (receptor 1 estimulante de macrófagos (tirosina quinasa relacionada con c-met))

Nucleótido

45

n.º de registro GenBank X70040

n.º de versión Genbank X70040.1 GI: 36109

Fecha de actualización del registro de Genbank: 02 feb, 2011 10:17 PM

50

Polipéptido

n.º de registro GenBank CCA49634

n.º de versión Genbank CCA49634.1 GI: 36110

Fecha de actualización del registro de Genbank: 02 feb, 2011 10:17 PM

55

Referencias cruzadas

Ronsin C., et al Oncogene 8 (5), 1195-1202 (1993)

60

Otra información

Símbolo oficial: MST1R

Otros alias: CD136, CDw136, PTK8, RON

65

Otras designaciones: receptor de MSP; MST1R variante RON30; MST1R variante RON62; proteína tirosina quinasa 8 PTK8; RON variante E2E3; tirosina quinasa relacionada con c-met; receptor de proteína estimulante de macrófagos; p185-Ron; RON soluble variante 1; RON soluble variante 2; RON soluble variante 3; RON

variante soluble 4

(79) EPHA2 (receptor A2 de EPH)

5 Nucleótido

n.º de registro GenBank BC037166
n.º de versión Genbank BC037166.2 GI: 33879863
Fecha de actualización del registro de Genbank: 06 mar, 2012 01:59 PM

10

Polipéptido

n.º de registro GenBank AAH37166
n.º de versión Genbank AAH37166.1 GI: 22713539
Fecha de actualización del registro de Genbank: 06 mar, 2012 01:59 PM

15

Referencias cruzadas

Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26), 16899-16903 (2002)

20

Otra información

Símbolo oficial: EPHA2
Otros alias: ARCC2, CTPA, CTPP1, ECK
Otras designaciones: receptor 2 de efrina tipo A; proteína tirosina quinasa del receptor de células epiteliales; EPHA2 soluble variante 1; receptor tirosina-proteína quinasa ECK

25

ANTICUERPOS

Medimmune: 1C1 (Lee JW., et al Clin Cancer Res. 1 mayo 2010;16(9):2562-2570)
Por ejemplo, véase el documento US20090304721A1 Figuras 7 y 8.

30

(80) CD20 - MS4A1 (4 dominios que abarcan la membrana, subfamilia A, miembro 1)

35 Nucleótido

n.º de registro GenBank M27394
n.º de versión Genbank M27394.1 GI: 179307
Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 nov, 2009 11:16 AM

40

Polipéptido

n.º de registro GenBank AAA35581
n.º de versión Genbank AAA35581.1 GI: 179308
Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 nov, 2009 11:16 AM

45

Referencias cruzadas

Tedder T.F., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 (1), 208-212 (1988)

50

Otra información

Símbolo oficial: MS4A1
Otros alias: B1, Bp35, CD20, CVID5, LEU-16, MS4A2, S7
Otras designaciones: antígeno de linfocitos B CD20; antígeno B1 de superficie celular de linfocitos B; antígeno CD20; receptor CD20; antígeno de superficie de leucocitos Leu-16

55

ANTICUERPOS

Genentech/Roche: Rituximab - Abdulla NE., et al BioDrugs. 1 abr 2012;26(2):71-82.
Por ejemplo, véase el documento US5736137, N.º de depósito ATCC HB-69119.

60

GSK/Genmab: Ofatumumab - Nightingale G., et al Ann Pharmacother. oct 2011;45(10):1248-55.
Por ejemplo, véase el documento US20090169550A1 SEQ ID NO: 2, 4 y 5.

65

Immunomedics: Veltuzumab - Goldenberg DM., et al Leuk Lymphoma. mayo 2010;51(5):747-55.

Por ejemplo, véase el documento US7919273B2 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

(81) Tenascina C - TNC (Tenascina C)

5 Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_002160
 n.º de versión Genbank NM_002160.3 GI:340745336
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 sep, 2012 02:33 PM

10

Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_002151
 n.º de versión Genbank NP_002151.2 GI:153946395
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 sep, 2012 02:33 PM

15

Referencias cruzadas

Nies D.E., et al J. Biol. Chem. 266 (5), 2818-2823 (1991); Siri A., et al Nucleic Acids Res. 19 (3), 525-531 (1991)

20

Otra información

Símbolo oficial: TNC
 Otros alias: 150-225, GMEM, GP, HXB, JI, TN, TN-C
 Otras designaciones: GP 150-225; citotactina; antígeno de matriz extracelular asociado a glioma; hexabraquiona (tenascina); antígeno miotendinoso; neuronectina; tenascina; isoforma de tenascina-C 14/AD1/16

25

ANTICUERPOS

Philogen: G11 (von Lukowicz T., et al J Nucl Med. abr 2007;48(4):582-7) y F16 (Pedretti M., et al Lung Cancer. abr 2009;64(1):28-33)
 Por ejemplo, véase el documento US7968685 SEQ ID NO: 29, 35, 45 y 47.

30

(82) FAP (proteína de activación de fibroblastos, alfa)

35

Nucleótido

n.º de registro GenBank U09278
 n.º de versión Genbank U09278.1 GI: 1888315
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 09:22 AM

40

Polipéptido

n.º de registro GenBank AAB49652
 n.º de versión Genbank AAB49652.1 GI: 1888316
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 09:22 AM

45

Referencias cruzadas

Scanlan, M.J., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91 (12), 5657-5661 (1994)

50

Otra información

Símbolo oficial: FAP
 Otros alias: DPPIV, FAPA
 Otras designaciones: gelatinasa unida a membrana de melanoma de 170 kDa; serina proteasa de membrana integral; seprasa

55

(83) DKK-1 (homólogo de Dickkopf 1 (Xenopus laevis))

60

Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_012242
 n.º de versión Genbank NM_012242.2 GI:61676924
 Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 sep, 2012 01:48 PM

65

Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_036374
 n.º de versión Genbank NP_036374.1 GI:7110719
 5 Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 sep, 2012 01:48 PM

Referencias cruzadas

10 Fedi P. et al J. Biol. Chem. 274 (27), 19465-19472 (1999)

Otra información

Símbolo oficial: DKK1
 Otros alias: UNQ492/PRO1008, DKK-1, SK
 15 Otras designaciones: proteína 1 relacionada con dickkopf; similar a dickkopf 1; proteína 1 similar a dickkopf; proteína 1 relacionada con dickkopf; hDkk-1

ANTICUERPOS

20 Novartis: BHQ880 (Fulciniti M., et al Blood. 9 jul 2009;114(2):371-379)
 Por ejemplo, véase el documento US20120052070A1 SEQ ID NO: 100 y 108.

(84) CD52 (molécula CD52)

25 Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_001803
 n.º de versión Genbank NM_001803.2 GI:68342029
 30 Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 sep, 2012 01:48 PM

Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_001794
 n.º de versión Genbank NP_001794.2 GI:68342030
 35 Fecha de actualización del registro de Genbank: 30 sep, 2012 01:48 PM

Referencias cruzadas

40 Xia M.Q., et al Eur. J. Immunol. 21 (7), 1677-1684 (1991)

Otra información

Símbolo oficial: CD52
 Otros alias: CDW52
 45 Otras designaciones: antígeno CAMPATH-1; antígeno CD52 (antígeno CAMPATH-1); antígeno CDW52 (antígeno CAMPATH-1); antígeno de patología de cambridge 1; proteína secretora epididimaria E5; he5; proteína 5 específica del epidídimo humano

ANTICUERPOS

50 Alemtuzumab (Campath) - Skoetz N., et al Cochrane Database Syst Rev. 15 feb 2012;2:CD008078.
 Por ejemplo, véanse N.º de registro de Drugbank DB00087 (BIOD00109, BTD00109)

(85) CS1 - SLAMF7 (miembro de la familia SLAM 7)

55 Nucleótido

n.º de registro GenBank NM_021181
 n.º de versión Genbank NM_021181.3 GI:1993571
 60 Fecha de actualización del registro de Genbank: 29 Jun, 2012 11:24 AM

Polipéptido

n.º de registro GenBank NP_067004
 n.º de versión Genbank NP_067004.3 GI:19923572
 65 Fecha de actualización del registro de Genbank: 29 Jun, 2012 11:24 AM

Referencias cruzadas

Boles K.S., et al Immunogenetics 52 (3-4), 302-307 (2001)

5

Otra información

Símbolo oficial: SLAMF7

Otros alias: UNQ576/PRO1138, 19A, CD319, CRACC, CS1

10 Otras designaciones: proteína 19A24; CD2 subconjunto 1; células citotóxicas activadoras del receptor tipo CD2; células citotóxicas que activan el receptor tipo CD2; proteína de membrana FOAP-12; proteína similar a LY9 (antígeno linfocítico 9) nuevo; proteína 19A

ANTICUERPOS

15

BMS: elotuzumab/HuLuc63 (Benson DM., et al J Clin Oncol. 1 jun 2012;30(16):2013-2015) Por ejemplo, véase el documento US20110206701 SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16.

(86) Endoglina - ENG (Endoglina)

20

Nucleótido

n.º de registro GenBank AF035753

n.º de versión Genbank AF035753.1 GI: 3452260

25 Fecha de actualización del registro de Genbank: 10 mar, 2010 06:36 PM

Polipéptido

n.º de registro GenBank AAC32802

30 n.º de versión Genbank AAC32802.1 GI: 3452261

Fecha de actualización del registro de Genbank: 10 mar, 2010 06:36 PM

Referencias cruzadas

35 Rius C., et al Blood 92 (12), 4677-4690 (1998)

Símbolo oficial: ENG

Otra información

40 Otros alias: RP11-228B15.2, CD105, END, HHT1, ORW, ORW1

Otras designaciones: antígeno CD105

(87) Anexina A1 - ANXA1 (anexina A 1)

45 Nucleótido

n.º de registro GenBank X05908

n.º de versión Genbank X05908.1 GI: 34387

50 Fecha de actualización del registro de Genbank: 02 feb, 2011 10:02 AM

Polipéptido

n.º de registro GenBank CCA29338

n.º de versión Genbank CCA29338.1 GI: 34388

55 Fecha de actualización del registro de Genbank: 02 feb, 2011 10:02 AM

Referencias cruzadas

60 Wallner B.P., et al Nature 320 (6057), 77-81 (1986)

Otra información

Símbolo oficial: ANXA1

Otros alias: RP11-71A24.1, ANX1, LPC1

65 Otras designaciones: anexina I (lipocortina I); anexina-1; calpactina II; calpactina-2; cromobindina-9; lipocortina I; p35; proteína inhibidora de fosfolipasa A2

(88) V-CAM (CD106) - VCAM1 (molécula de adhesión celular vascular 1)

Nucleótido

5 n.º de registro GenBank M60335
n.º de versión Genbank M60335.1 GI: 340193
Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:56 AM

10 Polipéptido

n.º de registro GenBank AAA61269
n.º de versión Genbank AAA61269.1 GI: 340194
Fecha de actualización del registro de Genbank: 23 Jun, 2010 08:56 AM

15 Referencias cruzadas

Hession C., et al J. Biol. Chem. 266 (11), 6682-6685 (1991)

20 Otra información

Símbolo oficial VCAM1
Otros alias: CD106, INCAM-100
Otras designaciones: antígeno CD106; proteína de adhesión celular vascular 1

25 Secuencias de anticuerpos

Anti-Integrina $\alpha v \beta 6$

30 RHAB6.2

QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGFAFTDSYMHWRQAPGQGLEWMGWIDPENGDT
EYAPKFQGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTRGTPTAVPNLRGDLQVLAQKVA
GPYPFDYWGQGTLVTVSS

35 RHCB6.2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFIDSYMHWRQAPGQRLEWMGWIDPENGDT
EYAPKFQGRVTITTDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGTPTAVPNLRGDLQVLAQKV
AGPYPFDYWGQGTLVTVSS

RHF

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNFIDSYMHWRQAPGQRLEWMGWIDPENGD
TEYAPKFQGRVFTTDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCNEGTPPTGPYYFDYWGQGLV
TVSS

RHFB6

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNFIDSYMHWRQAPGQRLEWMGWIDPENGD
TEYAPKFQGRVFTTDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCNEGTPAVPNLRGDLQVLAQK
VAGPYYFDYWGQGTLVTVSS

40

RHAY100bP

ES 2 791 316 T3

QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGFAFTDSYMHWRQAPGQGLEWIMGWIDPENGDT
EYAPKFQGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTRGTPTGPYPFDYWGQGLTVV
SS

RKF

5 ENVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIK

RKFL36L50

10 ENVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWLQQKPGQAPRLLIYLTSNLASGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIK

RKC

15 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPDRF
SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIK

15 *Anti-CD33*

CD33 Hum195 VH

20 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDYNMHWRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGT
GYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGRPAMDYWGQGLTVTVSS

CD33 Hum195 VK

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASESDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPDFATYYCQQSKEVPWTFGGGKVEIK

25 *Anti-CD19*

CD19 B4 VH rechapado

30 QVQLVQPGAEEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTSNWMHWVKQRPQGLEWIGEIDPSDSYT
NYNQNFKGKAKLTVDKSTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCARGSNPYYYAMDYWGQGTSTV
TVSS

CD19 B4 VK rechapado

EIVLTQSPAIMSASPGERVMTCSASSGVNYMHWYQQKPGTSPRRWIYDTSKLAGVPA
RFSGSGSGTSYSLTISSEMEPEDAATYYCHQRGSYTFGGGKLEIK

35 *Anti-Her2*

Cadena VH de Herceptina

ES 2 791 316 T3

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTR
YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLT
VSS

Cadena VL de Herceptina

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

Anti-CD25

VK Simulect (también conocido como Basiliximab)

QIVSTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSRSYMQWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLAGVPA
RFSGSGSGTSYSLTISMEAEADAATYYCHQRSSYTFGGGKLEIK

VH Simulect

QLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYSFTRYWMHWIKQRPQGGLWIGAIYPGNSDTSY
NQKFEGKAKLTAVTSASTAYMELSSLTHEDSAVYYCSRDYGYDFDFWGGTLLTVSS

Anti-PSMA

VH '1 desinmunizado

EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTY
NQKFEDKATLTVDKSTDAYMELSSLRSEDVAVYYCAAGWNFDYWGQGLTLLTVSS

VK '1 desinmunizado

DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTCKASQDVGTAVDWYQQKPGPSPKLLIYWASTRHTGIPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFADYYCQQYNSYPLTFGPGTKVDIK

VH1 '5 desinmunizado

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRSQSNN
FATHYAESVKGRVTISRDDSKSIVYLLQMNNLRAEDTGVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

VH2 '5 desinmunizado

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCVASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVTISRDDSKSIVYLLQMNNLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

VH3 '5 desinmunizado

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCVASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVTISRDDSKSIVYLLQMNNLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

ES 2 791 316 T3

VH4 '5 desinmunizado

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSVASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRFTISRDDSKSIVYLQMNNLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

5 VK1 '5 desinmunizado

NIVMTQFPSSMSASVGDRVTITCKASENVGTYVSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVP
DRFTGSGSATDFTLTISSLQTEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEMK

10 VK2 '5 desinmunizado

NIVMTQFPSSMSASVGDRVTITCKASENVGTYVSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEIK

VK3 '5 desinmunizado

15 NIQMTQFPSAMSASVGDRVTITCKASENVGTYVSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEIK

VK4 '5 desinmunizado

20 NIQMTQFPSAMSASVGDRVTITCKASENVGTYVSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDEADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEIK

VK DI '5 desinmunizado

25 NIVMTQFPKMSASAGERMTLTCKASENVGTYVSWYQQKPTQSPKMLIYGASNRFTGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDLVDYYCGQSYTFPYTFGGGTKLEMK

VH DI '5 desinmunizado

30 EVKLEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVIISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHA '5 humanizado

35 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVGEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHB '5 humanizado

35 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVIISRDDSKNTVYLMNSLRTEATVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHC '5 humanizado

ES 2 791 316 T3

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVIISRDDSKNTVYLMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHD '5 humanizado

5 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVGEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVIISRDDSKNTVYLMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHE '5 humanizado

10 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRFTISRDDSKNTVYLMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHF '5 humanizado

15 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVIISRDDSKNTAYLQMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHG '5 humanizado

20 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVIISRDDSKNTAYLQMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RKA '5 humanizado

20 DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPS
RFSGSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKB '5 humanizado

25 DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPS
RFSGSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKC '5 humanizado

30 DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPS
RFSGSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKD '5 humanizado

35 DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPS
RFSGSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKE '5 humanizado

NIVMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPD
RFTGSGSATDFILTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKF '5 humanizado

NIVMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPS
RFSGSGSATDFILTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

5

RKG '5 humanizado

NIVMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPD
RFTGSGSATDFILTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

10

El anticuerpo parental también puede ser una proteína de fusión que comprende una secuencia de péptido de unión a albúmina (ABP) (Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; documento WO 01/45746). Los anticuerpos de la invención incluyen proteínas de fusión con secuencias ABP enseñadas por: (i) Dennis et al (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 en las Tablas III y IV, página 35038; (ii) documento US 2004/0001827 en [0076]; y (iii) documento WO 01/45746 en las páginas 12-13 y todas las cuales se incorporan en el presente documento como referencia.

15

En una realización, el anticuerpo se ha elevado a una diana específica del antígeno α relacionado con el tumor $\alpha_v\beta_6$.

20

El agente de unión celular puede estar marcado, por ejemplo, para ayudar a la detección o purificación del agente antes de la incorporación como conjugado, o como parte del conjugado. El marcador puede ser un marcador de biotina. En otra realización, el agente de unión celular puede marcarse con un radioisótopo.

25

Conexión de la Unidad enlazadora a la Unidad de ligando

La Unidad de ligando está conectada a la Unidad enlazadora a través de un enlace disulfuro.

30

En una realización, la conexión entre la unidad de ligando y el enlazador de fármaco se forma entre un grupo tiol de un resto de cisteína de la unidad de ligando y un grupo maleimida de la unidad de enlazador de fármaco.

35

Los restos de cisteína de la unidad de ligando pueden estar disponibles para su reacción con el grupo funcional de la unidad de enlazador para formar una conexión. En otras realizaciones, por ejemplo, cuando la unidad de ligando es un anticuerpo, los grupos tiol del anticuerpo pueden participar en enlaces disulfuro intercatenarios. Estos enlaces intercatenarios pueden convertirse en grupos tiol libres, por ejemplo, mediante el tratamiento del anticuerpo con DTT antes de la reacción con el grupo funcional de la unidad del enlazador.

40

En algunas realizaciones, el resto de cisteína se introduce en la cadena pesada o ligera de un anticuerpo. Las posiciones para la inserción de cisteína por sustitución en cadenas pesadas o ligeras de anticuerpos incluyen aquellas descritas en la Solicitud Publicada de EE.UU. n.º 2007-0092940 y la publicación de la Patente Internacional WO 2008/070593.

Métodos de tratamiento

45

Los compuestos o conjugados de la presente invención pueden usarse en un método de terapia. También se proporciona un método de tratamiento, que comprende administrar a un sujeto que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de fórmula I. La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para mostrar beneficio a un paciente. Dicho beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la velocidad y el ciclo de tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, está dentro de la responsabilidad de los facultativos generales y otros médicos.

50

Un conjugado puede administrarse solo o en combinación con otros tratamientos, de forma simultánea o secuencial dependiendo de la afección a tratar. Los ejemplos de tratamientos y terapias incluyen, pero no se limitan a, quimioterapia (la administración de principios activos, incluyendo, por ejemplo, fármacos; cirugía; y radioterapia.

55

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención y para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del principio activo, es decir, un conjugado de fórmula I, un excipiente,

vehículo, tampón, estabilizante farmacéuticamente aceptables u otros materiales bien conocidos por aquellos expertos en la materia. Dichos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la efectividad del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, o por inyección, por ejemplo, cutánea, subcutánea o intravenosa.

5 Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un vehículo líquido tales como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Una cápsula puede comprender un vehículo sólido tal como gelatina.

10 Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o la inyección en el sitio de afección, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que esté libre de pirógeno y que tenga pH, isotonicidad y estabilidad adecuadas. Los expertos en la materia serán bien capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario.

15 Los conjugados pueden usarse para tratar una enfermedad proliferativa y una enfermedad autoinmunitaria. La frase "enfermedad proliferativa" se refiere a una proliferación celular no deseada o incontrolada de células excesivas o anormales que no es deseada, tales como, crecimiento neoplásico o hiperplásico, ya sea *in vitro* o *in vivo*.

20 Los ejemplos de afecciones proliferativas incluyen, pero no se limitan a, proliferación celular benigna, premaligna y maligna, incluyendo, pero no limitado a, neoplasias y tumores (por ejemplo, histiocitoma, glioma, astrocitoma, osteoma), cánceres (por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células microcíticas, cáncer gastrointestinal, cáncer de intestino, cáncer de colon, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer cerebral, sarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi, melanoma), leucemias, psoriasis, enfermedades óseas, trastornos fibroproliferativos (por ejemplo, de tejidos conectivos) y aterosclerosis. Otros cánceres de interés incluyen, pero no se limitan a, hematológicos; neoplasias tales como leucemias y linfomas, tales como linfoma no Hodgkiniano y subtipos tales como LDCGB, zona marginal, zona del manto, y folicular, linfoma de Hodgkin, LMA y otros cánceres de origen en células B o T.

25 Algunos ejemplos de enfermedad autoinmunitaria incluyen las siguientes: artritis reumatoide, enfermedades desmielinizantes autoinmunitarias (por ejemplo, esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica), artritis psoriásica, oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, enfermedad de Graves, glomerulonefritis, trastorno hepatoológico autoinmunitario, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn), anafilaxia, reacción alérgica, síndrome de Sjögren, diabetes mellitus de tipo I, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, fibromialgia, polimiositis, dermatomiositis, insuficiencia endocrina múltiple, Síndrome de Schmidt, uveítis autoinmunitaria, enfermedad de Addison, adrenalitis, tiroiditis, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, anemia perniciosa, atrofia gástrica, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, ateroescclerosis, lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoparatiroidismo, Síndrome de Dressler, trombocitopenia autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, pénfigo vulgar, pénfigo, dermatitis herpetiforme, alopecia areata, penfigoide, esclerodermia, esclerosis sistémica progresiva, síndrome CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmunitaria masculina y femenina, espondilitis anquilosante, colitis ulcerosa, enfermedad del tejido conectivo mixto, poliarteritis nodosa, vasculitis necrosante sistémica, dermatitis atópica, rinitis atópica, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Chagas, sarcoidosis, fiebre reumática, asma, aborto recurrente, síndrome antifosfolípido, pulmón del granjero, eritema multiforme, síndrome poscardiotomía, síndrome de Cushing, hepatitis crónica activa autoinmunitaria, neumopatía de los avicultores, necrosis epidérmica tóxica, síndrome de Alport, alveolitis, alveolitis alérgica, alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, eritema nudoso, pioderma gangrenoso, reacción a la transfusión, arteritis de Takayasu, polimialgia reumática, arteritis temporal, esquistosomiasis, arteritis de células gigantes, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, eccema, granulomatosis linfomatoide, enfermedad de Behçet, síndrome de Caplan, enfermedad de Kawasaki, dengue, encefalomiелitis, endocarditis, fibrosis endomiocardial, endoftalmítis, eritema elevado y diutino, psoriasis, eritroblastosis fetal, fascitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis, ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, ciclitis de Fuch, nefropatía de IgA, púrpura de Henoch-Schonlein, enfermedad del injerto contra el hospedador, rechazo de trasplantes, cardiomiopatía, síndrome de Eaton-Lambert, policondritis recidivante, crioglobulinemia, macroglobulinemia de Waldenstrom, síndrome de Evan e insuficiencia gonadal autoinmunitaria.

30 En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria es un trastorno de los linfocitos B (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide y diabetes tipo I), linfocitos Th1 (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjögren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, tuberculosis, o enfermedad de injerto frente a hospedador) o linfocitos Th2 (por ejemplo, dermatitis atópica, lupus eritematoso sistémico, asma atópica, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica o enfermedad crónica de injerto frente a

hospedador). Generalmente, los trastornos que implican células dendríticas implican trastornos de linfocitos Th1 o linfocitos Th2. En algunas realizaciones, el trastorno autoinmunitario es un trastorno inmunológico mediado por células T.

5 En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 4 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 3 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 mg/kg por dosis.

15 *Carga de fármaco*

La carga de fármaco (p) es el número promedio de fármacos PBD por agente de unión celular, por ejemplo, anticuerpo. Cuando los compuestos de la invención están unidos a cisteínas, la carga de fármaco puede variar de 1 a 8 fármacos (D) por agente de unión celular, es decir, donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 restos de fármaco están unidos covalentemente al agente de unión celular. Las composiciones de los conjugados incluyen colecciones de agentes de unión celular, por ejemplo, anticuerpos, conjugado con un intervalo de fármacos, de 1 a 8. Cuando los compuestos de la invención están unidos a lisinas, la carga de fármaco puede variar de 1 a 80 fármacos (D) por agente de unión celular, aunque puede preferirse un límite superior de 40, 20, 10 u 8. Las composiciones de los conjugados incluyen colecciones de agentes de unión celular, por ejemplo, anticuerpos, conjugado con un intervalo de fármacos, de 1 al 80, de 1 al 40, de 1 al 20, de 1 al 10 o de 1 al 8.

El número promedio de fármacos por anticuerpo en preparaciones de ADC derivado de reacciones de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales tales como UV, HPLC en fase inversa, HIC, espectroscopia de masas, ensayo ELISA y electroforesis. También puede determinarse la distribución cuantitativa de los ADC en función de p. Mediante ELISA, puede determinarse el valor promedio de p en una preparación particular de ADC (Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). Sin embargo, la distribución de los valores de p (fármaco) no es discernible por la unión de anticuerpo-antígeno y la limitación de detección de ELISA. También, el ensayo ELISA para la detección de conjugados anticuerpo-fármaco no determina dónde están unidos los restos del fármaco al anticuerpo, tales como los fragmentos de la cadena pesada o de la cadena ligera, o los restos de aminoácidos particulares. En algunos casos, la separación, la purificación y la caracterización de los ADC homogéneos donde p es un determinado valor derivado de ADC con otras cargas de fármaco puede lograrse por medios tales como HPLC en fase inversa o electroforesis. Dichas técnicas también son aplicables a otros tipos de conjugados.

Para algunos conjugados de anticuerpo-fármaco, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede tener solo uno o varios grupos tiol de cisteína, o puede tener solo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales puede unirse un enlazador. Una carga de fármaco más alta, por ejemplo, $p > 5$, puede provocar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de la permeabilidad celular de ciertos conjugados de anticuerpo-fármaco.

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 de lisina que no reaccionan con el fármaco enlazador (A o B). Solo los grupos lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador que reacciona con aminas. También, solo los grupos tiol de cisteína más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador reactivo con tiol. Generalmente, los anticuerpos no contienen muchos, si los hubiera, grupos tiol de cisteína libres y reactivos que puedan enlazarse al resto de fármaco. La mayoría de restos tiol de cisteína en los anticuerpos de los compuestos existen como puentes disulfuro y deben reducirse con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o TCEP, en condiciones reductoras parciales o totales. La carga (relación fármaco/anticuerpo) de un ADC puede controlarse de varias maneras diferentes, incluyendo: (i) limitar el exceso molar de enlazador de fármaco (A o B) 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 de tiol de cisteína.

Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para su conjugación con reactivos enlazadores mediante tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (ditiotreitól). Por tanto, cada puente de cisteína formará, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Los grupos nucleófilos adicionales pueden introducirse en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolo (reactivo de Traut), dando como resultado la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden introducirse en el anticuerpo (o fragmento del mismo) diseñando por ingeniería uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más restos de aminoácido de cisteína no nativos). El documento US 7521541 enseña anticuerpos de ingeniería mediante la

introducción de aminoácidos reactivos de cisteína.

Los aminoácidos de cisteína pueden diseñarse en sitios reactivos en un anticuerpo y que no forman enlaces disulfuro intracatenarios o intermoleculares (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al (2009) Blood 114(13):2721-2729; documento US 7521541; documento US 7723485; documento WO2009/052249). Los tioles de cisteína modificados por ingeniería pueden reaccionar con reactivos enlazadores o los reactivos enlazadores de fármacos de la presente invención que tienen reactivos con tiol, grupos electrofílicos tales como maleimida o alfa-haloamidas para formar ADC con anticuerpos modificados con cisteína y los restos del fármaco PBD. La ubicación del resto del fármaco puede de esta manera diseñarse, controlarse y conocerse. La carga del fármaco puede controlarse ya que los grupos tiol de cisteína modificados por ingeniería reaccionan normalmente con reactivos enlazadores reactivos con tiol o reactivos enlazadores de fármacos con alto rendimiento. Diseñar un anticuerpo IgG para introducir un aminoácido cisteína mediante sustitución en un solo sitio en la cadena pesada o ligera proporciona dos nuevas cisteínas en el anticuerpo simétrico. Puede lograrse una carga de fármaco cercana a 2 con una homogeneidad cercana del producto de conjugación ADC.

Cuando más de un grupo nucleófilo o electrófilo del anticuerpo reacciona con un intermediario enlazador de fármacos o un reactivo enlazador seguido de un reactivo de resto de fármaco, después el producto resultante es una mezcla de compuestos ADC con una distribución de uno o más restos de fármaco unidos a un anticuerpo, por ejemplo, 1, 2, 3, etc. Los métodos de cromatografía líquida tales como fase inversa polimérica (PLRP) y de interacción hidrófoba (HIC) pueden separar los compuestos en la mezcla por el valor de carga del fármaco. Las preparaciones de ADC con un solo valor de carga de fármaco (p) pueden aislarse, sin embargo, estos ADC de valor de carga único pueden seguir siendo mezclas heterogéneas porque los restos de fármaco pueden estar unidos, a través del enlazador, en diferentes sitios en el anticuerpo.

Por lo tanto, las composiciones conjugadas anticuerpo-fármaco de la invención incluyen mezclas de compuestos conjugados anticuerpo-fármaco en donde el anticuerpo tiene uno o más restos de fármaco PBD y en donde los restos de fármaco pueden unirse al anticuerpo en diversos restos de aminoácidos.

En una realización, el número promedio de grupos de dímero de pirrolobenzodiazepina por agente de unión celular está en el intervalo de 1 a 20. En algunas realizaciones, el intervalo se selecciona de 1 a 8, 2 a 8, 2 a 6, 2 a 4 y 4 a 8.

En algunas realizaciones, hay un grupo dímero de pirrolobenzodiazepina por agente de unión celular.

35 Rutas de síntesis generales

La síntesis de los compuestos de PBD se analiza extensamente en las siguientes referencias:

- 40 a) documento WO 00/12508 (páginas 14 a 30);
- b) documento WO 2005/023814 (páginas 3 a 10);
- c) documento WO 2004/043963 (páginas 28 a 29); y
- d) documento WO 2005/085251 (páginas 30 a 39).

45 *Ruta de síntesis*

Los compuestos enlazadores de fármacos de la presente invención (A y B) pueden sintetizarse de acuerdo con los ejemplos.

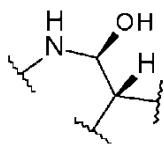
50 Síntesis de conjugados de fármacos

Los conjugados pueden prepararse como se describió previamente. Los anticuerpos pueden conjugarse con los compuestos de enlazador de fármaco (A o B) como se describe en Doronina et al., Nature Biotechnology, 2003, 21, 778-784). En resumen, los anticuerpos (4-5 mg/ml) en PBS que contiene borato sódico 50 mM a pH 7,4 se reducen con clorhidrato de tris(carboxietil)fosfina (TCEP) a 37 °C. El progreso de la reacción, que reduce los disulfuros intercatenarios, se monitoriza por reacción con 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) y se deja avanzar hasta que se consigue el nivel deseado de tioles/mAb. El anticuerpo reducido se enfría después a 0 °C y se alquila con 1,5 equivalentes de enlazador de fármaco maleimida por tiol de anticuerpo. Después de 1 hora, la reacción se interrumpe mediante la adición de 5 equivalentes de N-acetil cisteína. El enlazador de fármaco inactivado se retira por filtración en gel sobre una columna PD-10. El ADC después se filtra de forma estéril a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm. La concentración de proteína puede determinarse por análisis espectral a 280 nm y 329 nm, respectivamente, con corrección por la contribución de la absorbancia del fármaco a 280 nm. La cromatografía de exclusión por tamaño puede usarse para determinar la extensión de la agregación de anticuerpos, y puede usarse RP-HPLC para determinar los niveles del enlazador de fármaco inactivado con NAC restantes.

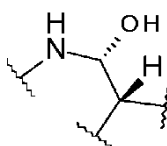
65 Preferencias adicionales

Las siguientes preferencias pueden aplicarse a todos los aspectos de la invención tal como se han descrito anteriormente o pueden referirse a un único aspecto. Las preferencias pueden combinarse juntas en cualquier combinación.

- 5 En algunas realizaciones, el sustituyente C11 puede estar en la siguiente disposición estereoquímica con respecto a los grupos vecinos:



- 10 En otras realizaciones, el sustituyente C11 puede estar en la siguiente disposición estereoquímica con respecto a los grupos vecinos:



5

- 15 En una realización de la presente invención, el compuesto de fórmula III es A.
En una realización de la presente invención, el compuesto de fórmula III es B.
En una realización de la presente invención, la unidad de enlazador de fármaco de fórmula III es D^L-A.

- 20 En una realización de la presente invención, la unidad de enlazador de fármaco de fórmula III es D^L-B.

Ejemplos

- 25 El progreso de la reacción se monitorizó por cromatografía en capa fina (TLC) usando gel de sílice Merck Kieselgel 60 F254, con indicador fluorescente en placas de aluminio. La visualización de TLC se logró con luz UV o vapor de yodo, a menos que se indique otra cosa. La cromatografía ultrarrápida se llevó a cabo usando gel de sílice Merck Kieselgel 60 F254. Los disolventes de extracción y cromatografía se compraron y usaron sin purificación adicional de VWR, R.U. Todos los productos químicos se compraron de Aldrich.

- 30 Los valores de desplazamiento químico de RMN de protón se midieron en la escala delta a 400 MHz usando un Bruker AV400. Se han usado las siguientes abreviaturas: s, singlete; d, doblete; t, triplete; q, cuadruplete; quint., quintuplete; m, multiplete; a, ancho. Las constantes de acoplamiento se indican en Hz. La cromatografía en columna se realizó en un sistema automatizado Isolera (Biotage) usando cartuchos SNAP de fase normal.

- 35 Las condiciones de CL/EM fueron las siguientes:

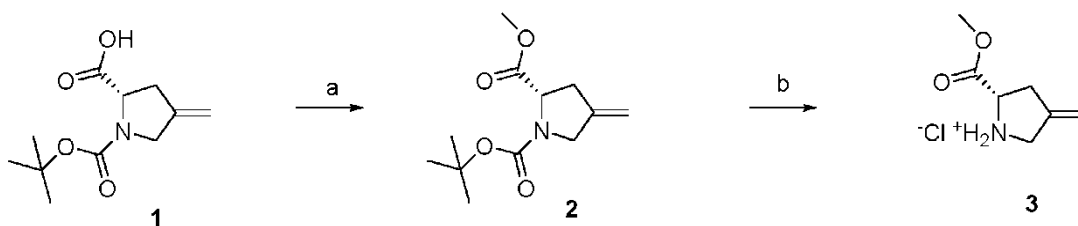
- 40 Los datos de CLEM se obtuvieron usando una serie de CL/EM Shimadzu Nexera con una EM de cuadrupolo de Shimadzu LCMS-2020, con ionización por electropulverización. Fase móvil A - 0,1 % de ácido fórmico en agua. Fase móvil B - 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo.

- 45 Gradiente de ejecución corta: la composición inicial fue 5 % de B retenido durante 0,25 min, después se aumentó del 5 % de B hasta el 100 % de B durante un periodo de 2 min. La composición se mantuvo durante 0,50 min al 100 % de B, después se volvió al 5 % de B en 0,05 minutos y se mantuvo allí durante 0,05 min. El tiempo total de ejecución del gradiente es igual a 3 min. Caudal 0,8 ml/min. Intervalo de detección de longitud de onda: 190 a 800 nm. Temperatura del horno: 50 °C. Columna: Waters Acquity UPLC BEH Shield RP18 1,7 μm 2,1x50 mm.

- 50 Gradiente de ejecución larga: composición inicial 5 % de B mantenido durante 1 min, después se aumentó del 5 % de B hasta el 100 % de B durante un periodo de 9 min. La composición se mantuvo durante 2 min al 100 % de B, después se volvió al 5 % de B en 0,10 minutos y se mantuvo allí durante 3 min. El tiempo total de ejecución del gradiente es igual a 15 min. Caudal 0,6 ml/min. Intervalo de detección de longitud de onda: 190 a 800 nm. Temperatura del horno: 50 °C. Columna: ACE Excel 2 C18-AR, 2 μ, 3,0 x 100 mm.

- 55 Ejemplo 1

(a) Cloruro de (S)-2-(metoxicarbonil)-4-metilenpirrolidinio (3)



El derivado de prolina disponible en el mercado (**1**) se obtuvo de Omegachem

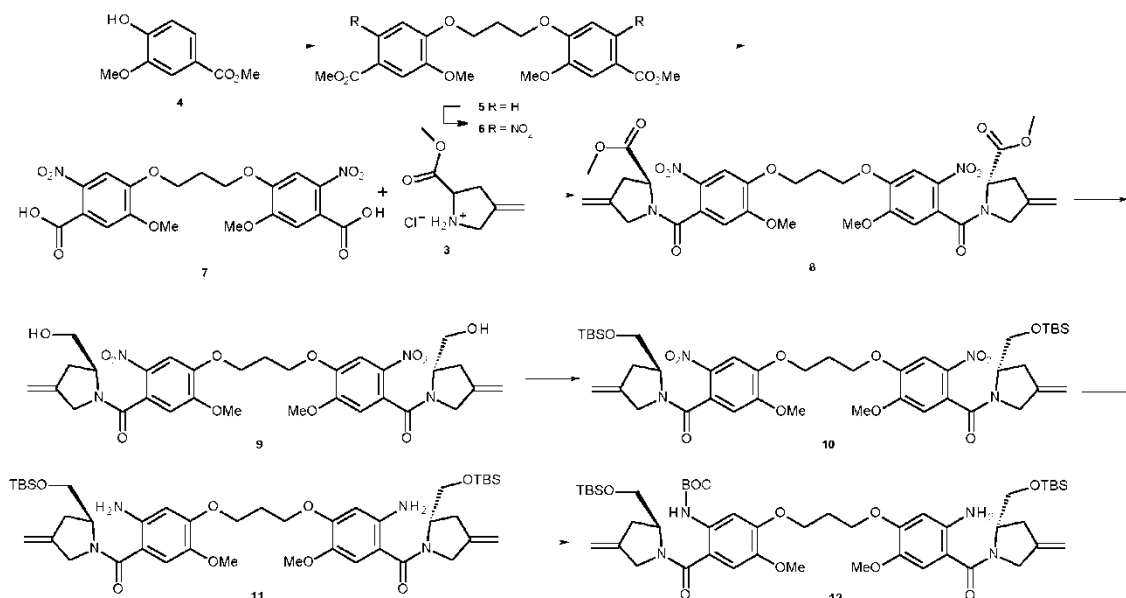
(i) 2-metil 4-metilenpirrolidin-1,2-dicarboxilato de (S)-1-terc-butilo (**2**)

Se añadió carbonato potásico (19,92 g, 14 mmol, 3,0 eq.) a una solución agitada del ácido carboxílico **1** (10,92 g, 48 mmol, 1,0 eq.) en DMF (270 ml). La suspensión blanca resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, en ese punto se añadió yodometano (21,48 g, 9,5 ml, 151 mmol, 3,15 eq.). La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 3 días. El DMF se retiró por evaporación rotativa a presión reducida para proporcionar un residuo amarillo que se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua salada y se secaron sobre sulfato magnésico. El acetato de etilo se retiró por evaporación rotativa a presión reducida para dar el producto bruto como un aceite amarillo. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida [n-hexano al 85 %/acetato de etilo al 15 %] para proporcionar el producto como un aceite incoloro (10,74 g, 93 %).

(ii) Cloruro de (S)-2-(metoxicarbonil)-4-metilenpirrolidinio (**3**)

Se añadió una solución de ácido clorhídrico 4 M en dioxano (63 ml, 254,4 mmol, 4,5 eq.) al fragmento de anillo C protegido con Boc **2** (13,67 g, 56,6 mmol, 1,0 eq.) a temperatura ambiente. Se observó efervescencia que indica liberación de CO₂ y la retirada del grupo Boc. El producto precipitó como un sólido blanco y se añadió dioxano adicional para facilitar la agitación. La mezcla de reacción se dejó agitar durante una hora y después se diluyó con éter dietílico. El producto precipitado se recogió por filtración al vacío y se lavó con éter dietílico adicional. El secado al aire proporcionó el producto deseado como un polvo blanco (9,42 g, 94 %).

(b) 5-(3-(5-amino-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4 metilenpirrolidin-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de terc-butilo (**12**)



(i) 1',3'-Bis[2-metoxi-4-(metoxicarbonil)fenoxi]propano (**5**)

Se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (71,3 ml, 73,2 g, 362 mmol) gota a gota durante un período de 60 min a una solución agitada de vanilato de metilo **4** (60 g, 329 mmol) y Ph₃P (129,4 g, 494 mmol) en THF anhidro (800 ml) a 0-5 °C (hielo/acetona) en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se dejó agitar a 0-5 °C durante 1 h adicional, después de lo cual se añadió gota a gota una solución de 1,3-propanodiol (11,4 ml, 12,0 g, 158 mmol) en THF (12 ml) durante un período de 20 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se

agitó durante 5 días. El precipitado blanco resultante 3 se recogió por filtración al vacío, se lavó con THF y se secó en un desecador de vacío hasta peso constante. Rendimiento = 54,68 g (84 % basado en 1,3-propanodiol). Datos analíticos: Pureza satisfactoria por CL/EM 3,20 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 427 ([M + Na]⁺, 10); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 87,64 (dd, 2H, J = 1,8, 8,3 Hz), 7,54 (d, 2H, J = 1,8 Hz, 6,93 (d, 2H, J = 8,5 Hz, 4,30 (t, 4H, J = 6,1 Hz, 3,90 (s, 6H), 3,89 (s, 6H), 2,40 (p, 2H, J = 6,0 Hz).

(ii) *1',3'-Bis [2-metoxi-4-(metoxicarbonil)-5-nitrofenoxi]propano (6)*

Se añadió Cu(NO₃)₂·3H₂O sólido lentamente (81,54 g, 337,5 mmol) a una suspensión agitada por encima del bis-éster 5 (54,68 g, 135 mmol) en anhídrido acético (650 ml) a 0-5 °C (hielo/acetona). La mezcla de reacción se dejó agitar durante 1 hora a 0-5 °C y después se dejó calentar a temperatura ambiente. En esta fase se observó una exotermia leve (c. 40-50 °C), acompañada de espesamiento de la mezcla y desprendimiento de NO₂. Se añadió anhídrido acético adicional (300 ml) y la mezcla de reacción se dejó agitar durante 16 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió en hielo (~ 1,5 l), se agitó y se dejó volver a temperatura ambiente. El precipitado amarillo resultante se recogió por filtración al vacío y se secó en un desecador para proporcionar el compuesto bis-nitro 6 deseado como un sólido amarillo. Rendimiento = 66,7 g (100 %). Datos analíticos: Pureza satisfactoria por CL/EM 3,25 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 517 ([M + Na]⁺, 40); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,49 (s, 2H), 7,06 (s, 2H), 4,32 (t, 4H, J = 6,0 Hz, 3,95 (s, 6H), 3,90 (s, 6H), 2,45-2,40 (m, 2H). Véase la ref. Thurston 1996.

(iii) *1',3'-Bis 4-carboxi-2-metoxi-5-nitrofenoxi) propano (7)*

Una suspensión del éster metílico 6 (66,7 g, 135 mmol) en THF (700 ml) se trató con NaOH 1 N (700 ml) y la mezcla de reacción se dejó agitar vigorosamente a temperatura ambiente. Después de 4 días de agitación, la suspensión se convirtió en una solución de color oscuro que se sometió a evaporación rotativa a presión reducida para retirar el THF. El residuo acuoso resultante se acidificó a pH 1 con HCl concentrado y el precipitado incoloro 7 se recogió y se secó a fondo en un horno de vacío (50 °C). Rendimiento = 54,5 g (87 %). Datos analíticos: Pureza satisfactoria por CL/EM 2,65 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 489 ([M + Na]⁺, 30); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,62 (s, 2H), 7,30 (s, 2H), 4,29 (t, 4H, J = 6,0 Hz, 3,85 (s, 6H), 2,30-2,26 (m, 2H).

(iv) *1,1'-(4,4'-(propan-1,3-diilbis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitrobenzoil))(2S'2'S)-bis (4-metilenpirrolidin-2-carboxilato) de dimetilo (8)*

Se añadió una cantidad catalítica de DMF anhidro (2,4 ml) a una suspensión agitada de cloruro de oxalilo (14,7 g, 9,8 ml, 115,8 mmol, 3 eq.) y núcleo dímero 7 (18 g, 38,6 mmol, 1 eq.) en DCM anhidro (500 ml) a temperatura ambiente. Se observó efervescencia vigorosa después de la adición de DMF y la mezcla de reacción se dejó agitar durante 18 h en un matraz de fondo redondo equipado con un tubo de secado con cloruro de calcio. La solución transparente resultante se evaporó a presión reducida y el sólido se trituró con éter. El producto sólido se recogió por filtración al vacío, se lavó con éter adicional y se secó al vacío a 40 °C durante 1,5 h. Este sólido después se añadió en porciones a una suspensión del anillo C 3 (15,1 g, 84,9 mmol, 2,2 eq.) y TEA (19,5 g, 27 ml, 119,6 mmol, 5 eq.) en DCM seco (375 ml), manteniendo la temperatura entre -40 y -50 °C con la ayuda de un baño de hielo seco/acetonitrilo. La mezcla de reacción se dejó agitar a -40 °C durante 1 h y después se dejó calentar a temperatura ambiente, momento en el que la CLEM indicó el consumo completo del material de partida. La mezcla de reacción se diluyó con DCM adicional y se lavó secuencialmente con ácido clorhídrico acuoso (1 M, 2 x 200 ml), bicarbonato sódico acuoso saturado (2 x 250 ml), agua (250 ml), salmuera (250 ml), se secó (MgSO₄). El DCM se retiró por evaporación rotativa a presión reducida para proporcionar el producto como una espuma amarilla (25,72 g, 94 %). Datos analíticos: TR 1,59 min; EM (ES+) m/z (intensidad relativa) 713 ([M + H]⁺, 100)

(v) *((Propan-1,3-diilbis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitro-4,1-fenilen))bis(((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidin-1-il)metanona) (9)*

Se añadió borohidruro de litio sólido (3,18 g, 146 mmol, 3 eq.) en una porción a una solución del éster 8 (34,72 g, 48,7 mmol, 1 eq.) en THF seco (350 ml) en una atmósfera de nitrógeno a 0 °C (baño de hielo). La mezcla de reacción se dejó agitar a 0 °C durante 30 minutos y después se dejó calentar a temperatura ambiente, en cuyo punto se observó la precipitación de una goma naranja. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 2 horas adicionales y después se enfrió en un baño de hielo y se trató con agua para dar una suspensión amarilla. Se añadió cuidadosamente ácido clorhídrico (1 M) hasta que cesó la efervescencia. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (x 4) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (x 1), salmuera (x 1) y se secaron (MgSO₄). El acetato de etilo se retiró por evaporación rotativa a presión reducida para dar una espuma amarilla. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida [elución en gradiente DCM/MeOH 0 % al 5 % en aumentos del 1 %] dio el producto como una espuma de color amarillo pálido (23,1 g, 72 %). Datos analíticos: TR 1,23 min; EM (ES+) m/z (intensidad relativa) 657 ([M + H]⁺, 100)

(vi) *((Propan-1,3-diilbis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitro-4,1-fenilen))bis(((S)-2-(((tercbutildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-il)metanona) (10)*

Una solución del bis-alcohol 9 (10 g, 15,2 mmol, 1 eq.), cloruro de *t*-butildimetilsililo (5,97 g, 39,6 mmol, 2,6 eq.) e

imidazol (5,38 g, 79 mmol, 5,2 eq.) en DMF seco (80 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se vertió en agua (500 ml) para dar un precipitado amarillo. La mezcla se extrajo con DCM (4 x 100 ml) y los extractos combinados se lavaron con agua y salmuera, se secaron (MgSO_4) y se evaporó a presión reducida para dar un aceite amarillo viscoso. La purificación por cromatografía en columna [biotage isolera, gradiente de elución hexano 60 %/EtOAc 40 % a EtOAc 100 %, 8 volúmenes de columna, cartucho snap ultra® de 100 g] dio el producto como una espuma amarilla (11,8 g, 88 %). Datos analíticos: TR 2,20 min; EM (ES+) m/z (intensidad relativa) 885 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100), 907 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 50)

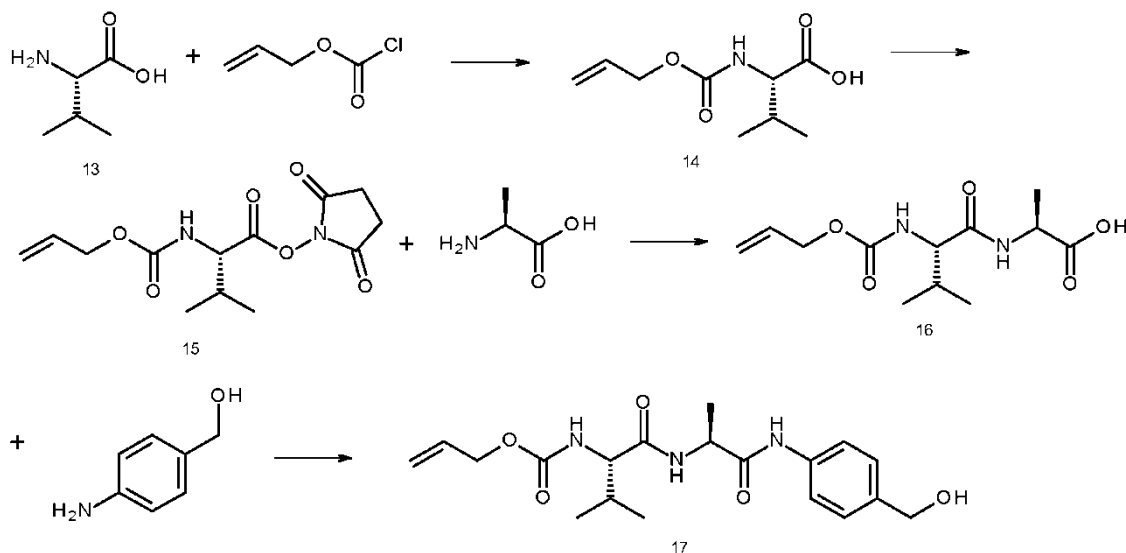
(vii) ((Propan-1,3-diilbis(oxi))bis(2-amino-5-metoxi-4,1-fenilen))bis(((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-il)metanona) (11)

El polvo de cinc (31,9 g, 488 mmol, 40 eq.) se activó mediante agitación/sometimiento a ultrasonidos con HCl 1 M durante 10 min. El cinc se filtró lavando con HCl 1 M, agua (x 3) y MeOH (x 2). El cinc activado se añadió a una solución del compuesto nitro-TBS **10** (10,8 g, 12,2 mmol, 1 eq.) en MeOH (88 ml) y solución de ácido fórmico/MeOH al 5 % (440 ml). La temperatura se elevó a 37 °C y la mezcla de reacción cambió de una solución amarilla a una incolora. Una vez que la exotermia hubo disminuido (20 min), se demostró que la reacción estaba completa por CLEM. La mezcla de reacción se filtró a través de celite lavando con EtOAc. La porción de EtOAc se lavó con una solución saturada de bicarbonato (x 4) [precaución efervescencia], agua (x 1), salmuera (x 1), se secó (MgSO_4) y se evaporó a presión reducida para dar un sólido amarillo. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida [n-hexano/EtOAc 50/50 v/v a EtOAc 100 % en aumentos del 10 %] dio el producto como una espuma amarilla (9,5 g, 86 %). Datos analíticos: TR 2,12 min; EM (ES+) m/z (intensidad relativa) 825 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 60), 847 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 30)

(viii) (5-(3-(5-amino-4-(((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-(((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-4-metoxi-fenil)carbamato de terc-butilo) (12)

Una solución de bis-anilina **11** (3,27 g, 3,96 mmol) y di-t-butildicarbonato (0,85 g, 3,96 mmol) en THF seco (125 ml) se calentó a reflujo durante 24 h. La mezcla de reacción se enfrió y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida [n-hexano/EtOAc 50/50 v/v a EtOAc 100 % en aumentos del 10 % y después EtOAc/MeOH 98/2 v/v] para dar el producto deseado como una espuma amarilla (1,63 g, 44 %). Datos analíticos: TR 2,28 min; EM (ES+) m/z (intensidad relativa) 925 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 70), 947 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 100)

(c) Alloc-Val-Ala-PABOH (17)



(i) Alloc-Val-OH (14)

Se añadió cloroformato de alilo (41 g, 36,2 ml, 0,34 mol, 1,2 eq.) gota a gota a una solución agitada de L-valina **13** (33,25 g, 0,28 mol, 1 eq.) y carbonato potásico (58,9 g, 0,426 mol, 1,5 eq.) en agua (650 ml) y THF (650 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. El THF se evaporó a presión reducida y la solución restante se extrajo con éter dietílico (o MTBE) (x 2). La porción acuosa se acidificó a pH 2 con HCl conc. y se extrajo con DCM (x 3). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (x 1), se secaron (MgSO_4) y se evaporaron a presión reducida para dar un aceite incoloro (57,1 g). Éste se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

(ii) Alloc-Val-OSu (15)

5 A una solución agitada de compuesto **14** (57,1 g, 0,28 mol, 1 eq.) y N-hidroxisuccinimida (32,68 g, 0,28 mol, 1 eq.) en THF seco (800 ml) se añadió dicitlohexilcarbodiimida (58,6 g, 0,28 mol, 1 eq.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla de reacción se filtró. El sólido se lavó con THF y el filtrado combinado se concentró a presión reducida. El residuo de aceite/sólido se redisolvió en DCM y se dejó reposar a 0 °C durante 30 min. La suspensión se filtró lavando con DCM frío. La evaporación del filtrado a presión reducida dio el éster de succinimida como un sólido blanco que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

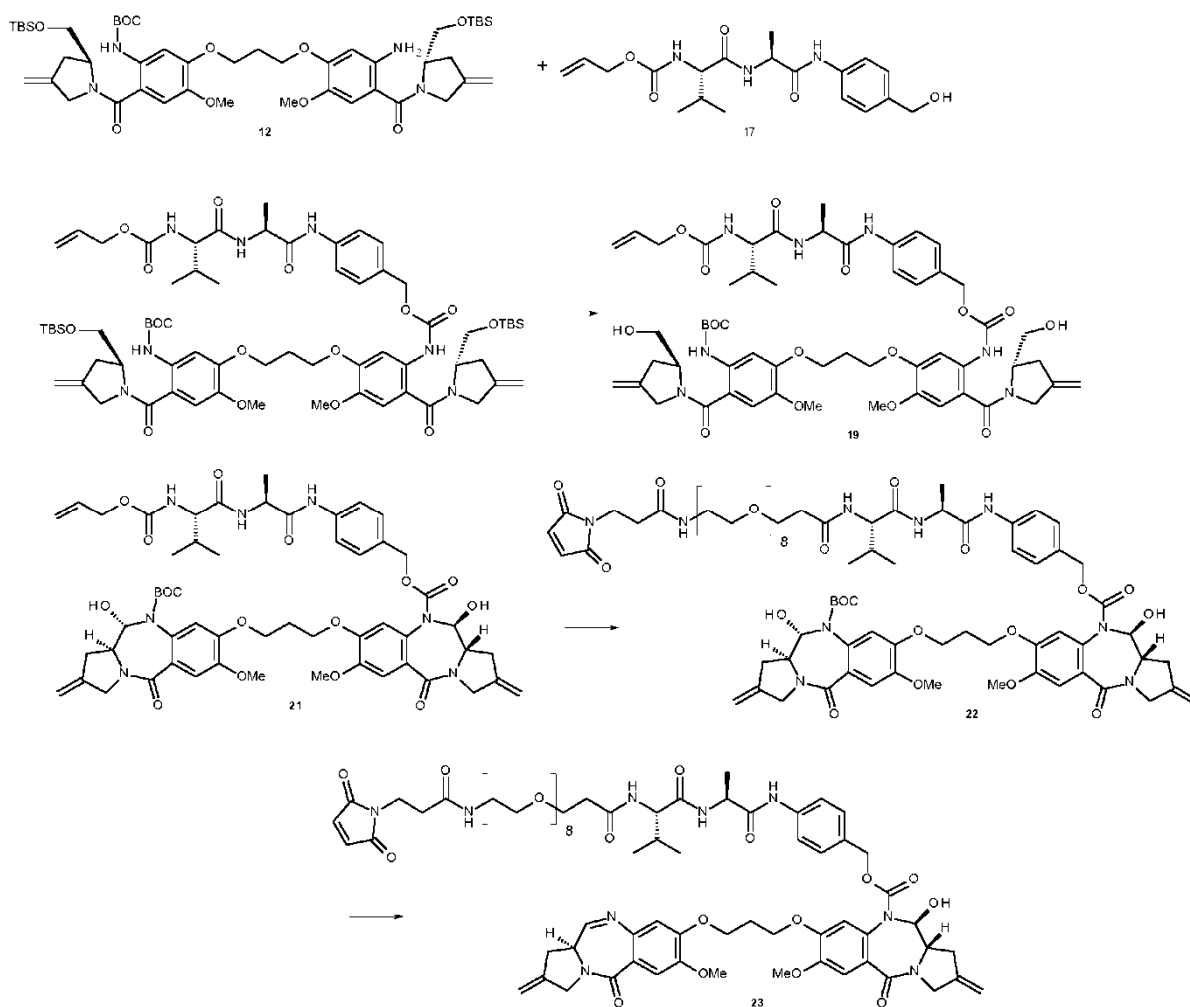
10 (iii) *Alloc-Val-Ala-OH (16)*

15 Una solución de Alloc-Val-OSu **15** (11,67 g, 39,0 mmol, 1 eq.) en THF (50 ml) se añadió a una solución de H-Ala-OH (3,66 g, 41,08 mmol, 1,05 eq.) y NaHCO₃ (3,61 g, 43,03 mmol, 1,1 eq.) en THF (100 ml) y H₂O (100 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 h y el THF se evaporó a presión reducida. El pH se ajustó a 3 - 4 con ácido cítrico para precipitar una goma blanca. Ésta se extrajo con acetato de etilo (6 x 150 ml) y los extractos combinados se lavaron con H₂O (200 ml), salmuera (200 ml), se secaron (MgSO₄) y se evaporó a presión reducida para dar un sólido blanco. La trituración con éter dietílico (xs) proporcionó el producto puro como un polvo blanco (7,93 g, 74 %). Datos analíticos: TR 2,17 min; EM (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 295 ([M + Na]⁺, 63), 273 ([M + 1]⁺, 60).

20 (iv) *Alloc-Val-Ala-PABOH (17)*

25 Se añadió EEDQ (4,79 g, 19,3 mmol, 1,05 eq.) a una solución de alcohol p-aminobencílico (2,38 g, 19,3 mmol, 1,05 eq.) y Alloc-Val-Ala-OH **16** (5,02 g, 18,4 mmol, 1,0 eq) en THF seco (100 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 h. El disolvente se evaporó a presión reducida para dar un sólido marrón pálido. El sólido se trituró con éter dietílico y se lavó por filtración con un exceso de éter dietílico. Esto proporcionó el producto como un sólido blanco (6,2 g, 89 %). Datos analíticos: TR 2,50 min; MS (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 400,6 ([M + Na]⁺, 50), 378,6 ([M + 1]⁺, 60).

30 (d) (11S,11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-8-(3-(((S)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de 4-((2S,5S)-37-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-triazaheptatriacontanamido)encilo (23)



5 (i) (5-(3-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencil)oxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de terc-butilo (**18**)

10 Se añadió trietilamina (0,38 g, 0,53 ml, 3,8 mmol, 2,2 eq.) a una solución agitada de la bis-anilina protegida con mono-boc (**12**) (1,6 g, 1,72 mmol, 1,0 eq.) y trifosgeno (0,184 g, 0,62 mmol, 0,36 eq.) en THF seco (25 ml) en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 40 °C, después de 5 min se trató una muestra con metanol y se analizó por CLEM como el carbamato de metilo. Datos analíticos: TR 2,32 min; EM (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 983 ([M + H]⁺, 55), 1005 ([M + Na]⁺, 100) Una solución/suspensión del alcohol bencílico (**17**) (1,52 g, 2,35 mmol, 1,4 eq.) y trietilamina (0,26 g, 0,36 ml 2,6 mmol, 1,5 eq.) en THF seco (40 ml) se introdujo desde un embudo de goteo hasta el isocianato recién preparado. La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 2,5 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar, se filtró y el filtrado se evaporó a sequedad para proporcionar el producto bruto como un aceite amarillo que se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida [n-hexano/EtOAc 50/50 v/v] que dio el producto como un vidrio amarillo (1,192 g). Las fracciones mixtas se purificaron por cromatografía en columna ultrarrápida [CHCl₃/MeOH 0 % al 1 %] para dar una cantidad adicional de producto (0,22 g). El material se combinó para dar el producto como una espuma amarilla (1,41 g, 63 %). Datos analíticos: TR 2,27 min; EM (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1328 ([M + H]⁺, 30), 1350 ([M + Na]⁺, 100)

15 (ii) (5-(3-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencil)oxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de terc-butilo (**19**)

25 Se añadió una solución 1,0 M de TBAF en THF (2,34 ml, 2,34 mmol, 2,2 eq.) a una solución del compuesto bis-TBS (**18**) (1,41 g, 1,06 mmol, 1,0 eq.) en THF anhidro (12 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, el disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida [CHCl₃/Me-OH 0 % al 4 % en aumentos del 1 %] para dar el producto deseado como una espuma blanca (0,98 g, 84 %). Datos analíticos: TR 1,62 min; EM (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1100 ([M + H]⁺, 60), 1122 ([M + Na]⁺, 100)

30 (iii) (11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(terc-butoxicarbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-

hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4] diazepin-10(5H)-carboxilato de 4-((S)-2-((S)-2-((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencilo (**20**)

5 IBX (45 % en peso, 1,3 g, 2,09 mmol, 2,4 eq.) se añadió a una solución del bis-alcohol **19** (0,959 g, 0,87 mmol, 1,0 eq.) en DMSO anhidro (25 ml). La solución se agitó a 30 °C durante 18 h. El análisis de CLEM indicó la presencia de una pequeña cantidad de material parcialmente ciclado. Una porción adicional de IBX (45 % en peso, 0,049 g, 0,17 mmol, 0,2 eq.) se añadió y la reacción continuó durante 18 h adicionales. La mezcla de reacción se vertió en agua (200 ml) y el precipitado resultante se recogió por filtración lavando con agua. El precipitado se
10 disolvió en DCM (150 ml) y se lavó con NaHCO₃ saturado (100 ml), agua (100 ml) y salmuera (100 ml). La porción orgánica se secó (MgSO₄) y se evaporó para dar un sólido blanco. La purificación por cromatografía en columna instantánea [CHCl₃/MeOH 0 % al 4 % en aumentos del 1 %] dio el producto como un sólido blanco (0,696 g, 73 %). Datos analíticos: TR 1,55 min; EM (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1096 ([M + H]⁺, 20), 1118 ([M + Na]⁺, 100)

15 (iv) (11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(*terc*-butoxicarbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo [e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de 4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)bencilo (**21**)

20 Pd(PPh₃)₄ (14 mg, 12,28 μmol, 0,02 eq.) se añadió a una solución del producto ciclado **20** (0,673 g, 0,61 mmol, 1,0 eq.) y pirrolidina (55 mg, 63 μl, 0,8 mmol, 1,25 eq.) en DCM anhidro (30 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (70 ml) y se lavó con NH₄Cl saturado (100 ml), salmuera saturada (100 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó para dar una espuma blanquecina. El producto se trituró con éter dietílico y se secó para dar el producto (0,62 g, 100 %) que se usó sin purificación adicional. Datos
25 analíticos: TR 1,16 min; EM (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1012 ([M + H]⁺, 80), 1034 ([M + Na]⁺, 20)

(v) (11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(((4-((2S,5S)-37-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-triazaheptatriacontanamido)bencil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4] diazepin-10(5H)-carboxilato de *terc*-butilo (**22**)

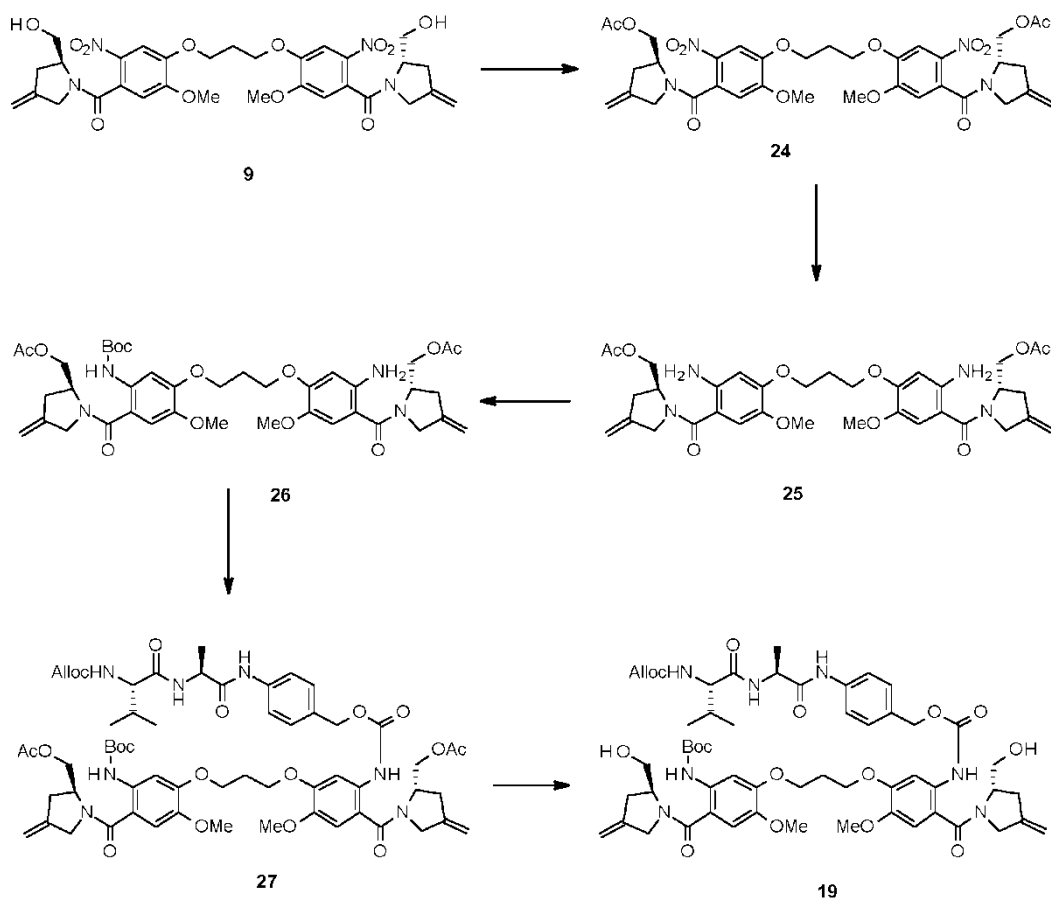
Se añadió EDCI.HCl (0,13 g, 0,66 mmol, 1,1 eq.) a una solución turbia de compuesto **21** (0,61 g, 0,6 mmol, 1,0 eq.) y Mal-dPEG₈-OH (0,393 g, 0,66 mmol, 1,1 eq.) en CHCl₃ (25 ml). La solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h, se diluyó con CHCl₃ (100 ml) lavado con salmuera (2 x 100 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a presión reducida para dar una espuma amarilla. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida [CHCl₃/MeOH 0 % al 6 % en aumentos del 1 %] dio el producto como una espuma blanca (0,786 g, 82 %). Datos analíticos: TR 1,44 min; EM (ES +) *m/z* (intensidad relativa) 1586 ([M + H]⁺, 40), 1609 ([M + Na]⁺, 100)

40 (vi) (11S,11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-8-(3-(((S)-7-metoxi-2-metil-en-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de 4-((2S,5S)-37-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-triazaheptatriacontanamido)bencilo (**23**)

45 Una solución de TFA_(ac) al 95 % enfriada en hielo (10 ml) se añadió al compuesto protegido con Boc **22** (0,759 g, 0,48 mmol, 1,0 eq) que se había enfriado a 0 °C (baño de hielo). La solución amarilla se agitó a 0 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se vertió en hielo/agua (200 ml) y la mezcla se basificó a pH 8 con NaHCO₃ sólido. La mezcla se extrajo con DCM (4 x 50 ml) y los extractos combinados se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron (MgSO₄) y se evaporaron a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida [CHCl₃/MeOH 0 %
50 al 8 % en aumentos del 1 %] para dar una espuma de color amarillo pálido (0,445 g, 65 %). Datos analíticos: TR 1,37 min; EM (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1468 ([M + H]⁺, 40)

Ejemplo 2

55 Síntesis alternativa de (5-(3-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencil)oxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de *terc*-butilo (19)



(i) diacetato de ((2S,2'S)-(4,4'-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitrobenzoil))bis(4-metilenpirrolidin-1,2-diil))bis(metileno) (**24**)

5

Se añadió gota a gota una solución de cloruro de acetilo (21,1 ml, 23,3 g, 297 mmol) en DCM (100 ml) durante un período de 20 min a una solución agitada de bis-alcohol (**9**) (75 g, 114 mmol) y trietilamina (34,7 g, 343 mmol) en DCM anhidro (900 ml) a 0-5 °C en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 60 min adicionales. La mezcla de reacción se lavó con HCl 0,5 M (500 ml) enfriado con hielo, hidrogenocarbonato sódico acuoso saturado (250 ml), salmuera (100 ml) y se secó (MgSO₄). La retirada del disolvente por evaporación rotatoria dio una espuma amarillo pálido que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento = 66,7 g (79 %). Datos analíticos: Pureza satisfactoria por CL/EM (7,60 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 741,2 ([M + 1]⁺, 60) 763,3 ([M + Na]⁺, 100)); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,73 (s, 2H), 6,83 (s, 2H), 5,12 (d, 2H, *J* = 12 Hz), 5,02 (s, 2H), 4,89 (s, 2H), 4,79 (m, 2H), 4,61 (m, 1H), 4,35 (m, 6H), 3,98 (s, 6H), 3,87 (d, 1H, *J* = 4,0 Hz), 3,76 (m, 3H), 2,87-2,83 (m, 2H), 2,56-2,43 (m, 4H), 2,05 (s, 4H), 1,96 (s, 2H).

10

15

(ii) diacetato de ((2S,2'S)-(4,4'-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(2-amino-5-metoxibenzoil))bis(4-metilenpirrolidin-1,2-diil))bis(metileno) (**25**)

20

Se añadió una solución al 10 % de ácido fórmico en metanol (500 ml) de una vez, a través de un embudo de separación, a una solución del bis-alcohol (**24**) (66 g, 0,09 mol) en metanol (1000 ml) que contiene cinc* (145 g, 2,22 mol) a temperatura ambiente. La temperatura de la mezcla de reacción se elevó rápidamente a 42 °C y después se enfrió nuevamente a temperatura ambiente con la ayuda de un baño de agua fría. El exceso de cinc se retiró mediante filtración a través de un lecho corto de celite, que luego se lavó con acetato de etilo (100 ml). El filtrado se diluyó con acetato de etilo (1400 ml) y se lavó con hidrogenocarbonato sódico saturado (1500 ml), agua (500 ml), salmuera (100 ml) y se secó (MgSO₄). La retirada del disolvente por evaporación rotatoria dio un sólido amarillo que se purificó por cromatografía en columna (metanol al 4 %/DCM) para dar el producto como una espuma amarillo pálido. Rendimiento = 38,1 g (63 %). Datos analíticos: Pureza satisfactoria por CL/EM (6,61 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 681,2 ([M + 1]⁺, 100)); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,74 (s, 2H), 6,31 (s, 2H), 5,02 (s, 2H), 4,97 (s, 2H), 4,80 (s, 2H), 4,33-4,10 (m, 16H), 3,78 (s, 3H), 2,78 (m, 2H), 2,46 (m, 2H), 2,34 (m, 2H), 2,04 (s, 6H).

25

30

(iii) ((S)-1-(4-(3-(4-((S)-2-(acetoximetil)-4-metilenpirrolidina-1-carbonil)-5-((terc-butoxicarbonil)amino)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-amino-5-metoxibenzoil)-4-metilenpirrolidin-2-il)metilacetato (**26**)

35

Se añadió anhídrido de Boc (21,6 g, 31,7 mmol) a una solución de la diamina (**25**) (6,92 g 31,7 mmol) en THF

(200 ml) a temperatura ambiente. La solución resultante se calentó después a reflujo durante 3 horas, se enfrió y se evaporó a sequedad a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (70-100 % acetato de etilo/hexano) para dar el producto como un sólido amarillo pálido. Rendimiento = 8,4 g (34 %) Datos analíticos: Pureza satisfactoria por CL/EM (3 min de ejecución) (1,64 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 781,2 ([M + Na]⁺, 30)); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,32 (s a, 1H), 7,87 (s, 1H), 6,80 (s, 1H), 6,73 (s, 1H), 5,02 (m, 3H), 4,79 (3H), 4,34-4,09 (m, 14H), 3,83 (s, 3H), 3,78 (s, 3H), 2,81-2,74 (m, 2H), 2,48-2,36 (m, 4H), 2,04 (m, 7H), 1,49 (s, 9H).

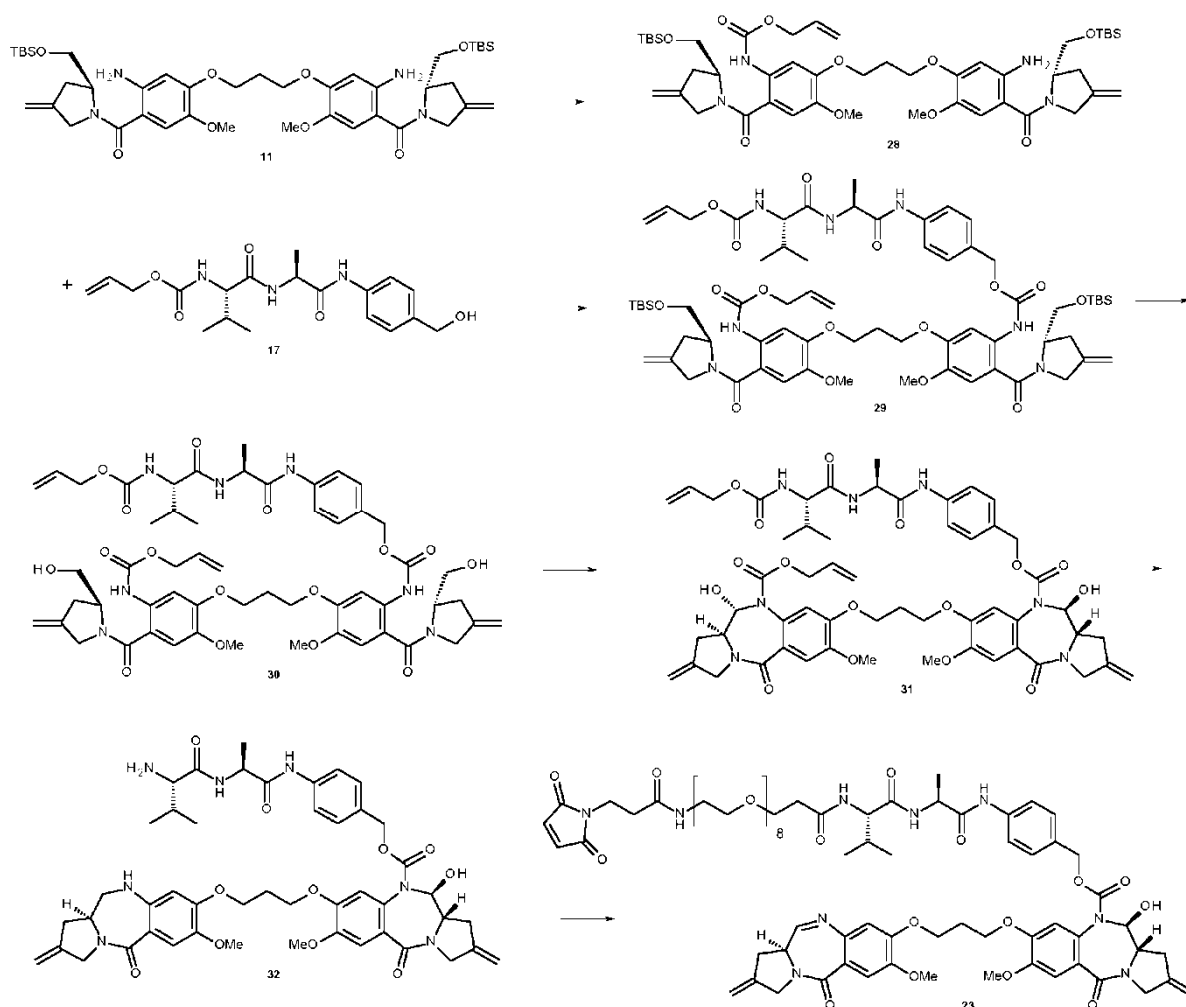
(iv) ((S)-1-(4-(3-(4-((S)-2-(acetoximetil)-4-metilenpirrolidina-1-carbonil)-5-(((4-((S)-2-((S)-2-((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencil)oxi)carbonil)amino)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-((terc-butoxicarbonilo)amino)-5-metoxibenzoil)-4-metilenpirrolidin-2-il)metilacetato (**27**)

Se añadió trietilamina (0,57 g, 5,6 mmol) de una vez a una solución de la amina (**26**) (2 g, 2,56 mmol) y trifosgeno (0,27 g, 0,92 mmol) en THF (30 ml) en nitrógeno. La mezcla resultante se calentó a 40 °C durante 5 min. Una pequeña alícuota se inactivó con metanol, y CLEM indicó conversión completa al carbamato de metilo (m/z 983, M+1). Se añadió de una sola vez una suspensión de SG3366 (2,25 g, 3,48 mmol) y trietilamina (0,39 g, 3,84 mmol) en THF (50 ml) y la mezcla resultante se calentó a 40 °C durante 4 horas. Después del enfriamiento, el sólido blanco se retiró por filtración y el filtrado se evaporó a sequedad a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna (metanol al 1-3 %/DCM) para dar el producto como un sólido amarillo pálido. Rendimiento = 2,1 g (69 %). Datos analíticos: Pureza satisfactoria por CL/EM (8,26 min (ES +) m/z (intensidad relativa) 1184,3 ([M + 1]⁺, 70), 1206,3 ([M + Na]⁺, 100)); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,62 (s, 2H), 7,30 (s, 2H), 4,29 (t, 4H, $J = 6,0$ Hz, 3,85 (s, 6H), 2,30-2,26 (m, 2H).

(v) ((S)-1-(4-(3-(4-((S)-2-(acetoximetil)-4-metilenpirrolidina-1-carbonil)-5-(((4-((S)-2-((S)-2-((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencil)oxi)carbonil)amino)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-((terc-butoxicarbonilo)amino)-5-metoxibenzoil)-4-metilenpirrolidin-2-il)metilacetato (**19**)

Se disolvió carbonato potásico (1,16 g, 8,44 mmol) en agua (8,4 ml) y se añadió a una solución de diacetato (**27**) (2,0 g, 1,69 mmol) en metanol (40 ml). La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 30 min, después se evaporó a sequedad a presión reducida. El residuo resultante se recogió en agua (100 ml), se acidificó (pH 3) con ácido cítrico 1 M y se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 ml). Los extractos combinados se lavaron con agua (100 ml), salmuera (30 ml) y se secaron (MgSO₄). La retirada del disolvente a presión reducida dejó el producto como un sólido blanquecino que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento = 1,6 g (87 %). **Datos analíticos:** Pureza satisfactoria por CL/EM (7,32 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1100,7 ([M+1]⁺, 50), 1122,3 ([M + Na]⁺, 100)); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,98 (s a, 1H), 9,09 (s a, 1H), 8,73 (s a, 1H), 8,14 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 7,59 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7,33 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7,21 (m, 3H), 6,90 (s a, 2H), 5,91 (m, 1H), 5,30 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 5,19 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 5,00 (m, 6H), 4,70 - 4,35 (m, 6H), 4,15 - 3,88 (m, 12H), 3,77 (s, 3H), 3,67 (s, 3H), 2,82 - 2,67 (m, 2H), 2,42 (m, 3H), 2,21 (t, $J = 4$ Hz, 2H), 1,98 (m, 6H), 1,42 (s, 9H), 1,31 (d, $J = 8$ Hz, 3H), 0,90 (d, $J = 4$ Hz, 3H), 0,84 (d, $J = 4$ Hz, 3H).

40 Ejemplo 3



(a) *(5-(3-(5-amino-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-2-metoxi-fenoxi)propoxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de alilo (28)*

5

Se añadió gota a gota una solución de cloroformiato de alilo (1,05 g, 0,9 ml, 8,7 mmol, 0,9 eq.) a una solución de *bis* anilina (11) (8,02 g, 9,7 mmol, 1 eq.) y piridina (1,15 g, 1,2 ml, 14,55 mmol, 1,9 eq.) en DCM seco (350 ml) a -78 °C (baño de hielo seco/acetona). La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 1 hora y después se dejó alcanzar la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó con solución acuosa saturada de sulfato de cobre (250 ml), agua (250 ml), bicarbonato sódico saturado (250 ml), salmuera (250 ml) y se secó (MgSO₄). La evaporación rotativa a presión reducida proporcionó el producto bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida [50 % n-hexano/50 % acetato de etilo, al 20 % de n-hexano/80 % de acetato de etilo al 100 % de acetato de etilo al 1 % de metanol/99 % de acetato de etilo] dio el producto bis-alloc (2,066 g), el producto monoalloc deseado (4,33 g, 49 %) y se recuperó bis-anilina (1,96 g). Datos analíticos: TR 2,26 min; MS (ES⁺) m/z (intensidad relativa) 909 ([M + 1]⁺, 100); 931 ([M + Na]⁺, 100)

10

15

(b) *(5-(3-(5-(((aliloxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de 4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)benzilo (29)*

20

Se añadió trietilamina (1,22 g, 1,7 ml, 12,1 mmol, 2,2 eq.) a una solución agitada de la bis-anilina protegida con mono-boc (28) (5,0 g, 5,5 mmol, 1,0 eq.) y trifosgeno (0,59 g, 1,98 mmol, 0,36 eq.) en THF seco (75 ml) en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 40 °C, después de 5 min se trató una muestra con metanol y se analizó por CLEM como el carbamato de metilo. Datos analíticos: TR 2,30 min; EM (ES⁺) m/z (intensidad relativa) 967 ([M + H]⁺, 25), 989 ([M + Na]⁺, 100)

25

Una solución/suspensión del alcohol bencílico (17) (3,11 g, 8,25 mmol, 1,5 eq.) y trietilamina (0,83 g, 1,1 ml, 2,6 mmol, 1,5 eq.) en THF seco (75 ml) se introdujo desde un embudo de goteo hasta el isocianato recién preparado. La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 5 h. después durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se dejó enfriar, se filtró y el filtrado se evaporó a sequedad para proporcionar el producto bruto como un aceite amarillo que se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida [50 % de n-hexano/50 % de

30

acetato de etilo al 40 % n-hexano/60 % acetato de etilo] que dio el producto como un vidrio amarillo (1,25 g, 17 %). Datos analíticos: TR 2,26 min; EM (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1312 ([M+H]⁺, 25), 1335 ([M + Na]⁺, 35)

5 (c) *(5-(3-(5-(((aliloxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbarnato de 4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencilo (30)*

10 Se añadió una solución 1,0 M de TBAF en THF (5,2 ml, 5,2 mmol, 2,2 eq.) a una solución del compuesto *bis* TBS (29) (3,096 g, 2,36 mmol, 1,0 eq.) en THF anhidro (25 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, el disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna instantánea [acetato de etilo/metanol 0 % al 6 % en aumentos del 1 %] que dio el producto deseado como una espuma blanca (1,91 g, 75 %). Datos analíticos: TR 1,56 min; EM (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1084 ([M+H]⁺, 100), 1106 ([M + Na]⁺, 90)

15 (d) *(11S11aS)-8-(3-(((11S11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato de alilo (31)*

20 IBX (45 % en peso, 2,06 g, 3,3 mmol, 2,4 eq.) se añadió a una solución del bis-alcohol 30 (1,49 g, 1,38 mmol, 1,0 eq.) en DMSO anhidro (40 ml). La solución se agitó a 30 °C durante 18 h. El análisis de CLEM indicó la presencia de una pequeña cantidad de material parcialmente ciclado. Una porción adicional de IBX (45 % en peso, 0,171 g, 0,275 mmol, 0,2 eq.) se añadió y la reacción continuó durante 24 h adicionales. La mezcla de reacción se vertió en agua (200 ml) y el precipitado resultante se recogió por filtración lavando con agua. El precipitado se disolvió en DCM (150 ml) y se lavó con NaHCO₃ saturado (100 ml), agua (100 ml) y salmuera (100 ml). La porción orgánica se secó (MgSO₄) y se evaporó para dar un sólido blanco. La purificación por cromatografía en columna instantánea [CHCl₃/MeOH 0 % al 3 % en aumentos del 1 %] dio el producto como un sólido blanco (1,06 g, 72 %). Datos analíticos: TR 6,88 min; EM (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1080 ([M+H]⁺, 50), 1102 ([M + Na]⁺, 100)

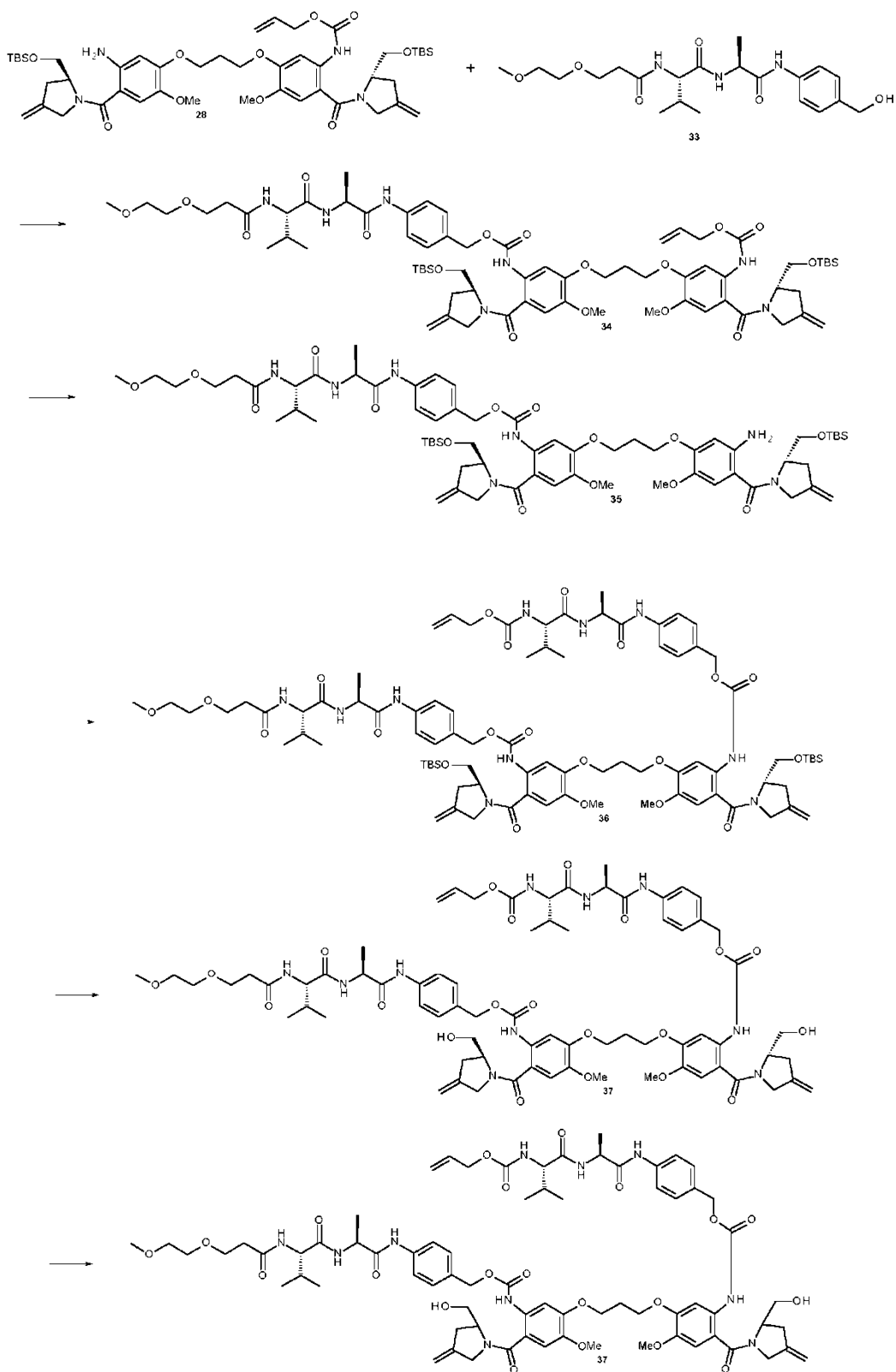
30 (e) *(11S,11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-8-(3-(((S)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-10(5H)-carboxilato de 4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)bencilo (32)*

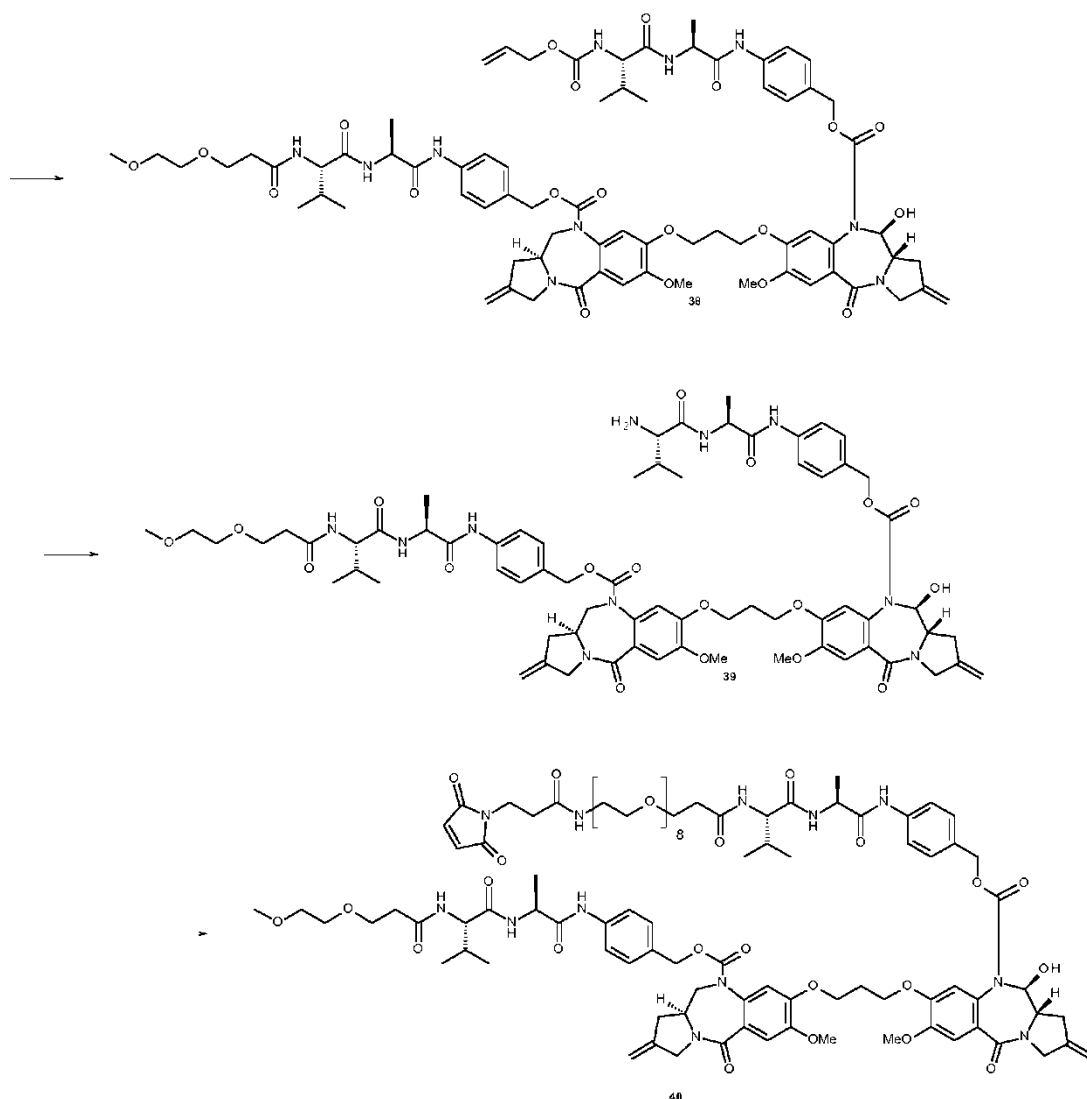
35 Pd(PPh₃)₄ (44 mg, 38,5 μmol, 0,04 eq.) se añadió a una solución del producto ciclado 31 (1,04 g, 0,96 mmol, 1,0 eq.) y pirrolidina (0,171 mg, 196 μl, 2,4 mmol, 2,5 eq.) en DCM anhidro (30 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (30 ml) y se lavó con NH₄Cl saturado (100 ml), salmuera saturada (100 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó para dar una espuma blanquecina. El producto se trituró con éter dietílico y se secó para dar el producto (0,86 g, 100 %) que se usó sin purificación adicional. Datos analíticos: TR 1,10 min; EM (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 894 ([M+H]⁺, 30)

40 (f) *(11S11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-8-(3-(((S)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato de 4-((2S5S)-37-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-triazaheptatriacontanamido)bencilo (23)*

45 EDCI.HCl (0,203 g, 1,06 mmol, 1,1 eq.) se añadió a una solución de compuesto **32** (0,86 g, 0,96 mmol, 1,0 eq.) y Mal-dPEG₈-OH (0,57 g, 0,96 mmol, 1,1 eq.) en DCM seco (30 ml) y CHCl₃ (para dar una solución transparente). La solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. después se añadió una porción adicional de EDCI.HCl (0,037 g, 0,19 mmol, 0,2 eq.) y la reacción continuó durante 24 h adicionales. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (70 ml), se lavó con agua (100 ml), salmuera (100 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a presión reducida para dar una espuma amarilla. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida [CHCl₃/MeOH 0 % al 6 % en aumentos del 1 %] dio el producto como una espuma blanquecina (0,56 g, 40 %). Datos analíticos: TR 6,13 min; EM (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1468 ([M+H]⁺, 20)

55 **Ejemplo 4**





(a) *(2-((R)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-5-(3-(4-((R)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-5-(((4-((10S13S)-10-isopropil-13-metil-8,11-dioxo-2,5-dioxo-9,12-diazatetradecan-14-amido)encil)oxi)carbonil)amino)-2-metoxifenoxi)propoxi)-4-metoxifenil)carbamato de alilo* (34)

Se añadió trietilamina (0,049 g, 0,07 ml, 0,48 mmol, 2,2 eq.) a una solución agitada de la bis-anilina protegida con mono-alloc (23) (0,2 g, 0,22 mmol, 1,0 eq.) y trifosgeno (0,024 g, 0,079 mmol, 0,36 eq.) en THF seco (5 ml) en una atmósfera de argón a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 40 °C, después de 5 min se trató una muestra con metanol y se analizó por CLEM como el carbamato de metilo. Datos analíticos: TR 2,27 min; EM (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 967 ([M+H]⁺, 80), 989 ([M + Na]⁺, 100)

Una solución/suspensión del alcohol bencilico (33) (0,121 g, 0,29 mmol, 1,3 eq.) y trietilamina (0,029 g, 0,04 ml 0,29 mmol, 1,3 eq.) en THF seco (5 ml) se introdujo desde un embudo de goteo hasta el isocianato recién preparado. La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 4 h. después durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se dejó enfriar, se filtró y el filtrado se evaporó a sequedad para proporcionar el producto bruto que se purificó por cromatografía de columna instantánea [Biotage Isolera™ CHCl₃/MeOH 2 % al 4 %, elución en gradiente]. Esto dio el producto (0,237 g, 79 %). Datos analíticos: TR 2,19 min; EM (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1358 ([M+H]⁺, 30), 1380 ([M + Na]⁺, 15)

(b) *(5-(3-(5-amino-4-((R)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-((R)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de 4-((10S13S)-10-isopropil-13-metil-8,11-dioxo-2,5-dioxo-9,12-diazatetradecan-14-amido)encilo* (35)

Pd(PPh₃)₄ (0,3 g, 0,25 mmol, 0,06 eq.) se añadió a una solución del intermedio protegido con alloc 34 (5,89 g, 4,3 mmol, 1,0 eq.) y pirrolidina (0,46 g, 530 µl, 6,5 mmol, 1,5 eq.) en DCM anhidro (50 ml). La solución se agitó a

temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con DCM y se lavó con NH₄Cl saturado, salmuera saturada, se secó (MgSO₄) y se evaporó para dar el producto bruto. El producto se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna [Biotage Isolera™ DCM/MeOH 1 % al 3 %] para dar el producto (4,53 g, 83 %) que tenía una pureza global del 80 % y se usó sin purificación adicional. Datos analíticos: TR 2,10 min; EM (ES +) *m/z* (intensidad relativa) 1275 ([M + H]⁺, 40).

(c) *(2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-5-(3-(4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-5-((((4-((10S13S)-10-isopropil-13-metil-8,11-dioxo-2,5-dioxo-9,12-diazatetradecan-14-amido)encil)oxi)carbonil)amino)-2-metoxifenoxi)propoxi)-4-metoxifenil)carbamato de 4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encilo (36)*

Se añadió trietilamina (0,35 g, 48 µl, 0,34 mmol, 2,2 eq.) a una solución agitada de la anilina (35) (0,2 g, 0,157 mmol, 1,0 eq.) y trifosgeno (0,017 g, 57 µmol, 0,36 eq.) en THF seco (5 ml) en atmósfera de argón a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 40 °C, después de 5 min se trató una muestra con metanol y se analizó por CLEM como el carbamato de metilo. Datos analíticos: TR 2,15 min; EM (ES +) *m/z* (intensidad relativa) 1333 ([M + H]⁺, 40), 1354 ([M + Na]⁺, 35).

Una solución/suspensión del alcohol bencílico (17) (0,071 g, 0,19 mmol, 1,2 eq.) y trietilamina (19 mg, 26 µl, 0,19 mmol, 1,2 eq.) en THF seco (5 ml) se introdujo desde un embudo de goteo hasta el isocianato recién preparado. La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 4 h. luego durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se evaporó a sequedad para proporcionar el producto bruto que se purificó por cromatografía de columna ultrarrápida [Biotage Isolera™ CHCl₃/MeOH 2 % al 3 %, gradiente de elución] que dio el producto (0,152 g, 58 %). Datos analíticos: TR 2,12 min; EM (ES +) *m/z* (intensidad relativa) 1677 ([M + H]⁺, 30), 1700 ([M + Na]⁺, 100).

(d) *(2-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-5-(3-(4-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-5-((((4-((10S13S)-10-isopropil-13-metil-8,11-dioxo-2,5-dioxo-9,12-diazatetradecan-14-amido)encil)oxi)carbonil)amino)-2-metoxifenoxi)propoxi)-4-metoxifenil)carbamato de 4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encilo (37)*

Se añadió una solución 1,0 M de TBAF en THF (3,4 ml, 3,4 mmol, 2,0 eq.) a una solución del compuesto *bis* TBS (36) (2,86 g, 1,7 mmol, 1,0 eq.) en THF anhidro (30 ml) en atmósfera de argón. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 h, la mezcla de reacción se diluyó con CHCl₃ y se lavó con agua, salmuera, se secó (MgSO₄) y se evaporó a presión reducida para dar un sólido amarillo. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna [Biotage Isolera™ CHCl₃/MeOH, gradiente de elución con el producto eluyendo al 4 % de MeOH] que dio el producto deseado (1,365 g) y fracciones mixtas que se purificaron adicionalmente por cromatografía de columna ultrarrápida [CHCl₃/MeOH 1 % al 5 %] para dar un producto adicional (0,562 g) esto dio un rendimiento combinado del producto deseado (1,93 g, 75 %). Datos analíticos: TR 1,55 min; EM (ES +) *m/z* (intensidad relativa) 1449 ([M + 1]⁺, 25); 1471 ([M + Na]⁺, 20).

(e) *(11S11aS)-11-hidroxi-8-(3-(((S)-10-(((4-((10S13S)-10-isopropil-13-metil-8,11-dioxo-2,5-dioxo-9,12-diazatetradecan-14-amido)encil)oxi)carbonil)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrololo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-pirrololo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato de 4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encilo (38)*

IBX (45 % en peso, 0,236 g, 0,38 mmol, 2,2 eq.) se añadió a una solución del bis-alcohol 37 (0,25 g, 0,17 mmol, 1,0 eq.) en DMSO anhidro (12 ml). La solución se agitó a 30 °C durante 3,5 d. La mezcla de reacción se vertió en agua (100 ml) y el precipitado resultante se recogió por filtración lavando con agua. El precipitado se extrajo con DCM (5 x 30 ml) y las fracciones combinadas se lavaron con NaHCO₃ saturado (60 ml), agua (60 ml) y salmuera (60 ml). La porción orgánica se secó (MgSO₄) y se evaporó para dar el producto bruto. Purificación por cromatografía en columna ultrarrápida [CHCl₃/MeOH 1 % al 5 %] dio el producto como un sólido blanco (0,158 g, 64 %). Datos analíticos: TR 1,53 min; EM (ES +) *m/z* (intensidad relativa) 1445 ([M + 1]⁺, 20); 1467 ([M + Na]⁺, 30).

(f) *(11S,11aS)-11-hidroxi-8-(3-(((11S,11aS)-11-hidroxi-10-((((4-((10S,13S)-10-isopropil-13-metil-8,11-dioxo-2,5-dioxo-9,12-diazatetradecan-14-amido)encilo)oxi)carbonil)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrololo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrololo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de 4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)encilo (39)*

Pd(PPh₃)₄ (8 mg, 6,9 µmol, 0,06 eq.) se añadió a una solución del producto ciclado 38 (0,158 g, 0,109 mmol, 1,0 eq.) y pirrolidina (0,01 g, 12 µl, 0,15 mmol, 1,5 eq.) en DCM anhidro (10 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. La mezcla de reacción se diluyó con CHCl₃ y se lavó con una solución saturada de bicarbonato sódico, salmuera saturada, se secó (MgSO₄) y se evaporó para dar el producto bruto. El producto se trituró con éter dietílico (x 3) y se secó para dar el producto (0,136 g, 100 %) que se usó sin purificación adicional. Datos analíticos: TR 1,21 min; EM (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1361 ([M + 1]⁺, 50); 1384 ([M + Na]⁺, 10).

(g) (11S11aS)-11-hidroxi-8-(3-(((11S,11aS)-11-hidroxi-10-(((4-((10S13S)-10-isopropil-13-metil-8,11-dioxo-2,5-dioxo-9,12-diazatetradecan-14-amido)bencil)oxi)carbonil)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrol-2,1-c)[1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol-2,1-c)[1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato de 4-((2S5S)-37-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-triazaheptatriacontanamido)bencilo (40)

Una solución de compuesto 39 (0,136 g, 0,1 mmol, 1,0 eq.), Mal-dPEG₈-OH (0,066 g, 0,11 mmol, 1,1 eq.) y EDCI.HCl (0,022 g, 0,11 mmol, 1,1 q.) en DCM seco (10 ml) y MeOH (1 gota) se agitó a temperatura ambiente durante 1,45 h. La mezcla de reacción se diluyó con CHCl₃ y se lavó con agua, salmuera, se secó (MgSO₄) y se evaporó a presión reducida para dar el producto bruto. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida [CHCl₃/MeOH 1 % al 9 %] dio el producto como un sólido blanco (0,123 g, 63 %). Datos analíticos: [α]_D²⁵ = +112,5° (c = 0,4, hplc CHCl₃); TR 6,37 min; EM (ES+) m/z (intensidad relativa) 1936 ([M + 1]⁺, 35); 1958 ([M + Na]⁺, 15).

15 Ejemplo 5 - Conjugación

Conjugado trastuzumab-23

Se añadió una solución 50 mM de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 (PBS) (50 equivalentes molares/anticuerpo, 35 micromoles, 700 μl) a una solución de anticuerpo de 24,14 ml, trastuzumab, (105 mg, 700 nanomoles) en tampón de reducción que contiene PBS y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y una concentración final de anticuerpo de 4,35 mg/ml. La mezcla de reducción se calentó a +37 °C durante 3 horas (o hasta que se observe una reducción completa por UHPLC) en una incubadora con agitación suave (<150 rpm). Después del enfriamiento a temperatura ambiente, el anticuerpo reducido se intercambió con tampón, a través de centrifugación del filtro de centrifugado, en un tampón de reoxidación que contiene PBS pH 7,4 y EDTA 1 mM para retirar todo el exceso de agente reductor. Una solución 50 mM de ácido deshidroascórbico (DHAA, 10 equivalentes molares/anticuerpo, 7 micromoles, 140 μl) en DMSO se añadió y la mezcla de reoxidación se dejó reaccionar durante 16 horas a temperatura ambiente con agitación suave (< 150 rpm) a una concentración de anticuerpo de 2,3 mg/ml (o se añadió más DHAA y la reacción se dejó durante más tiempo hasta que UHPLC observe la reoxidación completa de los tioles de cisteína para reformar los disulfuros de cisteína intercatenarios). La mezcla de reoxidación después se esterilizó por filtración y se diluyó en un tampón de conjugación que contenía PBS pH 7,4, EDTA 1 mM para una concentración de anticuerpo final de 1,0-1,5 mg/ml. El compuesto 23 (SG3400) se añadió como una solución DMSO (10 equivalentes molares/anticuerpo, 1 micromol, en 1,0 ml de DMSO) a 9 ml de esta solución de anticuerpo reoxidado (15 mg, 100 nanomoles) para una concentración final de DMSO del 10 % (v/v). La solución se mezcló durante 1,5 horas a temperatura ambiente, después, la conjugación se inactivó mediante la adición de N-acetil cisteína (4 micromoles, 40 μl a 100 mM), se diluyó a > 50 ml en PBS y el conjugado trastuzumab-23 se purificó mediante filtración por rotación usando un filtro de centrífuga de 15 ml Amicon Ultracell 50 kDa MWCO, se esterilizó por filtración y se analizó. El análisis UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Phenomenex AeriS 3.6u XB-C18 de 150 mm x 2,1 mm eluyendo con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida de trastuzumab-conjugado A a 280 nm y 330 nm (compuesto A específico) muestra cadenas ligeras no conjugadas y una mezcla de cadenas pesadas no conjugadas y cadenas pesadas unidas a una única molécula del compuesto 23, consistente con una relación de fármaco por anticuerpo (DAR) de 1,71 moléculas de compuesto 23 por anticuerpo.

El análisis UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Tosoh Bioscience TSKgel G3000SWXL de 5 μm 7,8 x 300 mm (con una columna de protección de 7 μm 6,0 x 40 mm) eluyendo con tampón SEC esterilizado por filtración que contiene fosfato potásico 200 mM pH 6,95, cloruro potásico 250 mM y un 10 % de isopropanol (v/v) en una muestra de trastuzumab-23 conjugado a 280 nm muestra una pureza de monómero del 94 %. El análisis UHPLC SEC da una concentración de conjugado final trastuzumab-23 a 0,84 mg/ml en 15 ml, la masa obtenida de conjugado trastuzumab-23 es 12,7 mg (84 % de rendimiento).

Conjugado trastuzumab-40

Se añadió una solución 50 mM de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 (PBS) trastuzumab, (50 equivalentes molares/anticuerpo, 50 micromoles, 1,0 ml) a una solución de anticuerpo de 34,5 ml (150 mg, 1,0 micromoles) en tampón de reducción que contiene PBS y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM a una concentración de anticuerpo final de 4,35 mg/ml. La mezcla de reducción se calentó a +37 °C durante 3 horas (o hasta que se observe una reducción completa por UHPLC) en una incubadora con agitación suave (<150 rpm). Después del enfriamiento a temperatura ambiente, el anticuerpo reducido se intercambió con tampón, a través de centrifugación del filtro de centrifugado, en un tampón de reoxidación que contiene PBS y EDTA 1 mM para retirar el exceso de agente reductor. Una solución 50 mM de ácido deshidroascórbico (DHAA, 50 equivalentes molares/anticuerpo, 50 micromoles, 1,0 ml) en DMSO se añadió y la mezcla de reoxidación se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente (o hasta que se observó una reoxidación completa de los tioles de cisteína para reformar los disulfuros de cisteína entre cadenas por UHPLC) con agitación suave (< 150 rpm) a una concentración de anticuerpo de 2-3 mg/ml. La mezcla de reoxidación después se esterilizó por filtración y se diluyó en un tampón de conjugación que contenía PBS y EDTA 1 mM a una

concentración de anticuerpo final de ~1,5 mg/ml. El compuesto 40 se añadió como una solución DMSO (10 equivalentes molares/anticuerpo, 1 micromol, en 0,9 ml de DMSO) a 9 ml de esta solución de anticuerpo reoxidado (15 mg, 100 nanomoles). La solución se mezcló durante 1,25 horas a temperatura ambiente, después de lo cual la reacción de conjugación se inactivó mediante la adición de *N*-acetil cisteína (4 micromoles, 40 µl a 100 mM) y se diluyó a > 50 ml en PBS. La mezcla de conjugación se purificó mediante filtración por centrifuga usando un filtro de centrifuga MWCO Amicon Ultracell 50 kDa de 15 ml, se esterilizó por filtración, se analizó y se almacenó a +4 °C. Las etapas de reducción y reoxidación se controlan mediante la comparación de las cantidades relativas de cadenas ligeras y pesadas individuales con anticuerpos de longitud completa como se observa por análisis UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 150 x 2,1 mm eluyendo con una columna gradiente de agua y acetonitrilo. El análisis UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 de 150 x 2,1 mm eluyendo con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida de trastuzumab-conjugado B a 280 nm y 330 nm (compuesto 40 específico) muestra cadenas ligeras no conjugadas y una mezcla de cadenas pesadas no conjugadas y cadenas pesadas unidas a una única molécula del compuesto 40, consistente con una relación de fármaco por anticuerpo (DAR) de 1,68 moléculas de compuesto 40 por anticuerpo.

El análisis UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 x 150 mm (con una columna de protección de 4 µm 3,0 x 20 mm) eluyendo con 0,3 ml/minuto de tampón SEC esterilizado por filtración que contiene fosfato potásico 200 mM pH 6,95, cloruro potásico 250 mM y un 10 % de isopropanol (v/v) en una muestra de trastuzumab-40 conjugado a 280 nm muestra una pureza de monómero del 93 % sin impurezas detectadas. El análisis UHPLC SEC da una concentración de conjugado final trastuzumab-B a 0,74 mg/ml en 17 ml, la masa obtenida de conjugado trastuzumab-40 es 12,5 mg (83 % de rendimiento).

25 *Conjugado R347-23*

Se añadió una solución 50 mM de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 (PBS) (42 equivalentes molares/anticuerpo, 56 micromoles, 1,12 ml a 50 mM) a una solución de anticuerpo de 14,09 ml (200 mg, 1,33 micromoles) en tampón de reducción que contiene PBS y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y una concentración final de anticuerpo de 4,0 mg/ml. La mezcla de reducción se calentó a +25 °C durante 24 horas (o hasta que se observe una reducción completa por UHPLC) en una incubadora con agitación suave (<100 rpm). Después del enfriamiento a temperatura ambiente, el anticuerpo reducido se intercambió con tampón, a través de una Unidad de filtración de flujo tangencial (TFF) usando mPES, filtro de fibra MidiKros® de 30 kDa con área superficial de 115 cm², en un tampón de reoxidación que contiene PBS pH 7,4 y EDTA 1 mM para retirar todo el exceso de agente reductor. El anticuerpo reducido se centrifugó durante 3 min a 4000 rpm y después se filtró usando un filtro de membrana de 0,45 µm. Una solución 50 mM de ácido deshidroascórbico (DHAA, 15 equivalentes molares/anticuerpo, 20 micromoles, 400 µl a 50 mM) en DMSO se añadió y la mezcla de reoxidación se dejó reaccionar durante 16 horas a temperatura ambiente con agitación suave (<100 rpm) a una concentración de anticuerpo de 2,5 mg/ml (o hasta que la reoxidación completa de los tioles de cisteína para reformar los disulfuros de cisteína intercatenarios se observe mediante UHPLC). La mezcla de reoxidación se centrifugó durante 3 min a 4000 rpm y después se esterilizó por filtración usando un filtro de membrana de 0,2 µm. El compuesto 23 se añadió como una solución DMSO (10 equivalentes molares/anticuerpo, 13,3 micromoles, en 6,6 ml de DMSO) a 80 ml de esta solución de anticuerpo reoxidado (200 mg, 1,33 micromoles) para un 10 % (v/v) de concentración final de DMSO. La solución se agitó durante 3 horas a +25 °C y después la conjugación se inactivó con *N*-acetilcisteína (72,3 micromoles, 0,72 ml a 100 mM).

Se retiró el exceso de fármaco libre a través de una Unidad de filtración de flujo tangencial (TFF) usando mPES, filtro de fibra MidiKros® de 30 kDa con área superficial de 115 cm², en tampón que contiene PBS a pH 7,4. El alcance de la retirada de fármaco libre se controló mediante UHPLC-RP usando conjugado puro. Después de la retirada completa del fármaco libre, los ADC se formularon sobre histidina 25 mM, Sacarosa 200 mM, pH 6,0, a través de TFF usando mPES, filtro de fibra MidiKros® de 30 kDa con área superficial de 115 cm². Todo el proceso de conjugación R347 con el Compuesto 23 se repitió con 400 mg de anticuerpo y también se purificó usando TFF. Los ADC de ambos lotes se combinaron y después se filtraron usando un filtro Mustang en atmósfera estéril y después se almacenó a -78 °C.

El análisis UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 de 150 x 2,1 mm eluyendo con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida de conjugado a 214 nm y 330 nm (compuesto 23 específico) muestra una mezcla de cadenas ligeras y pesadas unidas a varias moléculas del Compuesto 23, consistente con una relación de fármaco por anticuerpo (DAR) de 1,71 moléculas de compuesto 23 por anticuerpo.

El análisis UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 x 150 mm (con una columna de protección de 4 µm 3,0 x 20 mm) eluyendo con 0,3 ml/minuto de tampón SEC esterilizado por filtración que contiene fosfato potásico 200 mM pH 6,95, cloruro potásico 250 mM y un 10 % de isopropanol (v/v) en una muestra de ADC a 280 nm muestra una pureza de monómero más grande del 97 %. El análisis UHPLC SEC proporciona una concentración de ADC final a 1,92 mg/ml en 265 ml, la masa

obtenida de ADC es 509 mg (85 % de rendimiento).

Conjugado R347-40

- 5 Se añadió una solución 50 mM de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 (PBS) (50 equivalentes molares/anticuerpo, 20 micromoles, 0,4 ml) a una solución de anticuerpo de 13,25 ml (60 mg, 0,4 micromoles) en tampón de reducción que contiene PBS y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM a una concentración de anticuerpo final de 4,5 mg/ml. La mezcla de reducción se calentó a +37 °C durante 3 horas (o hasta que se observe una reducción completa por UHPLC) en una incubadora con agitación suave (<150 rpm). Después del enfriamiento a temperatura ambiente, el anticuerpo reducido se intercambió con tampón, a través de centrifugación del filtro de centrifugado, en un tampón de reoxidación que contiene PBS y EDTA 1 mM para retirar el exceso de agente reductor. Una solución 50 mM de ácido deshidroascórbico (DHAA, 12 equivalentes molares/anticuerpo, 4,8 micromoles, 96 µl) en DMSO se añadió y la mezcla de reoxidación se dejó reaccionar durante 17 horas a temperatura ambiente (o hasta que se observó una reoxidación completa de los tioles de cisteína para reformar los disulfuros de cisteína entre cadenas por UHPLC) con agitación suave (< 150 rpm) a una concentración de anticuerpo de ~1,6 mg/ml. La mezcla de reoxidación después se esterilizó por filtración y se diluyó en un tampón de conjugación que contenía PBS y EDTA 1 mM a una concentración de anticuerpo final de ~1,5 mg/ml. El compuesto 40 se añadió como una solución DMSO (11 equivalentes molares/anticuerpo, 0,44 micromoles, en 0,45 ml de DMSO) a 4,05 ml de esta solución de anticuerpo reoxidado (6 mg, 40 nanomoles). La solución se mezcló durante 1,25 horas a temperatura ambiente, después de lo cual la reacción de conjugación se inactivó mediante la adición de *N*-acetil cisteína (1,76 micromoles, 17,6 µl a 100 mM). La mezcla de conjugación se purificó mediante filtración por centrifuga con PBS usando un filtro de centrifuga MWCO Amicon Ultracell 50 kDa de 15 ml, se esterilizó por filtración, se analizó y se almacenó a +4 °C.
- 25 Las etapas de reducción y reoxidación se controlan mediante la comparación de las cantidades relativas de cadenas ligeras y pesadas individuales con anticuerpos de longitud completa como se observa por análisis UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 150 x 2,1 mm eluyendo con una columna gradiente de agua y acetonitrilo. El análisis UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 de 150 x 2,1 mm eluyendo con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida de conjugado R347-40 a 280 nm y 330 nm (conjugado 40 específico) muestra cadenas ligeras no conjugadas y una mezcla de cadenas pesadas no conjugadas y cadenas pesadas unidas a una única molécula del compuesto 40, consistente con una relación de fármaco por anticuerpo (DAR) de 1,86 moléculas de compuesto 40 por anticuerpo.
- 35 El análisis UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Tosoh Bioscience TSKgel G3000SWXL de 5 µm 7,8 x 300 mm (con una columna de protección de 7 µm 6,0 x 40 mm) eluyendo con tampón SEC esterilizado por filtración que contiene fosfato potásico 200 mM pH 6,95, cloruro potásico 250 mM y un 10 % de isopropanol (v/v) en una muestra de conjugado R347-40 a 280 nm muestra una pureza de monómero del 97 % sin impurezas detectadas. El análisis UHPLC SEC da una concentración de conjugado R347-40 final a 0,87 mg/ml en 5,5 ml, la masa obtenida de conjugado R347-40 es 4,8 mg (80 % de rendimiento).

Conjugado HLL2-23

- 45 Se añadió una solución 50 mM de DTT (Ditiotreitol) en solución salina tamponada con fosfato a pH 7,4 (PBS) (40 equivalentes molares/anticuerpo, 40 micromoles, 825 µl) a una solución de 37,5 ml de anticuerpo HLL2 (150 mg, 1 micromol) en tampón de reducción que contiene PBS y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y una concentración final de anticuerpo de 4 mg/ml. La mezcla de reducción se incubó a temperatura ambiente durante la noche con agitación suave (135 rpm). El anticuerpo reducido se intercambió con tampón contra PBS+EDTA 1 mM (para retirar el exceso de DTT) usando TFF (filtración de flujo tangencial, casete de fibra hueca Spectrum Labs 115 cm² con corte de peso molecular de 50 kDa). La muestra se filtró usando un filtro de jeringa de 0,4 µm para retirar cualquier resto de la etapa de TFF y la concentración de anticuerpo se llevó a 1,5 mg/ml antes de la reoxidación. Una solución 50 mM de ácido deshidroascórbico (DHAA, 15 equivalentes molares/anticuerpo, 13,9 micromoles, 0,28 ml) en DMSO se añadió y la mezcla de reoxidación se dejó reaccionar durante 16 horas a temperatura ambiente con agitación suave (< 150 rpm). La mezcla de reoxidación después se esterilizó por filtración; se obtuvieron 139 mg de anticuerpo (92,6 ml como solución de 1,5 mg/ml), 14 ml de los cuales se llevaron a la conjugación con el Compuesto 23 (aproximadamente estimados 21 mg de anticuerpo, 0,14 micromoles). El compuesto 23 se añadió como una solución DMSO (10 equivalentes molares/anticuerpo, 0,33 micromoles en 0,133 ml de DMSO) a 14 ml de la solución de anticuerpo reoxidado. La mezcla de conjugación se cubrió con 1,27 ml de DMSO para llevar la concentración final de DMSO al 10 % (v/v) y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente con agitación suave (135 rpm). Después se retiró el fármaco libre del conjugado anticuerpo-fármaco mediante diafiltración extensiva en PBS usando un dispositivo de filtro giratorio (filtro centrifugo Amicon Ultra-30K, Millipore). La mezcla de conjugación resultante se esterilizó por filtración y se analizó por UHPLC.
- 65 El análisis UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 de 150 x 2,1 mm eluyendo con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida de conjugado a 214 nm y 330 nm (compuesto 23 específico) muestra una mezcla de cadenas pesadas sin conjugar o bien unidas a 1 molécula

de Compuesto 23, consistente con una relación de fármaco por anticuerpo (DAR) de 1,64 moléculas de compuesto 23 por anticuerpo.

El análisis UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 μm 4,6 x 150 mm (con una columna de protección de 4 μm 3,0 x 20 mm) eluyendo con 0,3 ml/minuto de tampón SEC esterilizado por filtración que contiene fosfato potásico 200 mM pH 6,95, cloruro potásico 250 mM y un 10 % de isopropanol (v/v) en una muestra de ADC a 280 nm muestra una pureza de monómero mayor del 97 %. El análisis UHPLC SEC proporciona una concentración de ADC final a 2,06 mg/ml en 10 ml, la masa obtenida de ADC es 20,6 mg.

Conjugado AntiCD79b-23

Se añadió una solución 50 mM de DI-ditiotreitol (DTT) en solución salina tamponada con fosfato a pH 7,4 (PBS) (80 equivalentes molares/anticuerpo, 53,3 micromoles, 1,07 ml) a una solución de 25 ml de anticuerpo CD79b (100 mg, 667 nmol) en tampón de reducción que contiene PBS y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y una concentración final de anticuerpo de 4 mg/ml. La mezcla de reducción se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante la noche con agitación suave. El anticuerpo reducido se intercambió con tampón, a través de centrifugación del filtro de centrifugado, en un tampón de reoxidación que contiene PBS y EDTA 1 mM para retirar todo el exceso de agente reductor. Una solución 50 mM de ácido deshidroascórbico (DHAA, 15 equivalentes molares/anticuerpo, 9,28 micromoles, 185 μl) en DMSO se añadió y la mezcla de reoxidación se dejó reaccionar durante 16 horas a temperatura ambiente con agitación suave (< 150 rpm). La mezcla de reoxidación después se esterilizó por filtración; El compuesto 23 se añadió como una solución DMSO (15 equivalentes molares/anticuerpo, 1,8 micromoles en 1,0 ml de DMSO) a 9 ml de esta solución de anticuerpo reoxidado (18 mg, 120 nanomoles) para una concentración final de DMSO al 10 % (v/v) y una concentración final de anticuerpo de 1,8 mg/ml en PBS + EDTA 1 mM. La solución se mezcló durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación suave (135 rpm), después la conjugación se inactivó mediante la adición de N-acetil cisteína (7,2 micromoles, 72 μl a 100 mM), después se purificó mediante filtración por centrifuga usando el filtro de centrifuga de 15 ml Amicon Ultracell 50<kDa, se esterilizó por filtración y se analizó.

El análisis UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Phenomenex Aeria 3.6u XB-C18 de 150 x 2,1 mm eluyendo con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida de Conjugado a 280 nm (ADC) y 330 nm (compuesto 23 específico) cadenas ligeras no conjugadas y una mezcla de cadenas pesadas no conjugadas y cadenas pesadas unidas a 1 o 2 moléculas del compuesto 23, consistente con una relación de fármaco por anticuerpo (DAR) de 2,08 moléculas de compuesto 23 por anticuerpo.

El análisis UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 μm 4,6 x 150 mm (con una columna de protección de 4 μm 3,0 x 20 mm) eluyendo con 0,3 ml/minuto de tampón SEC esterilizado por filtración que contiene fosfato potásico 200 mM pH 6,95, cloruro potásico 250 mM y un 10 % de isopropanol (v/v) en una muestra de ADC a 280 nm muestra una pureza de monómero de más del 98 %. El análisis UHPLC SEC proporciona una concentración de ADC final a 1,62 mg/ml en 7,6 ml, la masa obtenida de ADC es 12,28 mg.

Ejemplo 5 - pruebas *in vitro*

Se aspiró medio de cultivo celular sub-confluente (80-90 % de confluencia) en un matraz T75 y el matraz se enjuagó con PBS (aproximadamente 20 ml) y se vació. Se añadió tripsina-EDTA (5 ml), el matraz volvió a la incubadora gaseosa a 37 °C durante aproximadamente 5 minutos, después se golpeó bruscamente para desalojar y disociar las células del plástico. La suspensión celular se transfirió a un tubo de centrifuga estéril con tapa de rosca de 50 ml, se diluyó con medio de crecimiento hasta un volumen final de 15 ml, después se centrifugó (400 g durante 5 min). Se aspiró el sobrenadante y se volvió a suspender el sedimento en 10 ml de medio de cultivo. Pipetear repetidamente puede ser necesario para producir suspensiones de células monodispersas. La concentración y la viabilidad celulares se miden en células teñidas con células azules de tripano, usando un hemocitómetro. Las células se diluyeron a 2×10^5 /ml, se dispensaron (50 μl /pocillo) en placas de fondo plano de 96 pocillos y se incubó durante la noche antes de su uso.

Se preparó una solución madre (1 ml) de conjugado de fármaco de anticuerpo (ADC) (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por dilución de ADC esterilizado por filtro en medio de cultivo celular. Se preparó un conjunto de diluciones 8x 10 veces de ADC de reserva en una placa de 24 pocillos mediante transferencia en serie de 100 μl a 900 μl de medio de cultivo celular.

La dilución de ADC se dispensó (50 μl /pocillo) en 4 pocillos replicados de la placa de 96 pocillos, que contenía 50 μl de suspensión celular sembrada el día anterior. Los pocillos de control recibieron 50 μl de medio de cultivo celular.

La placa de 96 pocillos que contenía células y ADC se incubó a 37 °C en una incubadora gaseada con CO₂ durante el tiempo de exposición.

Al final del periodo de incubación, la viabilidad celular se midió por ensayo MTS. Se dispensó MTS (Promega) (20 μl por pocillo) en cada pocillo y se incubó durante 4 horas a 37 °C en la incubadora gaseada con CO₂. La absorbancia

del pocillo se midió a 490 nm. El porcentaje de supervivencia celular se calculó a partir de la absorbancia media en los 4 pocillos tratados con ADC en comparación con la absorbancia media en los 4 pocillos de control no tratados (100 %). Se determinó la CI_{50} a partir de los datos de dosis-respuesta usando GraphPad Prism usando el algoritmo de ajuste de curva no lineal: sigmoidea, 4PL X es log (concentración).

5

Línea celular	Descripción	Exposición al ADC	Medio de crecimiento celular
SKBR3	Carcinoma de mama	4 días	McCoys con Glutamax, FBS al 10 %
BT474	Carcinoma de mama	5 días	DMEM con glutamax, FBS al 10 %
NCIN87	Carcinoma gástrico	7 días	RPMI 1640 con glutamax, FBS al 10 %

ADC	DAR	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) en:		
		BT474	NCI-N87	SKBR3
trastuzumab-40	1,68	>1	0,019	0,019
trastuzumab-23	1,71	>1	0,030	0,022

Prueba de *AntiCD79b-23*

10 La concentración y la viabilidad de las células de un matraz T75 sub-confluyente (80-90 % de confluencia) se miden mediante tinción con azul de tripano y se cuentan usando el contador de células automatizado LUNA-II™. Las células se diluyeron a $2 \times 10^5/\text{ml}$, se dispensaron (50 μl /pocillo) en placas de fondo plano de 96 pocillos.

15 Se preparó una solución madre (1 ml) de conjugado de fármaco de anticuerpo (ADC) (20 $\mu\text{g/ml}$) por dilución de ADC esterilizado por filtro en medio de cultivo celular. Se preparó un conjunto de diluciones 8x 10 veces de ADC de reserva en una placa de 24 pocillos mediante transferencia en serie de 100 μl a 900 μl de medio de cultivo celular. La dilución de ADC se dispensó (50 μl /pocillo) en 4 pocillos replicados de la placa de 96 pocillos, que contenía 50 μl de suspensión celular sembrada anteriormente. Los pocillos de control recibieron 50 μl de medio de cultivo celular. La placa de 96 pocillos que contenía células y ADC se incubó a 37 °C en una incubadora gaseada con CO₂ durante el tiempo de exposición.

20 Al final del periodo de incubación, la viabilidad celular se midió por ensayo MTS. Se dispensó MTS (Promega) (20 μl por pocillo) en cada pocillo y se incubó durante 4 horas a 37 °C en la incubadora gaseada con CO₂. La absorbancia del pocillo se midió a 490 nm. El porcentaje de supervivencia celular se calculó a partir de la absorbancia media en los 4 pocillos tratados con ADC en comparación con la absorbancia media en los 4 pocillos de control no tratados (100 %). Se determinó la CI_{50} a partir de los datos de dosis-respuesta usando GraphPad Prism usando el algoritmo de ajuste de curva no lineal: curva sigmoidea de dosis-respuesta con pendiente variable.

30 Los tiempos de incubación de ADC fueron de 4 días con WSUDLCL2 (linfoma no Hodgkiniano de células B) y SUDHL4 (linfocito B), 5 días para Granta519 (linfoma no Hodgkiniano de células B) y 6 días para BJAB (linfoma de Burkitt). WSUDLCL2 y SUDHL4 se cultivaron en RPMI 1640 con Glutamax + suero bovino fetal HyClone™ al 10 % (v/v), Granta519 en DMEM + Glutamax con suero bovino fetal HyClone™ al 10 % (v/v) y BJAB en RPMI 1640 + Glutamax con suero bovino fetal HyClone™ al 20 % (v/v).

ADC	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) en:			
	SUDHL4	WSUDLCL2	GRANTA519	BJAB
AntiCD79b-23	0,05387	0,9268	0,04957	0,003158

35

Ejemplo 6

Ratones

40 Los ratones inmunodeficientes combinados graves hembra (Fox Chase SCID®, C.B-17/*lcr-Prkdcscid*, Charles River) tenían diez semanas de edad con un intervalo de peso corporal (BW) de 16,2 a 21,9 gramos el día 1 del estudio. Se alimentó a los animales a demanda con agua (ósmosis inversa, 1 ppm Cl) y Lab Diet® Modificado con NIH 31 e Irradiado que consistió en 18,0 % de proteína bruta, 5,0 % de grasa bruta y 5,0 % de fibra bruta. Se alojó a los ratones sobre Lechos para Animales de Laboratorio Enrich-o'cobs™ irradiados en micro-aisladores estáticos en un ciclo de 12 horas de luz a 20-22 °C (68-72 °F) y 40-60 % de humedad. CR Discovery Services cumple específicamente con las recomendaciones de la *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* con respecto a las restricciones, el cruce, los procedimientos quirúrgicos, la alimentación y regulación de líquidos y los cuidados

45

veterinarios. El programa de cuidado y uso de animales en CR Discovery Services está acreditado por la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC), que garantiza el cumplimiento con normas aceptadas para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

5 Implantación y crecimiento tumoral *in vivo*

Los xenoinjertos se iniciaron con carcinomas de mama humanos BT474 mantenidos en CR Discovery Services mediante trasplante subcutáneo en serie en ratones SCID (véase anteriormente). El día del implante tumoral, cada ratón de prueba recibió un fragmento de BT474 de 1 mm³ implantado por vía subcutánea en el flanco derecho, y se monitorizó el crecimiento tumoral a medida que el tamaño promedio se acercaba al intervalo diana de 100 a 150 mm³. Treinta y tres días después de la implantación del tumor, designado como el día 1 del estudio, los animales se clasificaron en nueve grupos, cada uno de los cuales consistía en diez ratones con volúmenes tumorales individuales de 75 a 144 mm³ y volúmenes tumorales medios grupales de 111 a 112 mm³. Los tumores se midieron en dos dimensiones usando calibradores y el volumen se calculó usando la fórmula:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = 0,5 (w^2 \times l)$$

en donde w = ancho y l = longitud, en mm, del tumor. El peso del tumor puede estimarse suponiendo que 1 mg es equivalente a 1 mm³ del volumen tumoral.

Tratamiento 1

El tratamiento comenzó el día 1 en grupos de ratones ($n=10$) con tumores BT474 subcutáneos establecidos (75-196 mm³). Trastuzumab-23 se administró por vía intravenosa una vez el día 1 (qd x 1) en dos dosis (0,3 y 1 mg/kg). Un grupo tratado con vehículo sirvió como grupo de control para el análisis de efectividad. Los tumores se midieron dos veces por semana hasta que el estudio terminó el día 60. Cada ratón fue sacrificado cuando su tumor alcanzó el volumen final de 800 mm³ o en el último día, lo que ocurriera primero. Se calculó el tiempo hasta el punto final (TTE) para cada ratón.

El resultado del tratamiento se determinó a partir del porcentaje de retraso del crecimiento tumoral (% de TGD), definido como el aumento porcentual en la TTE mediana para ratones tratados frente a ratones control, con diferencias entre los grupos considerados estadísticamente significativos a $P \leq 0,05$ usando el análisis de supervivencia logrank. Los ratones fueron monitorizados por respuestas de regresión completa (CR) y regresión parcial (PR).

La tolerabilidad del tratamiento se evaluó mediante mediciones de peso corporal y observación frecuente de signos de efectos secundarios relacionados con el tratamiento. La tolerabilidad del tratamiento se evaluó mediante mediciones de peso corporal y observación frecuente de signos de efectos secundarios relacionados con el tratamiento. Todos los regímenes fueron tolerados aceptablemente.

La mediana de TTE para controles tratados con vehículo fue 44,4 días, estableciendo un TGD máximo posible de 15,6 días (35 %) para el estudio de 60 días. Los regímenes de ADC dieron como resultado el máximo TGD posible, produjeron un beneficio de supervivencia que fue estadísticamente significativamente diferente de los controles tratados con vehículo ($P < 0,01$) y no se pudo distinguir basándose en el análisis logrank ($P > 0,05$). Las diferencias dentro de los tratamientos de ADC solo fueron evidentes en la MTV en el último día y los números y tipos de respuestas de regresión producidas por cada régimen.

El trastuzumab-23 a 1 mg/kg produjo cuatro regresiones parciales (PR). Los resultados se ilustran en la Figura 1.

Tratamiento 2

El tratamiento comenzó el día 1 en grupos de ratones ($n= 9$ o 10) con tumores BT474 subcutáneos establecidos (108-196 mm³). Trastuzumab-40 se administró por vía intravenosa una vez el día 1 (qd x 1) en dos dosis (0,3 y 1 mg/kg). Un grupo tratado con vehículo sirvió como grupo de control para el análisis de efectividad. Los tumores se midieron dos veces por semana hasta que el estudio terminó el día 62. Cada ratón fue sacrificado cuando su tumor alcanzó el volumen final de 1000 mm³ o en el último día, lo que ocurriera primero. Se calculó el tiempo hasta el punto final (TTE) para cada ratón.

El resultado del tratamiento se determinó a partir del porcentaje de retraso del crecimiento tumoral (% de TGD), definido como el aumento porcentual en la TTE mediana para ratones tratados frente a ratones control, con diferencias entre los grupos considerados estadísticamente significativos a $P \leq 0,05$ usando el análisis de supervivencia logrank. Los ratones fueron monitorizados por respuestas de regresión completa (CR) y regresión parcial (PR).

La tolerabilidad del tratamiento se evaluó mediante mediciones de peso corporal y observación frecuente de signos de efectos secundarios relacionados con el tratamiento. La tolerabilidad del tratamiento se evaluó mediante

mediciones de peso corporal y observación frecuente de signos de efectos secundarios relacionados con el tratamiento.

5 Todos los regímenes fueron tolerados aceptablemente. La mediana de TTE para controles tratados con vehículo fue 52,9 días, estableciendo un TGD máximo posible de 9,1 días (17 %) para el estudio de 62 días. El tratamiento con ADC resultó en el máximo TGD posible, sin embargo, solo el tratamiento de 1 mg/kg produjo un beneficio de supervivencia que fue estadísticamente significativo diferente de los controles tratados con vehículo ($P < 0,001$).

10 Trastuzumab-40, a 1 mg/kg produjo cuatro regresiones parciales (PR) y una regresión completa (CR) que permaneció como un superviviente libre de tumor (TFS) al final del estudio. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 7

15 *Cultivo de células tumorales*

Se cultivaron células de linfoma de carcinoma gástrico humano NCI-N87 en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10 %, glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina y 25 µg/ml de gentamicina. Las células se cultivaron en matraces de cultivo de tejidos en una incubadora humidificada a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % de aire.

Implantación in vivo y crecimiento tumoral

25 Las células NCI-N87 utilizadas para la implantación se cosecharon durante el crecimiento de la fase logarítmica y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 50 % de Matrigel™ (BD Biosciences). El día del implante del tumor, cada ratón de prueba (ratones SCID como en el Ejemplo 6) se inyectó por vía subcutánea en el flanco derecho con 1×10^7 células (0,1 ml de suspensión celular) y se controló el crecimiento tumoral a medida que el tamaño promedio se acercaba al intervalo diana de 100 a 150 mm³. Once días después, designado como el día 1 del estudio, los ratones se clasificaron según el tamaño del tumor calculado en once grupos, cada uno de los cuales consistía en diez animales con volúmenes de tumores individuales que variaban de 88 a 144 mm³ y volúmenes tumorales medios grupales de 119-121 mm³. Los tumores se midieron en dos dimensiones usando calibradores y el volumen se calculó usando la fórmula:

$$35 \text{ Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = 0,5 (w^2 \times l)$$

en donde w = ancho y l = longitud, en mm, del tumor. El peso del tumor puede estimarse suponiendo que 1 mg es equivalente a 1 mm³ del volumen tumoral.

40 *Tratamiento 1*

El tratamiento comenzó el día 1 en grupos de ratones ($n=10$) con tumores NCI-N87 subcutáneos establecidos (88-144 mm³). Trastuzumab-23 se administró por vía intravenosa una vez el día 1 (qd x 1) en dos dosis (0,3 y 1 mg/kg). Un grupo tratado con vehículo sirvió como grupo de control para el análisis de efectividad. Los tumores se midieron dos veces por semana hasta que el estudio terminó el día 81. Cada ratón fue sacrificado cuando su tumor alcanzó el volumen final de 800 mm³ o en el último día, lo que ocurriera primero. Se calculó el tiempo hasta el punto final (TTE) para cada ratón.

50 El resultado del tratamiento se determinó a partir del porcentaje de retraso del crecimiento tumoral (% de TGD), definido como el aumento porcentual en la TTE mediana para ratones tratados frente a ratones control, con diferencias entre los grupos considerados estadísticamente significativos a $P \leq 0,05$ usando el análisis de supervivencia logrank. Los ratones fueron monitorizados por respuestas de regresión completa (CR) y regresión parcial (PR).

55 La tolerabilidad del tratamiento se evaluó mediante mediciones de peso corporal y observación frecuente de signos de efectos secundarios relacionados con el tratamiento. La tolerabilidad del tratamiento se evaluó mediante mediciones de peso corporal y observación frecuente de signos de efectos secundarios relacionados con el tratamiento. Todos los regímenes fueron tolerados aceptablemente.

60 La mediana de TTE para controles tratados con vehículo fue 53,4 días, estableciendo un TGD máximo posible de 27,6 días (52 %) para el estudio de 81 días. Trastuzumab-23 probado a 1 mg/kg produjo un beneficio de supervivencia que fue estadísticamente significativo diferente de los controles tratados con vehículo ($P < 0,001$) y resultó en el máximo TGD posible. A 0,3 mg/kg, la mediana de TTE fue de 80,5 días, que corresponde a TGD de 27,1 días (51 %).

65 Trastuzumab-23, a 1 mg/kg produjo una regresión parcial (PR). Los resultados se ilustran en la Figura 3.

Tratamiento 2

El tratamiento comenzó el día 1 en grupos de ratones (n=10) con tumores NCI-N87 subcutáneos establecidos (75-126 mm³). Trastuzumab-40 se administró por vía intravenosa una vez el día 1 (qd x 1) en dos dosis (0,3 y 1 mg/kg).
 5 Un grupo tratado con vehículo sirvió como grupo de control para el análisis de efectividad. Los tumores se midieron dos veces por semana hasta que el estudio terminó el día 83. Cada ratón fue sacrificado cuando su tumor alcanzó el volumen final de 800 mm³ o en el último día, lo que ocurriera primero. Se calculó el tiempo hasta el punto final (TTE) para cada ratón.

10 El resultado del tratamiento se determinó a partir del porcentaje de retraso del crecimiento tumoral (% de TGD), definido como el aumento porcentual en la TTE mediana para ratones tratados frente a ratones control, con diferencias entre los grupos considerados estadísticamente significativos a $P \leq 0,05$ usando el análisis de supervivencia logrank. Los ratones fueron monitorizados por respuestas de regresión completa (CR) y regresión parcial (PR). La tolerabilidad del tratamiento se evaluó mediante mediciones de peso corporal y observación frecuente de signos de efectos secundarios relacionados con el tratamiento. La tolerabilidad del tratamiento se evaluó mediante mediciones de peso corporal y observación frecuente de signos de efectos secundarios relacionados con el tratamiento. Todos los regímenes fueron tolerados aceptablemente.

20 La mediana de TTE para controles tratados con vehículo fue 44,9 días, estableciendo un TGD máximo posible de 38,1 días (85 %) para el estudio de 83 días. Trastuzumab-40 (0,3 mg/kg) tuvo una mediana de TTE de 54,2 días correspondiente a un TGD de 9,3 días (21 %). Trastuzumab-40 (1 mg/kg) tuvo una mediana de TTE de 61,6 días correspondiente a un TGD de 16,7 días (37 %).

Los resultados se ilustran en la Figura 4.

25

Ejemplo 8 - Estudios de toxicidad/índice terapéutico**Estudio de ratas:**

30 Se usó un estudio de toxicidad de dosis única para determinar la dosis máxima tolerada (MTD) y el perfil de seguridad de Trastuzumab-23. Las ratas macho Sprague Dawley (Harlan, Inc) se dosificaron una vez por inyección intravenosa de bolo lento a través de la vena de la cola con control vehículo (histidina-HCl 25 mM, 7 % de sacarosa, 0,02 % de polisorbato 80, pH 6,0) o material de prueba (Trastuzumab-23). Los parámetros evaluados durante el estudio incluyeron mortalidad, exámenes físicos, observaciones en la jaula, pesos corporales, cambios en el peso corporal, patología clínica (química clínica, hematología y coagulación) y hallazgos de patología macroscópica.
 35 Todos los animales fueron sacrificados el día del estudio (SD) 29.

Grupo	Tratamiento	Vía de dosis	Dosis (mg/kg)	Frecuencia	Ratas macho
					Estudio principal
					N
1	Control	IV	0	Una vez	5
7	Trastuzumab-23	IV	3	Una vez	5
8	Trastuzumab-23	IV	4	Una vez	5
9	Trastuzumab-23	IV	5	Una vez	5
10	Trastuzumab-23	IV	6	Una vez	5
13	Trastuzumab-23	IV	7	Una vez	5

Control = histidina-HCl 25 mM, 7 % de sacarosa, 0,02 % de polisorbato 80, pH 6,0

40 La tolerabilidad se determinó en función de los puntos finales de toxicidad, incluyendo pérdida de peso corporal (> 10 %) y supresión de médula ósea. Basado en descubrimientos adversos mínimos a la dosis alta, la dosis máxima tolerada (MTD) en la rata después de una dosis única de Trastuzumab-23 se determinó ser >7 mg/kg, que fue el nivel de dosis más alto evaluado.

Índice terapéutico

45

El índice terapéutico puede calcularse dividiendo la dosis única tolerada máxima (MTD) de ADC no dirigido en ratas, por la dosis única eficaz mínima (MED) del ADC diana. El MED es la dosis única necesaria para lograr la estasis tumoral en un modelo *in vivo* a los 28 días (para xenoinjerto NCI-N87).

De esta manera para los conjugados del compuesto 23, el índice terapéutico es la MTD de más de 7 mg/kg dividido por el MED que es menos de 1 mg/kg (véase la Figura 3 a los 28 días), dando un índice terapéutico de más de 7.

Estudio del macaco cangrejero:

5 Se realizó un estudio de toxicidad de dosis única en monos macacos cangrejeros machos (*Macaca fascicularis*) de origen camboyano después de una inyección intravenosa (IV) en bolo de ADC-SG3400. El estudio se llevó a cabo en 2 fases. En la fase 1, los animales (n = 1) fueron tratados a niveles de dosis de 1, 3 o 6 mg/kg para determinar el nivel de dosis óptimo para explorar en la fase 2. Los animales fueron dosificados por inyección intravenosa de bolo
10 lento a través de la vena safena con control vehículo (histidina 25 mM, Sacarosa 200 mM, pH 6,0) o material de prueba (Trastuzumab-23). Basándose en observaciones de pérdida de peso corporal significativa a 6 mg/kg, Se eligió un nivel de dosis de 4,5 mg/kg para la fase 2 del estudio. En la fase 2, A los animales (n = 3) se les administró una dosis única de 4,5 mg/kg de Trastuzumab-23 el día 1 y se les realizó una autopsia los días 71 o 72.

Grupo	Tratamiento	Vía de dosis	Dosis (mg/kg)	Frecuencia	Macaco macho
					Estudio principal
					N
1	Trastuzumab-23	IV	1	Una vez	1
2	Trastuzumab-23	IV	3	Una vez	1
3	Trastuzumab-23	IV	6	Una vez	1
4	Trastuzumab-23	IV	4,5	Una vez	3

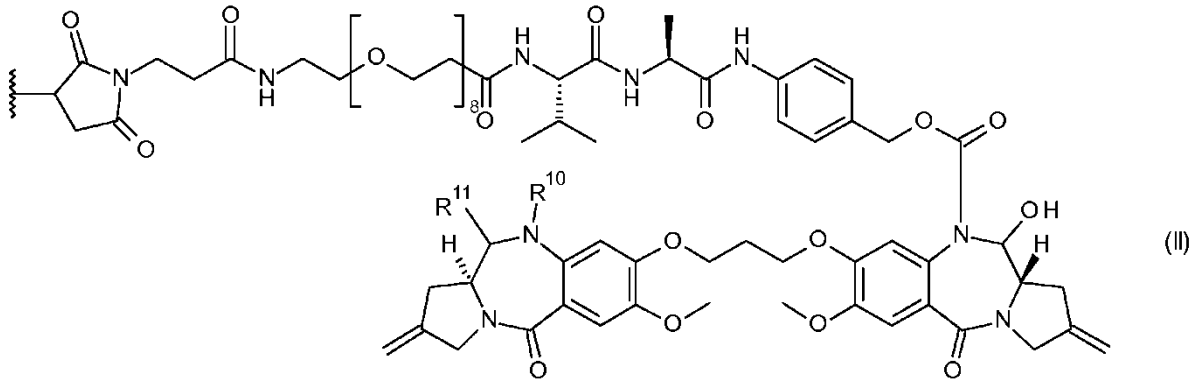
15 La tolerabilidad se determinó en función de los puntos finales de toxicidad, incluyendo pérdida de peso corporal (> 10 %) y supresión de médula ósea. No hubo mortalidad no programada en ningún animal administrado con Trastuzumab-23. Los principales descubrimientos fueron la pérdida de peso corporal y la supresión de la médula ósea a la dosis más alta probada de 6 mg/kg. Basándose en estos datos, y los signos mínimos de toxicidad en la
20 siguiente dosis más baja, la MTD de Trastuzumab-23 en cynos fue de 4,5 mg/kg.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de fórmula I:

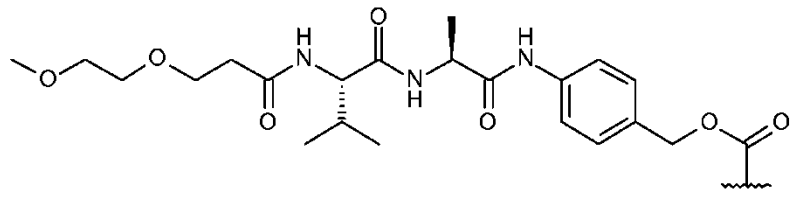


en la que L es una unidad de ligando, D es una unidad de Ligando de Fármaco de fórmula II:



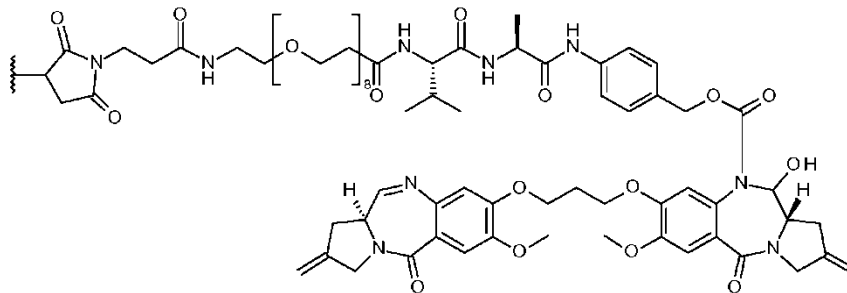
10 en la que
bien:

- 15 (a) R¹⁰ y R¹¹ forman un doble enlace nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y de carbono a los que están unidos; o
(b) R¹⁰ es OH y R¹¹ es:

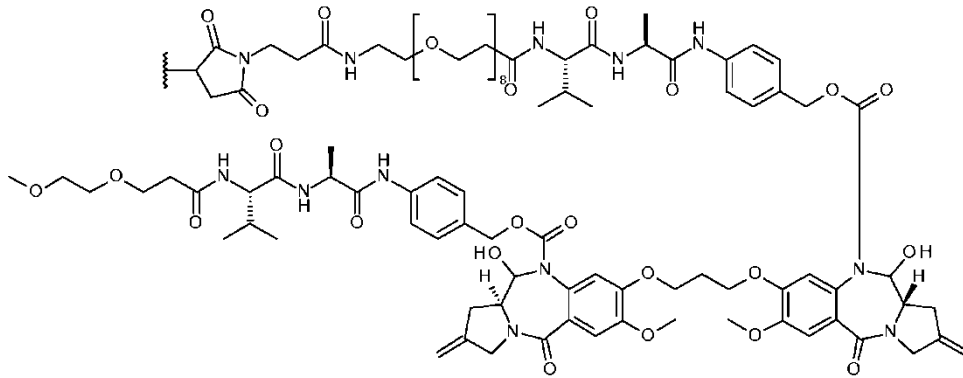


20 p es un número entero de 1 a 20.

2. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que D^L es D^L-A:



25 3. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que D^L es D^L-B:



4. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la Unidad de Ligando es un anticuerpo o un fragmento activo del mismo.

5. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo son un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo para un antígeno asociado a tumor, o en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo son un anticuerpo que se une a uno o más antígenos asociados a tumor o receptores de superficie celular seleccionados de (1)-(88):

- (1) BMPR1B;
- (2) E16;
- (3) STEAP1;
- (4) 0772P;
- (5) MPF;
- (6) Napi3b;
- (7) Sema 5b;
- (8) PSCA hlg;
- (9) ETBR;
- (10) MSG783;
- (11) STEAP2;
- (12) TrpM4;
- (13) CRIPTO;
- (14) CD21;
- (15) CD79b;
- (16) FcRH2;
- (17) HER2;
- (18) NCA;
- (19) MDP;
- (20) IL20R-alfa;
- (21) Brevicán;
- (22) EphB2R;
- (23) ASLG659;
- (24) PSCA;
- (25) GEDA;
- (26) BAFF-R;
- (27) CD22;
- (28) CD79a;
- (29) CXCR5;
- (30) HLA-DOB;
- (31) P2X5;
- (32) CD72;
- (33) LY64;
- (34) FcRH1;
- (35) IRTA2;
- (36) TENB2;
- (37) PSMA - FOLH1;
- (38) SST;
- (38.1) SSTR2;
- (38.2) SSTR5;
- (38.3) SSTR1;
- (38.4) SSTR3;
- (38.5) SSTR4;

- 5 (39) ITGAV;
 (40) ITGB6;
 (41) CEACAM5;
 (42) MET;
 (43) MUC1;
 (44) CA9;
 (45) EGFRVIII;
 (46) CD33;
 (47) CD19;
 10 (48) IL2RA;
 (49) AXL;
 (50) CD30 - TNFRSF8;
 (51) BCMA - TNFRSF17;
 (52) Ag CT - CTA;
 15 (53) CD174 (Lewis Y) - FUT3;
 (54) CLEC14A;
 (55) GRP78 - HSPA5;
 (56) CD70;
 (57) Antígenos específicos de células madre;
 20 (58) ASG-5;
 (59) ENPP3;
 (60) PRR4;
 (61) GCC - GUCY2C;
 (62) Liv-1 - SLC39A6;
 25 (63) 5T4;
 (64) CD56 - NCMA1;
 (65) CanAg;
 (66) FOLR1;
 (67) GPNMB;
 30 (68) TIM-1 - HAVCR1;
 (69) RG-1/Mindina dirigida a tumor de próstata - Mindina/RG-1;
 (70) B7-H4 - VTCN1;
 (71) PTK7;
 (72) CD37;
 35 (73) CD138 - SDC1;
 (74) CD74;
 (75) Claudinas - CL;
 (76) EGFR;
 (77) Her3;
 40 (78) RON - MST1R;
 (79) EPHA2;
 (80) CD20 - MS4A1;
 (81) Tenascina C - TNC;
 (82) FAP;
 45 (83) DKK-1;
 (84) CD52;
 (85) CS1 - SLAMF7;
 (86) Endoglina - ENG;
 (87) Anexina A1 - ANXA1;
 50 (88) V-CAM (CD106) - VCAM1.

6. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5 en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo son un anticuerpo modificado con cisteína.

55 7. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que p es un número entero de 1 a 8.

8. Una composición que comprende una mezcla de conjugados de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el p promedio en la mezcla de compuestos conjugados es de aproximadamente 1 a aproximadamente 8.

9. El conjugado de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en terapia.

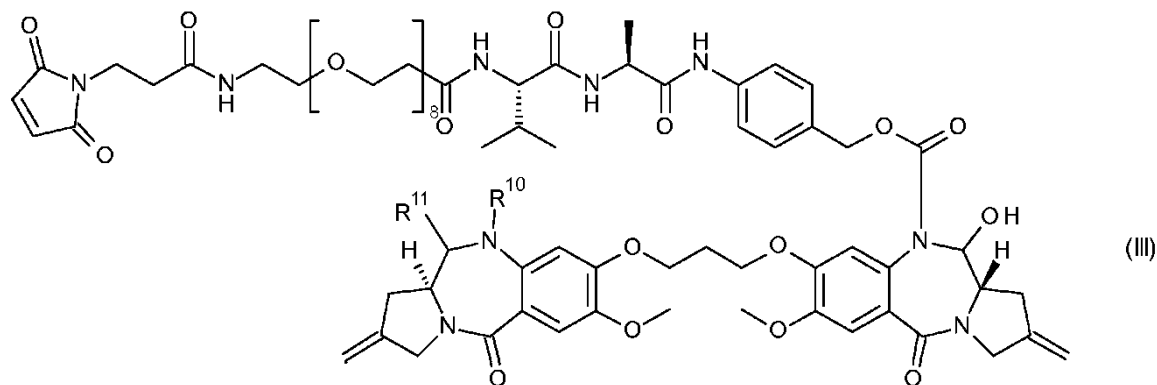
65 10. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

11. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa en un sujeto.

12. El conjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la enfermedad tratada es cáncer.

13. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la composición de acuerdo con la reivindicación 8 en combinación con un agente quimioterapéutico para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa en un sujeto.

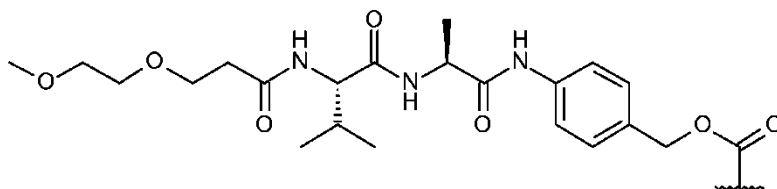
14. Un compuesto de fórmula III:



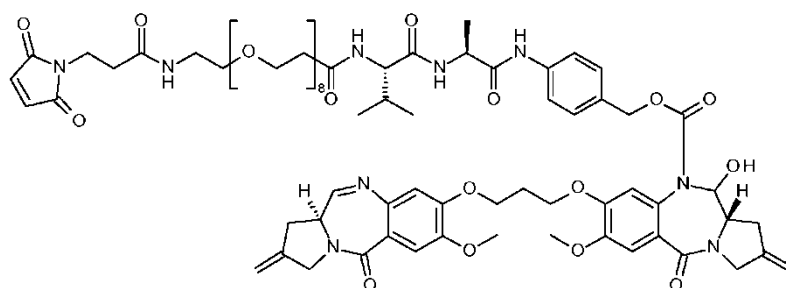
en la que bien:

(a) R^{10} y R^{11} forman un doble enlace nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y de carbono a los que están unidos; o

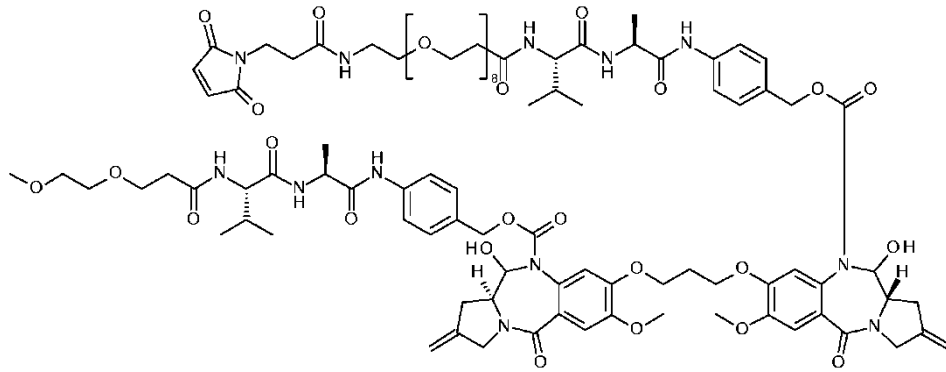
(b) R^{10} es OH y R^{11} es:



15. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 14 que es A:



16. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 14 que es B:



17. Un método de síntesis de un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende la etapa de conjugar un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 con un agente de unión celular.

5

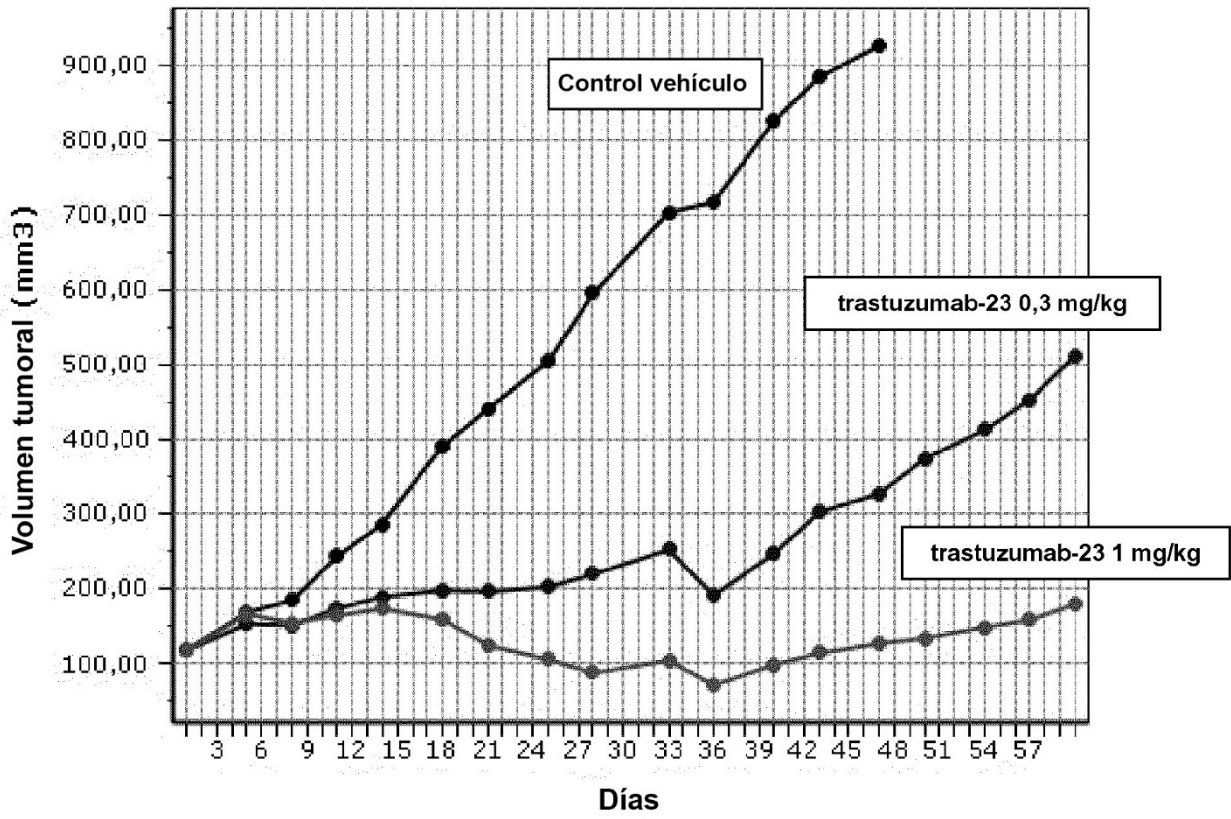


Fig. 1

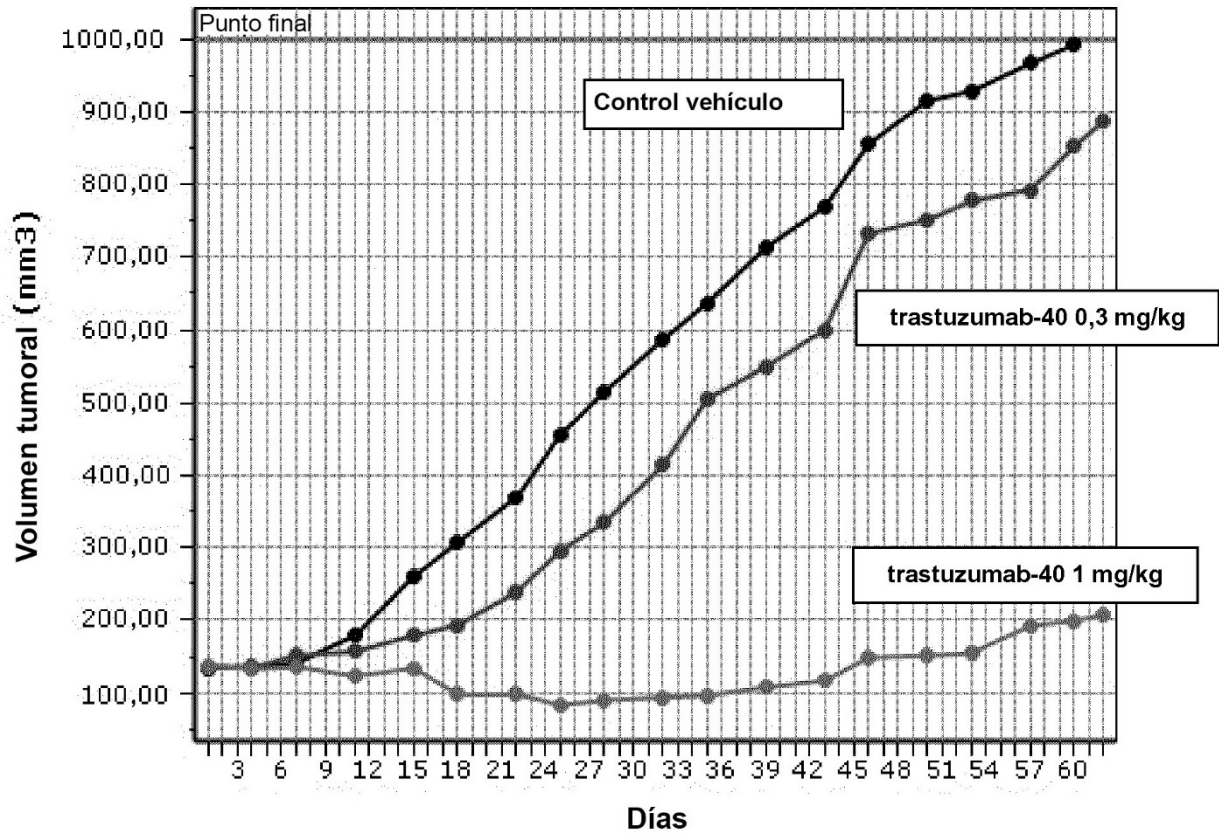


Fig. 2

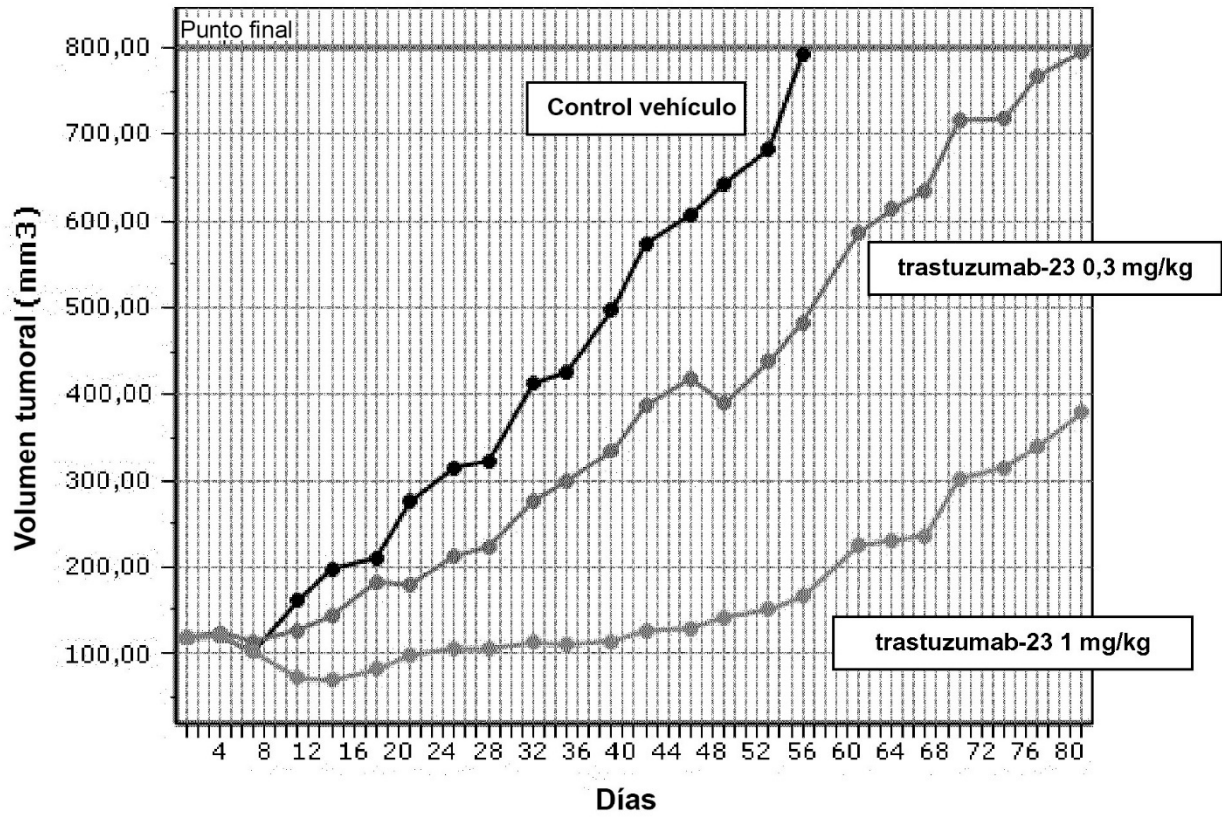


Fig. 3

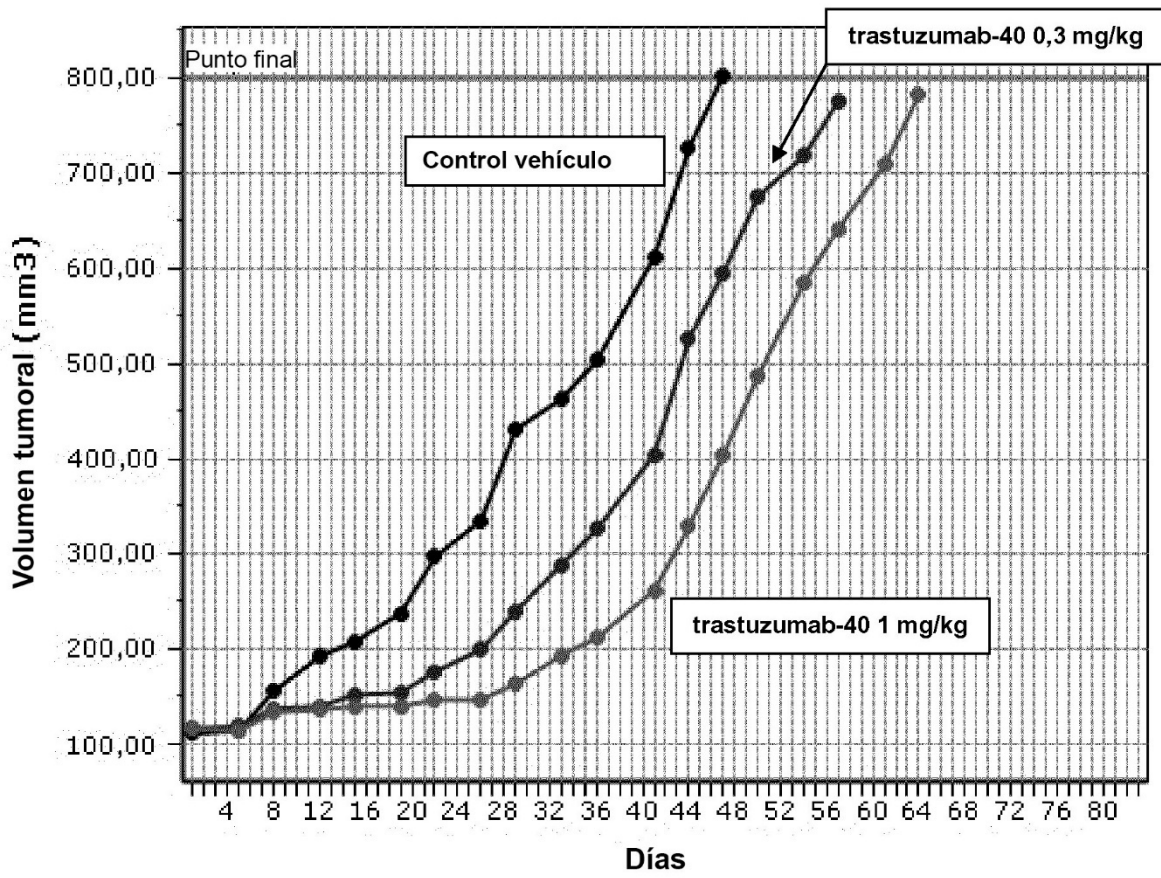


Fig. 4