



No. 06-002587- -00016-0000

Fecha: 2012-05-30 16:24:59 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 147

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
MODIFICACIONES Y/O CORRECCIONES

1. Identificación del Tramite

- ☐ Error material
- ☒ Modificación a una Solicitud en trámite
- ☒ Patente de Invención
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad
- ☐ Registro de Diseño Industrial
- ☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

IMMUNOGEN, INC.

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Estados Unidos de America	830 Winter Street, 02451-1477	Waltham, Massachusetts
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

RUBIO CAMACHO HUMBERTO 17'192.062 50.007 C.S.J.
Apellidos y Nombre Documento de identificación Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Ciudad	
Carrera 7 # 74-64 Oficina 506	Bogotá, D.C.	
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
mail@rubiolawyers.com	3131647	3132408

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general. REPOSA EN EL EXPEDIENTE No. 06-046036

4. Datos del trámite

Modificación:

Expediente No 06-002.587

Aparece

Debe ser

Tipo de Modificación:

☒ Modificación al capítulo reivindicatorio.

Folios 119 - 122

☒ Modificación al capítulo descriptivo.

Folios 4 - 118 y

☐ Modificación al resumen.

☐ Modificación a los dibujos.

☐ Modificación al solicitante.

☒ Modificación al listado de secuencias.

Folios 123 - 147.

5. Anexos

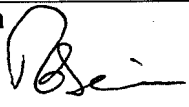
☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación. Recibo No. 12-0054382 de 30/05/2012.

☐ Poder, si fuere el caso.

☒ Documento que contiene las modificaciones o correcciones.

☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

6. Firma

	
	HUMBERTO RUBIO CAMACHO
Firma	Nombre y apellidos
50.007 C.S.J.	17'192.062
Tarjeta Profesional	C.C

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0054382

Bogotá D.C., Mayo 30 de 2012 - 12:18:52

RECIBIDO DE : HUMBERTO RUBIO

NI 830.000.228

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	446260345	30/05/2012	435.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES EN CREACION CORRECCION A SOLICITUD EN TRAMITE / MODIFICA	120.000.00	120.000.00
				\$120.000.00

SON: **CIENTO VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-002587- -00016-0000

Fecha: 2012-05-30 16:24:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 147

MODIFICACION

**PATENTE: UN CONJUGADO CITOTOXICO CA6 ANTIGENO-
ESPECIFICO Y METODOS PARA UTILIZAR EL MISMO
CLASES: 11 INTERNACIONAL**

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 30 de 2012 - 12:18:52

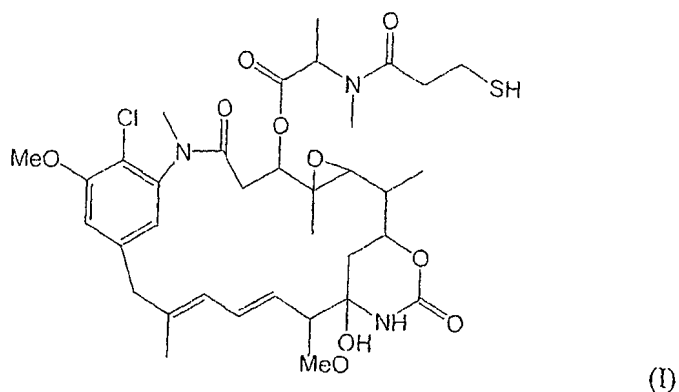
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo no-murino aislado o fragmento de enlace a epitopo del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada (HCRV) idéntica a una secuencia de amino ácidos de HCVR representada por la ID SEC NO.: 10 o a una secuencia de amino ácidos de HCVR representada por la ID SEC NO.: 11; una región variable de cadena ligera (LCVR) idéntica a una secuencia de amino ácidos de LCVR representada por la ID SEC NO.: 8; donde dicho anticuerpo o fragmento de enlace a epitopo del mismo se unen específicamente al antígeno.
2. Un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo o un fragmento de enlace a epitopo del mismo de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de polinucleótidos representada por las ID SEC Nos.: 10 u 11 y 8.
3. Un vector aislado que comprende el polinucleótido de la reivindicación 2.
4. El vector aislado de la reivindicación 3, caracterizado porque dicho vector es un vector de expresión que expresa dicho anticuerpo o fragmento de enlace a epitopo del mismo.
5. Un conjugado citotóxico que comprende, el anticuerpo aislado o fragmento de enlace a epitopo del mismo de la reivindicación 1 y un agente citotóxico seleccionado del grupo que consiste de un compuesto de maitansinoide, un compuesto de taxoide, un compuesto CC-1065, un compuesto de dolastatina, un compuesto de daunorrubicina, y un compuesto de doxorubicina.
6. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque dicho anticuerpo aislado o fragmento de enlace a epitopo del mismo y dicho agente citotóxico se enlazan covalentemente (a), o (b) donde el anticuerpo aislado o fragmento de enlace a epitopo del mismo y dicho agente citotóxico se enlazan covalentemente a través de un grupo de enlace PEG o (c) donde dicho anticuerpo aislado o fragmento de enlace a epitopo del mismo y dicho agente citotóxico se enlazan covalentemente a través de un grupo tiol o disulfuro de dicho agente citotóxico.
7. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque dicho fragmento de anticuerpo es seleccionado a partir de un grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fd, un fragmento Fvs (scFv) de cadena simple, un anticuerpo de cadena simple, un fragmento Fvs (sdFv) enlazado

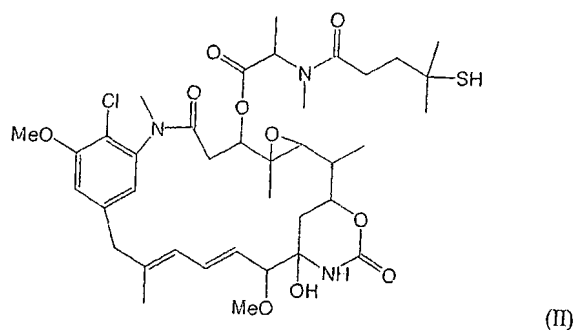
4
719

con disulfuro y un fragmento que comprende un dominio VL o VH.

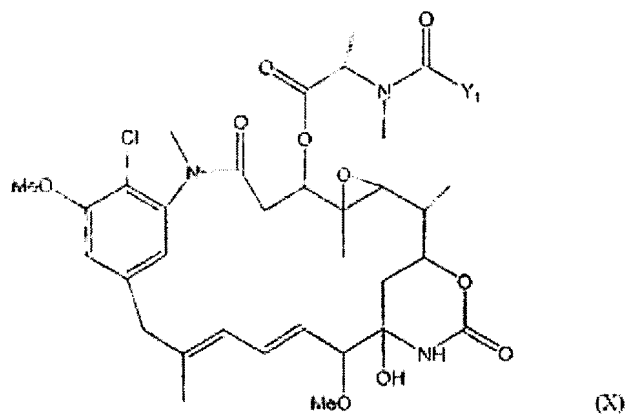
8. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque dicho agente citotóxico es la maitansina DM1 de la fórmula (I):



o porque dicho agente citotóxico es la maitansina DM4 de la fórmula (II):



9. El conjugado citotóxico de la reivindicación 5 ó 6, caracterizado porque el agente
citotóxico es una maitansina de la fórmula (X):



donde:

Y_1 representa $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2S-$,

donde:

R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que
tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3

5-120

hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, radical heterocíclico o aromático heterocíclico, y en adición R_2 ; puede ser H;

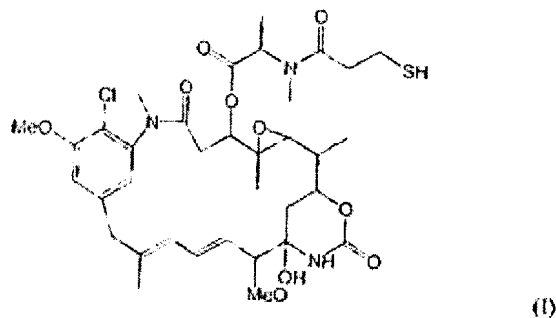
R_3, R_4, R_5, R_6, R_7 y R_8 es cada una independiente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, radical heterocíclico o aromático heterocíclico;

l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0; y

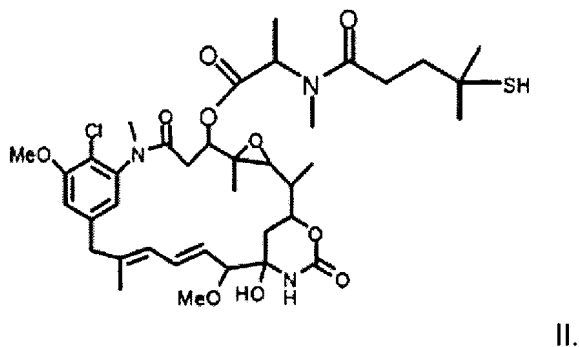
May representa un maitansinol que tiene la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo o C-20 desmetilo.

10. El conjugado citotóxico de la reivindicación 9, caracterizado porque (a) R_1 es H, R_2 es metilo, R_5, R_6, R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0, o porque (b) R_1 y R_2 son metilo; R_5, R_6, R_7 y R_8 son cada uno H; l y m son cada uno 1, y n es 0.

11. El conjugado citotóxico de la reivindicación 9, caracterizado porque dicho agente citotóxico es DM1 de fórmula:



o porque dicho agente citotóxico es la maitansina DM4 de fórmula II:



12. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado citotóxico de las reivindicaciones 5 a 11, donde dicha composición farmacéutica comprende un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

13. Un kit que comprende el conjugado citotóxico aislado de las reivindicaciones 5 a 11

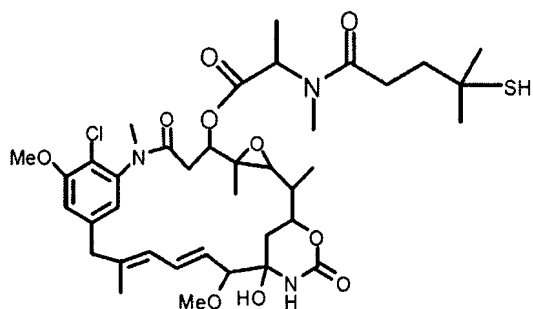
8 12P

o la composición farmacéutica de la reivindicación 12; donde el kit además comprende:

- a) un compartimento que comprende el conjugado citotóxico o la composición; e
- b) instrucciones para usar el kit.

14. El kit de la reivindicación 13, caracterizado porque el conjugado citotóxico comprende una versión de superficie modificada humanizada del anticuerpo murino DS6 o un fragmento de enlace a epitopo del mismo y DM1 o DM4 como el agente citotóxico.

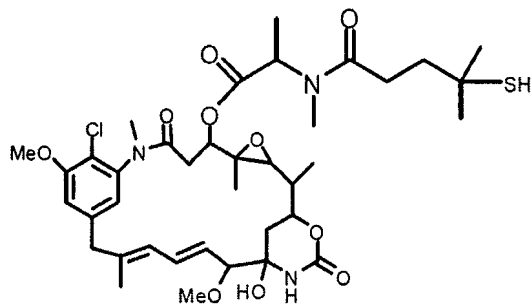
15. El conjugado citotóxico de la reivindicación 5, caracterizado porque dicho anticuerpo aislado o fragmento de enlace a epitopo del mismo y dicho agente citotóxico están enlazados covalentemente a través de un enlazador *N*-succinimidil 4-(2-piridilditio) butanoato (SPDB), donde dicho agente citotóxico es la maitansina DM4 de fórmula (II):



(II)

donde 1-10 moléculas de DM4 de maitansina están enlazadas a dicho anticuerpo aislado o fragmento de enlace a epitopo del mismo.

16. El conjugado citotóxico de la reivindicación 5, caracterizado porque dicho anticuerpo aislado o fragmento de enlace a epitopo del mismo y dicho agente citotóxico están enlazados covalentemente a través de un enlazador *N*-succinimidil 4-(2-piridilditio) butanoato (SPDB), donde dicho agente citotóxico es la maitansina DM4 de fórmula (II):



(II).

UN CONJUGADO CITOTÓXICO CA6 ANTÍGENO-ESPECÍFICO Y
MÉTODOS PARA UTILIZAR EL MISMO

SOLICITUDES RELACIONADAS

5

La presente solicitud reclama el beneficio de la solicitud Provisional de los Estados Unidos de Norteamérica Número 60/448,447, presentada el 21 de julio de 2003.

10

CAMPO DE LA INVENCION

15

La presente invención está dirigida a un anticuerpo monoclonal de glicótopo anti-CA6 de murino, y versiones humanizadas o de doble superficie del mismo. La presente invención también está dirigida a un fragmento de enlace de epítotope del anticuerpo monoclonal de glicótopo anti-CA6, así como fragmentos de enlace de epítotope de versiones humanizadas o de doble superficie del anticuerpo monoclonal de glicótopo anti-CA6.

20

La presente invención está dirigida además a conjugados citotóxicos que comprenden un agente de enlace celular y un agente citotóxico, composiciones terapéuticas que comprenden el conjugado, métodos para utilizar los conjugados en la inhibición del crecimiento celular y el tratamiento de enfermedad, y un equipo que comprende el conjugado citotóxico. En particular, el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal, o fragmento de enlace de epítotope del mismo, que reconoce y enlaza el glicótopo CA6 o una versión humanizada o de doble superficie del mismo.

25

2 A

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se han efectuado numerosos intentos por desarrollar agentes terapéuticos anti-cancerígenos que destruyan de manera específica células cancerígenas objetivo sin dañar células y tejidos no cancerígenos circundantes. Dichos agentes terapéuticos tienen el potencial para mejorar enormemente el tratamiento del cáncer en pacientes humanos.

Un enfoque promisorio ha sido enlazar agentes de enlace celular, tales como anticuerpos monoclonales, con fármacos citotóxicos (Sela et al, en Immunoconjugates 19-89-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghose et al en Targeted Drugs 1-22 (E. Golberg, ed. 1983); Diener et al, en Anticuerpo mediated delivery systems 1-23 (J. Rodwell, ed. 1988); Pieterz et al, en Anticuerpo mediated delivery systems 25-53 (J. Rodwell, ed. 1988); Bemol et al, en Anticuerpo mediated delivery systems 55-79 (J. Rodwell, ed. 1988). Dependiendo de la selección del agente de enlace celular, esos conjugados citotóxicos pueden ser designados para reconocer y enlazarse solamente a tipos específicos de células cancerosas, en base al perfil de expresión de moléculas expresadas en la superficie de dichas células.

Los fármacos citotóxicos tales como metotrexato, daunorubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalano, mitomicina C, y clorambucilo se han utilizado en dichos conjugados citotóxicos, enlazados a una variedad de anticuerpos monoclonales de murino. En algunos casos, las moléculas de fármaco fueron enlazadas a las moléculas de anticuerpo a través

de una molécula portadora intermediaria tal como albúmina del suero (Garnett et al, 46 *Cáncer Res.* 2407-2412(1986); Ohkawa et al 23 *Cáncer Immunol. Immuno ther.* 81-86(1986); Endo et al, 47 *Cáncer Res.*1076-1080 (1980)), dextran (Hurwitz et al, 2 *Appl. Biochem.* 25-35(1980); Manabi et al, 34 *Biochem. Pharmacol.* 289-291 (1985); Dillman et al, 46 *Cáncer Res.*4886-4891(1986); Shoval et al, 85 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 8276-8280 (1988)), o polyglutamic acids (Tsukada et al, 73 *J. Natl. Cane. Inst.* 721-729 (1984); Kato et al 27 *J. Med. Chem.* 1602-1607(1984); Tsukada et al, 52 *Br. J. Cáncer*111-116 (1985)).

Como un ejemplo de un conjugado específico que ha brindado alguna promesa, está el conjugado del anticuerpo C242, dirigido contra CanAg, un antígeno expresado en tumores colorectales y pancreáticos, y el derivado de maitansina DM1 (Liu et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 8618-8623 (1996)). La evaluación in vitro de este conjugado indicó que su afinidad de enlace hacia CanAg expresado en la superficie celular fue elevada con un valor K_d aparente de 3×10^{-11} M, y su potencia de citotoxicidad para células CanAg-positivas fue elevada con un IC_{50} de 6×10^{-11} . Esta citotoxicidad fue dependiente del antígeno ya que fue bloqueada por un exceso de anticuerpo no conjugado, y ya que las células antígeno negativas fueron más de 100 veces menos sensibles al conjugado. Otros ejemplos de conjugados de anticuerpo-DM1 con alta afinidad hacia células objetivo respectivas y alta citotoxicidad antígeno-selectiva incluyen aquellas de huN901, una versión humanizada del anticuerpo contra CD33 humano; huC242, una versión humanizada de anticuerpo contra el epítipo CanAgMuc1; huJ591, un anticuerpo

deshumanizado contra PSMA; trastuzumab, un anticuerpo humanizado contra Her2/neu; y bivatuzumab, un anticuerpo humanizado contra CD44v6.

El desarrollo de los conjugados citotóxicos adicionales que reconocen específicamente tipos particulares de células cancerosas será importante en el mejoramiento continuo de los métodos utilizados para tratar pacientes con cáncer.

Para ese fin, la presente invención está dirigida al desarrollo de anticuerpos que reconocen y enlazan moléculas/receptores expresados en la superficie de las células cancerosas, y para el desarrollo de conjugados citotóxicos novedosos que comprenden agentes de enlace celular, tales como anticuerpos, y agentes citotóxicos que se dirigen de manera específica a las moléculas/receptores expresados en la superficie de células cancerosas.

En forma más específica, la presente invención está dirigida a la caracterización de un sialoglicótopo CA6 en el receptor de mucina Muc1 y que puede utilizarse para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glicótopo CA6 en el contexto de un agente citotóxico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención incluye anticuerpos que reconocen y se enlazan específicamente a un sialoglicótopo CA6 novedoso del receptor de mucina Muc1, o un fragmento de enlace de epítipo del mismo. En otra modalidad, la presente invención incluye un

anticuerpo humanizado, o un fragmento de enlace de epítopo del mismo, que reconoce el sialoglicótopo CA6 novedoso ("el glicótopo CA6") del receptor de mucina Muc1.

En las modalidades preferidas, la presente invención incluye el anticuerpo monoclonal anti-CA6 de murino DS6 ("el anticuerpo DS6"), versiones de doble superficie o humanizadas del anticuerpo DS6 en donde los residuos expuestos a superficie del anticuerpo, o su fragmento de enlace de epítopes, son reemplazados en las cadenas ligeras como pesadas para asemejarse de manera más estrecha a las superficies de anticuerpo humano conocido. Los anticuerpos humanizados y fragmentos de enlace de epítopes de los mismos de la presente invención tiene propiedades mejoradas ya que son mucho menos inmunogénicos (o completamente no-inmunogénicos) en humanos a los cuales fueron administrados que las versiones completamente de murino. Por lo tanto, los anticuerpos DS6 humanizados y los fragmentos de enlace de epítopes de los mismos de la presente invención reconocen de manera específica un sialoglicótopo novedoso en el receptor de mucina Muc1, es decir, el glicótopo CA6, en tanto que no son inmunogénicos para un humano. Los anticuerpos humanizados y fragmentos de enlace de epítopes de los mismos pueden ser conjugados para un fármaco, tal como un maitansinoide, para formar un profármaco que tiene citotoxicidad específica hacia células que expresan antígeno mediante señalamiento del fármaco para el sialoglicótopo Muc1 CA6. Los conjugados citotóxicos que comprenden dichos anticuerpos y pocos fármacos altamente tóxicos (por ejemplo, maitansinoides, taxanos, y análogos CC-1065) pueden ser utilizados por lo tanto como un terapéutico para

el tratamiento de tumores, tales como tumores de seno y ovarios.

Las versiones humanizadas del anticuerpo DS6 de la presente invención están completamente caracterizadas en la presente con respecto a sus secuencias de amino ácido respectivas de las regiones variables de cadena ligera y pesada, la identificación de los CDRs, la identificación de sus aminoácidos de superficie, y la descripción de un medio para su expresión en forma recombinante.

En una modalidad, se proporciona un anticuerpo DS6 humanizado o un fragmento de enlace de epítipo del mismo que tiene una cadena pesada que incluye CDRs que tienen secuencias de amino ácido representadas por ID SEC NOS: 1-3:

S Y N M H (ID SEC NO: 1),

Y I Y P G N G A T N Y N Q K F K G (ID SEC NO: 2),

G D S V P F A Y (ID SEC NO: 3),

Y que tiene una cadena ligera que comprende CDRs que tienen secuencias de amino ácido representadas por ID SEC NOS: 4-6:

S A H S S V S F M H (ID SEC NO: 4),

S T S S L A S (ID SEC NO: 5),

Q Q R S S F P L T (ID SEC NO: 6),

Se proporcionan también anticuerpos DS6 humanizados y fragmentos de enlace de epítipo de los mismos que tienen una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comparte por lo menos el 90% de la identidad de secuencia con una secuencia de amino ácido representada por ID SEC NO: 7 o ID SEC NO: 8 :

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAHSSVSFMHWFQQIiPGTSPKLWIY

15 29

STSSLASGVPARFGGSGSGTSSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFPLT
FGAGTKLELKR (ID SEC NO: 7)

5 EIVLTQSPATMSASPGERVITITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIY
S
TSSLASGVPARFGGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTF
G AGTKLELKR (ID SEC NO: 8)

10 De manera similar, se proporciona un anticuerpo DS6
humanizado y fragmentos de enlace de epítoto del mismo que
tienen una región variable de cadena pesada que tiene una
secuencia de amino ácido que comparte por lo menos el 90% de la
identidad de secuencia con una secuencia de amino ácido
representada por ID SEC NO: 9, ID SEC NO: 10, o ID SEC NO: 11:

15 QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE
WIGYIYPGNGATNYNQKFQKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGTLLTVSA (ID SEC NO: 9)

20 QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE
WIGYIYPGNGATNYNQKFQKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGTLLTVSA (ID SEC NO: 10)

25 QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE
WIGYIYPGNGATNYNQKFQKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGTLLTVSA (ID SEC NO: 11)

En otra modalidad, se proporcionan anticuerpos DS6

humanizados y fragmentos de enlace de epítoto de los mismos que tienen una región variable de cadena ligera humanizada o de doble superficie que tiene una secuencia de amino ácido que corresponde a ID SEC NO: 8

5

EIVLTQSPATMSASPGERTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIY
STSSLASGVPARFGGSGSGTSLTSSMEAEADAATYYCQQRSSFPLT
FGAGTKLELKR (ID SEC NO: 8)

10

En forma similar, se proporcionan anticuerpos DS6 humanizados y fragmentos de enlace de epítoto de los mismos que tienen una región variable de cadena pesada humanizada o de doble superficie que tiene una secuencia de amino ácido que corresponde a ID SEC NO: 10 o ID SEC NO: 11, respectivamente:

15

QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE
WIGYIYPGNGATNYNQKFQGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA (ID SEC NO: 10)

20

QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE
WIGYIYPGNGATNYNQKFQGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA. (ID SEC NO: 11)

25

Los anticuerpos DS6 humanizados y fragmentos de enlace de epítoto de los mismos de la presente invención también pueden incluir sustitución en residuos de amino ácido de cadena pesada en una o más posiciones definidas por los residuos en forma de estrella en el Cuadro 1 que representa los residuos de estructura

de superficie de murino encontrados dentro de 5 Angstroms de un CDR que requiere cambio a un residuo humano. Por ejemplo, el primer residuo de amino ácido Q en la secuencia de murino (ID SEC NO: 7) ha sido reemplazado por E (ID SEC NO: 8) para humanizar el anticuerpo. Sin embargo, debido a la proximidad de este residuo un CDR, se puede requerir una retromutación para el residuo de murino Q para mantener la afinidad del anticuerpo.

5

10

Cuadro 1

Residuos de estructura muDS6 próximos a CDR (numeración Kabat)	
Cadena ligera	Cadena Pesada
Q1*	Q1
V3	K64
T5	P73*
P40	S74
G57	
A60	
S67	
E81	

Esto se muestra además en el cuadro 2 en donde los residuos de de superficie de región variable mu27DS6 se muestran alineados con los tres residuos de superficie de región variable humanos más homólogos. Los residuos de amino ácido en el Cuadro 1 corresponden a los residuos de amino ácido subrayados en el cuadro 2.

15

20

Cuadro 2

Las 3 Superficies de Anticuerpo Humano Más Homólogas		
Anticuerpo	Cadena Ligera	ID SEC NO:
muDS6	Q V T A I P K P G G A S R E K	ID SEC NO: 12
28E4	E V T A T P R P G G A S S E K	ID SEC NO: 13
HAZcPB	E V T G T P R P G G D S R E K	ID SEC NO: 14
SSaPB	E C T G T P R P G G D S R E K	ID SEC NO: 15
Anticuerpo	Cadena Pesada	ID SEC NO:

muDS6	QYQALRSKKPGQKKGPSSEQS	ID SEC NO: 16
28E4	QQVAVKPKKPGQQKQGTSSSEQS	ID SEC NO: 17
HAZcPB	-QVAVKPKKPGQQKQGESSEQS	ID SEC NO: 18
SSaPB	-QVAVKPKKPGQQKQGESSEQS	ID SEC NO: 19

La presente invención proporciona además conjugados citotóxicos que comprenden (1) un agente de enlace celular que reconoce y se enlaza al glicótopo CA6, y (2) un agente citotóxico.

5 En los conjugados citotóxicos, el agente de enlace celular tiene una alta afinidad para el glicótopo CA6 y el agente citotóxico tiene un alto grado de citotoxicidad para las células que expresan el glicótopo CA6, de manera que los conjugados citotóxicos de la presente invención forman agentes de eliminación efectivos.

10 En una modalidad preferida, el agente de enlace celular es un anticuerpo anti-CA6 o un fragmento de enlace de epítipo del mismo, de manera más preferible un anticuerpo anti-CA6 humanizado o un fragmento de enlace de epítipo del mismo, en donde un agente citotóxico es unido de manera covalente,

15 directamente o por medio de un enlazador divisible o no divisible, al anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo. En modalidades más preferidas, el agente de enlace celular es el anticuerpo DS6 humanizado o un fragmento de enlace de epítipo del mismo, y el agente citotóxico es un taxol, un maitansinoide,

20 CC-1065 o un CC-1065 análogo.

En modalidades preferidas de la invención, el agente de enlace celular es un anticuerpo anti-CA6 humanizado y el agente citotóxico es a fármaco citotóxico tal como un maitansinoide o un taxano.

25 De manera más preferible el agente de enlace celular es el anticuerpo anti-CA6 humanizado DS6 y el agente citotóxico es un

A B

compuesto de maitansina, tal como DM1 o DM4.

La presente invención incluye también un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glicótopo CA6. En modalidades preferidas, el método para inhibir el crecimiento de la célula que expresa el glicótopo CA6 tiene lugar in vivo y resulta en la muerte de la célula, aunque también están incluidas las aplicaciones in vitro y ex vivo.

La presente invención proporciona también una composición terapéutica que comprende el conjugado citotóxico, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención incluye además un método para tratar a un sujeto que tiene cáncer utilizando la composición terapéutica. En modalidades preferidas, el conjugado citotóxico comprende un anticuerpo anti-CA6 y un agente citotóxico. En modalidades más preferidas, el conjugado citotóxico comprende un conjugado anticuerpo DS6 humanizado-DMI, anticuerpo DS6 humanizado-DM4 o un conjugado anticuerpo DS6 humanizado-taxano, y el conjugado es administrado junto con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención incluye y también un equipo que comprende un conjugado anticuerpo anti-CA6-agente citotóxico e instrucciones para el uso. En modalidades preferidas, el anticuerpo anti-CA6 es el anticuerpo DS6 humanizado, el agente citotóxico es un compuesto de maitansina, tal como DM1 o DM4, o un taxano, y las instrucciones para utilizar los conjugados en el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer. El equipo puede incluir también componentes necesarios para la preparación de una formulación farmacéuticamente aceptable, tal como un diluyente si

1/2 XA

el conjugado está en un estado liofilizado o en forma concentrada, y para la administración de la formulación.

La presente invención incluye también derivados de anticuerpos que se enlazan y reconocen específicamente el glicótopo CA6. En modalidades preferidas, los derivados de anticuerpo son preparados mediante anticuerpos de doble superficie o humanización que se enlazan al glicótopo CA6, en donde los derivados tienen inmunogenicidad disminuida hacia el huésped.

La presente invención proporciona además anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que son etiquetados adicionalmente para uso en las aplicaciones de investigación o diagnóstico. En modalidades preferidas, la etiqueta es una radioetiqueta, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de formación de imagen o un ión metálico.

Se proporciona también un método para el diagnóstico en el cual los anticuerpos humanizados etiquetados o fragmentos de enlace de epítipo de los mismos son administrados a un sujeto que se supone que tiene cáncer, y la distribución de la etiqueta dentro del cuerpo del sujeto es medida o monitoreada.

La presente invención proporciona también métodos para el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer a través de la administración de un conjugado de anticuerpo humanizado de la presente invención, ya sea solo o en combinación con otros agentes citotóxicos o terapéuticos.

El cáncer puede ser uno o más de, por ejemplo, cáncer de seno, cáncer de colon, carcinoma de ovarios, cáncer endometrial, osteosarcoma, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer de

pulmón, carcinoma sinovial, cáncer pancreático, un sarcoma o un carcinoma en el cual se expresa CA6 u otro cáncer por ser determinado aún en el cual se expresa predominantemente el glicótopo CA6.

5 A menos que establezca de otra manera, todas las referencias y patentes citadas en la presente están incorporadas mediante referencia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10

La Figura 1 muestra los resultados de estudios ejecutados para determinar la habilidad del anticuerpo DS6 para enlazarse la superficie de líneas celulares de cáncer seleccionadas. La fluorescencia de las líneas de celulares incubadas con el anticuerpo primario DS6 y los anticuerpos secundarios FITC conjugados de anti-ratón IgG (H+L) fue media a través de citometría de flujo. El anticuerpo DS6 enlazó células Caov-3 (Figura 1A) y T-47D (Figura 1B) con un Kd aparente de 1.848 nM y 2.586 nM respectivamente. Las líneas celulares antígeno negativas, SK-OV-3 (Figura 1C) y Colo205 (Figura 1D) no demostraron enlace antígeno específico.

15

20

La Figura 2 muestra los resultados de análisis tinción por punto de la expresión de epítipo. Los lisados celulares Caov-3 (Figura 2A & Figura 2B), SKMEL28 (Figura 2C), y Colo205 (Figura 2D) fueron marcados de manera individual sobre membranas de nitrocelulosa y después incubadas individualmente con pronasa, proteinasa K, neuraminidasa o ácido periódico. Las membranas fueron inmunoteñidas con el anticuerpo DS6 anticuerpo (Figura

25

2A), el anticuerpo CM1 (Figura 2B), el anticuerpo R24 (Figura 2C), o el anticuerpo C242 (Figura 2D).

La Figura 3 muestra los resultados de un análisis de tinción por puntos de la expresión de antígeno DS6. Los lisados celulares Caov-3 fueron marcados individualmente sobre membranas PVDF y después incubados en presencia de ácido trifluorometanesulfónico (TFMSA). Las membranas fueron inmunoteñidas con el anticuerpo CM1 anticuerpo (1 a 2) o el anticuerpo DS6 (3 & 4).

La Figura 4 muestra los resultados del análisis de glicotópo del antígeno DS6. Los lisados Caov-3 pretratados con N-glicanasa ("N-gly"), O-glicanasa ("O-gly"), y/o sialidasa ("S") fueron marcados sobre nitrocelulosa e inmunoteñidos con el anticuerpo DS6 o el anticuerpo CM1 (Muc-1 VNTR).

La Figura 5 muestra los resultados del análisis de tinción Western del antígeno DS6. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados ("IP") e inmunoteñidos con el anticuerpo DS6. El antígeno corresponde a una banda de proteína > 250 kDa observada células Caov-3 antígeno-positivas (Figura 5A y Figura 5B) y T47D (Figura 5C). Las líneas celulares SK-OV-3 antígeno-negativas (Figura 5D) y Colo205 (Figura 5E) no exhiben esta banda. Después de la inmunoprecipitación, los lechos de Proteína G de los lisados celulares Caov-3 fueron incubados con (Figura 5A) neuraminidasa ("N") o (Figura 5B) ácido periódico ("PA"). Los controles de lisado de anticuerpo ("a"), pre-IP ("Lys") y post-IP de flujo de paso ("FT") fueron operados sobre el mismo gel. Los inmunoprecipitados Caov-3 también fueron incubados con N-glicanasa ("N-gly"), O-glicanasa ("O-gly"), y/o sialidasa ("S") (ver Figura 5F), en donde la tinción fue analizada de manera

alternativa con biotinilatado-DS6 y estreptavidina-HRP.

La Figura 6 muestra los resultados de las inmunoprecipitaciones y/o inmunotinciones del anticuerpo DS6 y el anticuerpo CM1 sobre lisados celulares Caov-3 (Figura 6A) y HeLa (Figura 6B). El traslape de las señales de tinción western CM1 y DS6 significa que el antígeno DS6 está en la proteína Mud. En los lisados HeLa, los resultados del doblete Muc1 a partir de la expresión Muc1 dirigida por diferentes alelos difieren en su número de las repeticiones tándem.

La Figura 7 muestra un diseño ELISA de intercalación de anticuerpo DS6 (Figura 7A) y una curva estándar (Figura 7B). La curva estándar fue generada utilizando concentraciones conocidas de estándares CA15-3 comercialmente disponibles (en donde 1 unidad CA15-3 = 1 unidad DS6).

La Figura 8 muestra curvas estándar ELISA cuantitativas. Las curvas estándar de la señal del anticuerpo de detección (estreptavidina-HRP/biotina-DS6) (Figura 8C) se determinaron utilizando concentraciones conocidas de biotina-DS6 capturadas por cabra anti-ratón IgG en placas (Figura 8A) o enlazadas directamente sobre la placa ELISA (Figura 8B).

La Figura 9 muestra las secuencias ADNc y de amino ácido de la región variable de cadena ligera (Figura 9A) y la cadena pesada (Figura 9B) para el anticuerpo DS6 de murino. Los tres CDRs en cada secuencia están subrayados (definiciones Kabat).

La Figura 10 muestra los CDRs de cadena ligera (Figura 10A) y pesada (Figura 10B) del anticuerpo DS6 de murino determinados por las definiciones Kabat. El software de modelado AbM produce una definición ligeramente diferente para los CDRs de cadena

pesada (Figura 10C).

La Figura 11 muestra las secuencias de amino ácido de cadena ligera ("muDS6LC") (residuos 1-95 de ID SEC NO: 7) y de cadena pesada ("muDS6HC") (residuos 1-98 de ID SEC NO: 9) para el anticuerpo DS6 de murino alineado con las secuencias de línea germinal para los genes IgV α p4 (ID SEC NO: 23) e IgVh J558.41 (ID SEC NO: 24). Gel color gris indica la divergencia de secuencia.

La Figura 12 muestra las diez secuencias de anticuerpo de cadena ligera y de cadena pesada más homólogas para las secuencias de cadena ligera ("muDS6LC") de DS6 murino (muDS6) y de cadena pesada ("muDS6HC") que tienen archivos de estructura resueltas en la base de datos Brookhaven. Las secuencias están alineadas en orden de más a menos homóloga.

La Figura 13 muestra los datos de accesibilidad de superficie y cálculos para pronosticar que residuos de estructura de la región variable de cadena ligera del anticuerpo DS6 de murino son accesibles de superficie. Las posiciones con 25-35% de accesibilidad de superficie promedio son marcadas (' ? ? *') y fueron sometidas al análisis de segunda ronda. La región variable de cadena ligera del anticuerpo DS6 anticuerpo (Figura 13A) y la región variable de cadena pesada (Figura 13B).

La Figura 14 muestra el mapa de plásmido de expresión de mamífero prDS6vl.0. este plásmido fue utilizado para construir y expresar los anticuerpos quiméricos recombinantes y DS6 humanizados.

La Figura 15 muestra las secuencias de amino ácido de los dominios variables de anticuerpo de murino ("muDS6") y

humanizado ("huDS6") (v1. 0 & v1. 2) DS6 de cadena ligera (Figura 15A) y de cadena pesada (Figura 15B).

La Figura 16 muestras las secuencias de ADNc y de amino ácido de la región variable de cadena ligera del anticuerpo DS6 humanizado ("huDS6")(v1.0 y v1.2).

La Figura 17 muestra las secuencias de ADNc y de amino ácido de la región variable de cadena pesada del anticuerpo DS6 humanizado ("huDS6") v1. 0 (Figura 17A) y v1. 2 (Figura 17B).

La Figura 18 muestra las curvas de enlace de citometría de flujo de clones muDS6 y huDS6 a partir de un ensayo ejecutado con células WISH. Las afinidades de enlace de los clones (Figura18A) quiméricos, v1.0, y v1. 2 humanos DS6 ($K_d = 3.15$, 3.71 , y 4.20 nM, respectivamente) son comparables con (Figura 18B) murino natural y biotinilatado DS6 ($K_d = 1.93$ y 2.80 nM, respectivamente).

La Figura 19 muestra los resultados de un ensayo de enlace de competencia de anticuerpos huDS6 con muDS6. (Figura 19A) las células WISH fueron incubadas con biotina-muDS6 y estreptavidina-DTAF produciendo una curva de enlace con un K_d aparente de 6.76 nM. (Figura 19B) Concentraciones variables de muDS6 natural, huDS6 v 1.0 y v 1.2 se combinaron con 2 nM de biotina-muDS6 y la estreptavidina-DTAF secundaria.

La Figura 20 muestra los resultados de una determinación de la afinidad de enlace de un anticuerpo DS6 no conjugado contra un conjugado anticuerpo DS6-DM1. Los resultados demostraron que la conjugación DM1 no afecta de manera adversa la afinidad de enlace del anticuerpo. El K_d aparente del conjugado anticuerpo DS6-DM1 (3.902 nM) ("DS6-DM1") fue ligeramente mayor que el

anticuerpo natural (2.020 nM) ("DS6").

La Figura 21 muestra los resultados de un ensayo de viabilidad celular indirecto utilizando el anticuerpo DS6 en presencia o ausencia del conjugado anti-ratón IgG(H+L)DM1 (2 Ab-
5 DMI). Las células antígeno-positivas Caov-3 fueron enlazadas de una manera dependiente de anticuerpo DS6 ($IC_{50} = 424.9$ pM) solamente en presencia del conjugado secundario ("DS6 +2 Ab-
DMI").

La Figura 22 muestra los resultados de un ensayo de
10 citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del anticuerpo DS6 y el anticuerpo DS6. Los resultados demostraron que no hubo efecto mediado por CDC del anticuerpo DS6 o el anticuerpo DS6 humanizado (v1. 0 y v1. 2) en células HPAC (Figura 22A) y ZR-75-
1 (Figura 22B).

La Figura 23 muestra los resultados de un ensayo de
15 citotoxicidad in vitro de un conjugado anticuerpo DS6-DM1 contra maitansina libre. En un ensayo clonogénico, las líneas celulares de cáncer DS6 antígeno-positivas de ovario (Figura 23A), seno
(Figura 23B), cervical (Figura 23C), y pancreático (Figura 23D)
20 fueron probadas para citotoxicidad de exposición continua para un conjugado de anticuerpo DS6- DM1 (paneles izquierdos). Esas líneas celulares fueron probadas de manera similar para la sensibilidad de maitansina mediante una exposición de 72h a maitansina libre (paneles derechos). Las líneas celulares de
25 cáncer de ovario probadas fueron OVCAR5, TOV-21G, Caov-4 y Caov-3. Las líneas celulares de cáncer de seno fueron T47D, BT-20 y BT-483. Las líneas celulares de cáncer cervical probadas fueron KB, HeLa y WISH. Las líneas celulares de cáncer

pancreático probadas fueron HPAC, Hs766T y HPAF-11.

La Figura 24 muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad in vitro de un conjugado de anticuerpo DS6-DM1. en un ensayo de viabilidad celular MTT, las células de cáncer humanas de ovario (Figura 24A, Figura 24B & Figura 24C), seno (Figura 24D & Figura 24E), cervical (Figura 24F & Figura 24G), y pancreático (Figura 24H a Figura 24I) fueron eliminadas de una manera dependiente de conjugado de anticuerpo DS6-DM1. DS6 natural no afectó de manera adversa el crecimiento de estas células, indicando que la conjugación DM1 es requerida para la citotoxicidad.

La Figura 25A muestra los resultados de un estudio de eficacia anti-tumoral in vivo de un conjugado de anticuerpo DS6-DM1 en xenoinjertos KB subcutáneos establecidos. Las células tumorales fueron inoculadas en el día 0, y el primer tratamiento se dio en el día 6. Los tratamientos de inmunconjugado continuaron diariamente para un total de 5 dosis. Los animales de control PBS fueron sacrificados una vez que los volúmenes de tumor excedieron de 1500 mm³. El conjugado fue dado a una dosis de 150 o 225 mg/kg DM1, que corresponde a las concentraciones de anticuerpo de 5.7 y 8.5 mg/kg respectivamente. Los pesos corporales (Figura 25B) de los ratones fueron monitoreados durante el curso del estudio.

La Figura 26 muestra los resultados de un estudio de eficacia antitumoral de un conjugado de anticuerpo DS6-DM1 en xenoinjertos de tumor subcutáneo establecidos. Las células OVCAR5 (Figura 26A y Figura 26B), TOV-21G (Figura 26C y Figura 26D), HPAC (Figura 26E y Figura 26F), y HeLa (Figura 26G y

Figura 26H) fueron inoculadas en el día 0, y los tratamientos de inmunoconjugado fueron dados en el día 6 y 13. Los animales de control PBS fueron sacrificados una vez que los volúmenes de tumor excedieron de 1000 mm³. El conjugado fue dado en una dosis de 600 mg/kg DM1, que corresponde a una concentración de anticuerpo de 27.7 mg/kg. El volumen del tumor (Figura 26A, Figura 26C, Figura 26E, y Figura 26G) y el peso corporal (Figura 26B, Figura 26D, Figura 26F, y Figura 26H) de los ratones fueron monitoreados durante el curso del estudio.

La Figura 27 muestra los resultados de un estudio de eficacia in vivo de un conjugado de anticuerpo DS6-DM1 en tumores OVCAR5 intraperitoneales. Las células tumorales fueron inyectadas por vía intraperitoneal en el día 0, y los tratamientos de inmunoconjugado se dieron en el día 6 y 13. Los animales fueron sacrificados una vez que la pérdida de peso corporal excedió del 20%.

La Figura 28 muestra la curva de enlace de citometría de flujo a partir de un estudio de anticuerpo DS6 natural y taxano-conjugado sobre células HeLa. La conjugación de taxano (MM1-202) no afecta de manera adversa la afinidad de enlace del anticuerpo. El Kd aparente del conjugado DS6-MM1-202 (1.24 nM) fue ligeramente mayor que el del anticuerpo DS6 natural (620 pM).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona, entre otras características, anticuerpos monoclonales anti-CA6, anticuerpos humanizados anti-CA6, y fragmento del anticuerpo anti-CA6. Cada

2x TB

uno de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la presente invención están diseñados para reconocer y enlazarse de manera específica al glicótopo CA6 en la superficie de una célula. CA6 es conocido por ser expresado por muchos tumores humanos: 95% de los carcinomas de ovario seroso, 50% de los carcinomas de ovario endometriode, 50% de los neoplasmas del cervix uterino, 69% de los neoplasmas del endometrio, 80% de los neoplasmas de la vulva, 60% de los carcinomas de seno, 67% de los tumores pancreáticos, y 48% de los tumores del urotelio, aunque es raramente expresado por el tejido humano normal.

Un reporte de Kearse et al., Int. J. Cáncer 88 (6): 866-872 (2000) identificó de manera errónea la proteína sobre la cual se encontró el epíotpe como una proteína 80 kDa que tiene un a carbohidrato N-enlazado que contiene el epítotope CA6 cuando utilizaron un sobrenadante de hibridoma para caracterizarlo. Utilizando el DS6 purificado se ha demostrado que el epítotope CA6 se encuentra en un carbohidrato O-enlazado de una glicoproteína enlazada sin disulfuro mayor de 250 kDa. Además, la glicoproteína fue identificada como la mucina, Muc1. Debido a que diferentes Muc1 alelos tienen números variables de repeticiones tándem en las células de dominio (VNTR) de repetición tándem de número variable expresan con frecuencia dos proteínas Muc1 distintas de diferente tamaño (Taylor-Papadimitriou, Biochim. Biophys. Acta 1455 (2-3): 301-13 (1999). Debido a las diferencias en el número de repeticiones en el dominio VNTR así como las diferencias en la glicosilación el peso molecular de Muc1 varía de una línea celular a otra.

La susceptibilidad de la inmunoreactividad CA6 al ácido

periódico indica que CA6 es un epítoto de carbohidrato "glicótopo". La susceptibilidad adicional de la inmunoreactividad CA6 al tratamiento con neuraminidasa a partir de *Vibrio cholera* indica que el epítoto CA6 es un glicótopo dependiente de ácido siálico, por lo tanto un "sialoglicótopo."

Los detalles de la caracterización de CA6 pueden encontrarse en el ejemplo 2 (ver a continuación). Los detalles adicionales sobre CA6 pueden encontrarse en WO 02/16401; Wennerberg et al., Am. J. Patlzol. 143 (4): 1050-1054 (1993); Smith et al., Human Antibodies 9: 61-65 (1999); Kearse et al., Int. J. Cancer 88 (6): 866-872 (2000); Smith et al., last. J Gynecol. Pathol. 20 (3): 260-6 (2001); y Smith et al., Int. J. Gynecol. Pathol. 20(3): 260-6 (2001); y Smith et al., Appl. Immunochem, Mol. Morphol. 10(2): 152-8 (2002).

La presente invención incluye también conjugados citotóxicos que comprenden componentes primarios. El primer componente es un agente de enlace celular que reconoce y enlaza el glicótopo CA6. El agente de enlace celular reconocerá el sialoglicótopo CA6 con un alto grado de especificidad de manera que los conjugados citotóxicos reconocen y se enlazan solamente a las células a las cuales están destinados. Un alto grado de especificidad permitirá a los conjugados actuar de una manera dirigida con pocos efectos colaterales que resultan a partir del enlace no específico.

En otra modalidad, el agente de enlace celular de la presente invención también reconoce el glicótopo CA6 con un alto grado de afinidad de maneaa que los conjugados estarán en contacto con la célula objetivo durante un tiempo suficiente para permitir que la porción de fármaco citotóxico del conjugado actúe en la célula, y/o

para permitir a los conjugados tiempo suficiente en cual se internen en la célula.

En una modalidad preferida, los conjugados citotóxicos comprenden un anticuerpo anti-CA6 como el agente de enlace celular, de manera más preferible el anticuerpo monoclonal anti-CA6 DS6 murino. En una modalidad más preferida, los conjugados citotóxicos comprenden un anticuerpo DS6 humanizado o un fragmento de enlace de epítipo del mismo. El anticuerpo DS6 es capaz de reconocer CA6 con un alto grado de especificidad y dirige el agente citotóxico hacia una célula o tejido anormal, tal como células cancerígenas, de una manera dirigida.

El segundo componente de los conjugados citotóxicos de la presente invención es un agente citotóxico. En modalidades preferidas, el agente citotóxico es un taxol, un maitansinoide tal como DM1 o DM4, CC-1065 o un CC-1065 análogo. En modalidades preferidas, los agentes de enlace celular de la presente invención están enlazados de manera covalente, directamente o por medio de un enlazador divisible o no divisible, al agente citotóxico.

Los agentes de enlace celular, agentes citotóxicos, y enlazadores se describen con mayor detalle a continuación.

Agentes de enlace celular

La efectividad de los compuestos de la presente invención como agentes terapéuticos depende de la selección cuidadosa de un agente de enlace celular apropiado. Los agentes de enlace celular pueden ser de cualquier tipo actualmente conocido, o que

se den a conocer e incluyen péptidos y no-péptidos. El agente de enlace celular puede ser cualquier compuesto que puede enlazarse a una célula, ya sea de una manera específica o no-específica. Generalmente, estos pueden ser anticuerpos (en especial anticuerpos monoclonales), linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas transportadoras de nutriente (tales como transferina), o cualquier otra molécula o sustancia de enlace celular.

Ejemplos más específicos de agentes de enlace celular que se pueden utilizar incluyen:

(a) anticuerpos policlonales;

(b) anticuerpos monoclonales;

(c) fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', y F (ab')₂, Fv (Parham, J. Immicfzol. 131: 2895-2902 (1983); Spring et al. J Imrnzcraol. 113: 470-478 (1974); Nisonoff et al. Arch. Biocleem. Bioplays. 89: 230-244 (1960));

(d) interferones (e. g. alfa, beta, gama.);

(e) linfoquinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;

(f) hormonas tales como insulina, TRH (hormona liberadora de tirotropina), MSH (hormona de simulación de melanocito), hormonas esteroides, tales como andrógenos y estrógenos;

(g) factores de crecimiento y factores de estimulación de colonia tales como EGF, TGF-alfa, FGF, VEGF, G-CSF, M-CSF y GM-CSF (Burgess, Immunology Today 5: 155-158 (1984));

(h) transferina (O'Keefe et al. J. Biol. Clam. 260: 932-937 (1985)); y

(i) vitaminas, tales como asfolato.

Anticuerpos

La selección del agente de enlace celular apropiado es un asunto de elección que depende de la población celular particular a la que se vaya a dirigir, aunque en general, se prefieren los anticuerpos si está disponible uno adecuado o puede ser preparado, de manera más preferible un anticuerpo monoclonal.

Las técnicas de anticuerpo monoclonal permiten la producción de agentes de enlace celular extremadamente específicos en la forma de anticuerpos monoclonales específicos. Son particularmente conocidas las técnicas para crear anticuerpos monoclonales producidos al inmunizar ratones, ratas, cobayos o cualquier otro animal con el antígeno de interés tal como la célula objetivo intacta, antígenos aislados a partir de la célula objetivo, virus completo, virus completo atenuado, y proteínas virales tales como proteínas de recubrimiento virales. También pueden utilizarse células humanas sensibilizadas. Otro método para crear anticuerpos monoclonales es el uso de bibliotecas de fago de scFv (región variable de cadena individual), específicamente scFv humano (ver e. g., Griffiths et al., Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,885, 793 y 5,969, 108; McCafferty et al., WO 92/01047; Liming et al., WO 99/06587).

Un anticuerpo común está comprendido por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas que están unidas por enlaces disulfuro. La región variable es una porción de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras del anticuerpo que difiere en secuencia entre los anticuerpos y que coopera en el enlace y la especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno. De manera usual, la variabilidad no está uniformemente

distribuida a través de las regiones variables del anticuerpo. En forma común está concentrada en tres segmentos de una región variable llamadas regiones de determinación complementaria (CDRs) o regiones hipervariables, tanto en las regiones variables de cadena pesada como de cadena ligera. Las regiones más altamente conservadas de las regiones variables son llamadas regiones de estructura. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras comprenden cuatro regiones de estructura, que adoptan en gran medida una configuración de vaina beta, con cada región de estructura conectada por las tres CDRs, las cuales forman ciclos que se conectan a la estructura de vaina beta, y en algunos casos forman parte de la estructura de vaina beta. Las CDRs en cada cadena son mantenidas en estrecha proximidad por las regiones de estructura y, con las CDRs desde la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de enlace de antígeno de los anticuerpos (E. A. Kabat et al. Secuencias of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, 1991, NIH).

La región constante es una porción e la cadena pesada. En tanto que no está involucrada de manera directa en el enlace de un anticuerpo a un antígeno, exhibe varias funciones de efector, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Un anticuerpo monoclonal adecuado para el uso en la presente invención incluye el anticuerpo monoclonal DS6 de murino (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 6,596, 503; número de depósito ATCC PTA-4449).

Anticuerpos DS6 Humanizados o de Doble Superficie

29

De manera preferible, un anticuerpo anti-CA6 humanizado es usado como el agente de enlace celular de la presente invención. Una modalidad preferida de dicho anticuerpo humanizado es un anticuerpo DS6 humanizado, o un fragmento de enlace de epítope del mismo.

El objetivo de la humanización es una reducción en la inmunogenicidad de un anticuerpo xenogénico, tal como un anticuerpo de murino, para la introducción en un humano, en tanto que mantiene la afinidad de enlace de antígeno completa y la especificidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados pueden ser producidos utilizando varias tecnologías tales como aplicación de doble superficie e injerto CDR. Como se utiliza en la presente, la tecnología de aplicación de doble superficie usa una combinación de modelado molecular, análisis estadístico y mutagenesis para alterar las superficies no-CDR de las regiones variables del anticuerpo para asemejarse a las superficies de anticuerpos conocidos del huésped objetivo.

Las estrategias y métodos para la aplicación de doble superficie a anticuerpos, y otros métodos para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos dentro de un huésped diferente, se describen en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica 5, 639, 641 (Pedersen et al.), la cual está incorporada a la presente mediante referencia en su totalidad. En pocas palabras, en un método preferido, (1) las alineaciones de posición de un depósito de regiones variables de cadena pesada y ligera se generan para un conjunto de posiciones expuestas de

superficie de estructura de la región variable de cadena pesada y ligera en donde las posiciones de alineación para todas las regiones variables son por lo menos aproximadamente 98% idénticas; (2) un conjunto de residuos de amino ácido expuestos de superficie de la estructura de la región variable de cadena pesada y ligera está definido por un anticuerpo de roedor (o un fragmento del mismo); (3) se identificó un conjunto de residuos de amino ácido expuestos de superficie de la estructura de región variable de cadena pesada y ligera que es más estrechamente idéntico al conjunto de residuos de amino ácido expuestos de superficie de roedor; (4) el conjunto de residuos de amino ácido expuestos de superficie de la estructura de región variable de cadena pesada y ligera definidos en la etapa (2) es sustituido con el conjunto de residuos de amino ácido expuestos de superficie de la estructura de región variable de cadena pesada y ligera identificados en la etapa (3), excepto para aquellos residuos de amino ácido que estén entro de 5Å de cualquier átomo de cualquier residuo de las regiones de determinación complementaria del anticuerpo de roedor; y (5) se produce el anticuerpo de roedor humanizado que tiene especificidad de enlace.

Los anticuerpos pueden ser humanizados muchas otras técnicas que incluyen injerto-CDR (EP 0 239 400; WO 91/09967; Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,530,101; y 5,585,089), revestimiento o aplicación de doble superficie (EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan E. A., 1991, Molecular Immunology 28 (4/5): 489-498; Studnicka G. M. et al., 1994, Protein Engineering 7 (6): 805-814; Roguska M. A. et al., 1994, PNAS 91:

969-973), y lanzamiento de cadena (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,565,332). Los anticuerpos humanos pueden hacerse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de despliegue de fago. Véanse también las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,444,887, 4,716,111, 5,545,806, y 5,814,318; y los números de publicación de patente internacional WO98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO96/34096, WO96/33735, y WO 91/10741 (dichas referencias incorporadas en su totalidad mediante referencia).

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que reconocen un sialoglicótopo novedoso (el glicótopo CA6) en la mucina Muc1. En otra modalidad, los anticuerpos humanizados o fragmentos de enlace de epítipo de los mismos tienen la habilidad adicional de para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glicótopo CA6.

En modalidades más preferidas, se proporcionan versiones de doble superficie o humanizadas del anticuerpo DS6 en donde los residuos expuestos de superficie del anticuerpo o sus fragmentos son reemplazados en las cadenas ligeras y pesadas para asemejarse más estrechamente a las superficies de anticuerpo humano conocidas. Los anticuerpos DS6 humanizados o fragmentos de enlace de epítipo de los mismos de la presente invención tienen propiedades mejoradas. Por ejemplo, los anticuerpos DS6 humanizados o fragmentos de enlace de epítipo de los mismos reconocen de manera específica un sialoglicótopo novedoso (el glicótopo CA6) en la mucina Muc1. De forma

preferible, los anticuerpos DS6 humanizados o fragmentos de enlace de epítipo de los mismos tienen una habilidad adicional para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glicótopo CA6. El anticuerpo humanizado o un fragmento de enlace de epítipo del mismo puede ser conjugado para un fármaco, tal como un maitansinoide, para formar un profármaco que tiene una citotoxicidad específica hacia las células que expresan antígeno mediante señalamiento del fármaco para el sialoglicótopo Muc1 novedoso, CA6. Los conjugados citotóxicos que comprenden dichos anticuerpos y un fármaco pequeño, altamente tóxico (por ejemplo, maitansinoides, taxanos, y CC-1065 análogos) pueden ser utilizados como un terapéutico para el tratamiento de tumores, como tumores de seno y ovario.

Las versiones humanizadas del anticuerpo DS6 también están completamente caracterizadas en la presente con respecto a sus secuencias respectivas de amino ácido de regiones variables tanto de cadena pesada como de cadena ligera, las secuencias de ADN de los genes para las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera, la identificación de las CDRs, la identificación de sus amino ácidos de superficie, y la descripción de un medio para su expresión en una forma recombinante.

En una modalidad, se proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de enlace de epítipo del mismo que tiene una cadena pesada que incluye CDRs que tienen secuencias de amino ácido representadas por ID SEC NOs: 1-3:

S Y N M H (ID SEC NO: 1)

Y I Y P G N G A T N Y N Q K F K G (ID SEC NO: 2)

G D S V P F A Y (ID SEC NO: 3)

Cuando las CDRs de cadena pesada son determinadas por medio del software de modelado AbM son representadas por ID SEC NOs: 20-22:

GYTFTSYNMH (ID SEC NO: 20)

YIYPGNGATN (ID SEC NO: 21)

G D S V P F A Y (ID SEC NO: 22)

En la misma modalidad, el anticuerpo humanizado o fragmento de enlace de epítipo del mismo tiene una cadena ligera que comprende CDRs que tienen secuencias de amino ácido representadas por ID SEC NOS: 4-6:

SAHSSVSFMH (ID SEC NO: 4)

STSSLAS (ID SEC NO: 5)

QQRSSFPLT (ID SEC NO: 6)

Se proporcionan también anticuerpos humanizados y fragmentos de enlace de epítipo de los mismos que tienen una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de amino ácido que comparte por lo menos 90% de la identidad de secuencia con una secuencia de amino ácido representada por ID SEC NO: 7 o ID SEC NO: 8:

QIVLTQSPAIMASASPGEKVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPK
LWIYSTSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSS

FPLTFGAGTKLELKR. (ID SEC NO: 7)

EIVLTQSPATMSASPGERVITITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPK
LWIYSTSSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSS

FPLTFGAGTKLELKR. (ID SEC NO: 8)

5

De manera similar, se proporcionan anticuerpos humanizados y fragmentos de enlace de epítotope de los mismos que tienen una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de amino ácido que comparte por lo menos 90% de la identidad de secuencia con una secuencia de amino ácido representada por ID SEC NO: 9, ID SEC NO: 10, o ID SEC NO: 11:

10

QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG
QGLEWIGYIYPGNGATNYNQKFQKATLTADPSSSTAYMQISSLTSED
SAVY FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA. (ID SEC NO: 9)

15

QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG
QGLEWIGYIYPGNGATNYNQKFQKATLTADTSSSTAYMQISSLTSED
SAVY FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA. (ID SEC NO: 10)

20

QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG
QGLEWIGYIYPGNGATNYNQKFQKATLTADPSSSTAYMQISSLTSED
SAVY FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA. (ID SEC NO: 11)

En otra modalidad, se proporcionan anticuerpos humanizados y fragmentos de enlace de epítotope de los mismos que tienen una región variable de cadena ligera humanizada o de doble superficie que tiene una secuencia de amino ácido que corresponde a ID SEC NO: 8

25

EIVLTQSPATMSASPGERVITITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPK
LWIYSTSSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSS
FPLTFGAGTKLELKR. (ID SEC NO: 8)

5 De manera similar, se proporcionan anticuerpos humanizados y fragmentos de enlace de epítipo de los mismos que tienen una región variable de cadena pesada humanizada o de doble superficie que tiene una secuencia de amino ácido que corresponde a ID SEC NO: 10 o ID SEC NO: 11:

10 QAQLVQSGAEWKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQ
GLEWIGYIYPGNGATNYNQKFQGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDS
AVYFCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA. (ID SEC NO: 10)

15 QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG
QGLEWIGYIYPGNGATNYNQKFQGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSED
SAVY FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA. (ID SEC NO:11)

20 Los anticuerpos humanizados y fragmentos de enlace de epítipo de los mismos de la presente invención también pueden incluir versiones de regiones variables de cadena ligera y/o pesada en las cuales los residuos de amino ácido de superficie humanos en proximidad a las CDRs son reemplazados por los residuos de superficie muDS6 correspondientes en una o más porciones definidas por los residuos en el Cuadro 1 (numeración

25 Kabat) marcados con un asterisco a fin de retener la afinidad de enlace y la especificidad de muDS6.

Cuadro 1

Residuos de estructura muDS6 próximos a CDR (numeración Kabat)	
Cadena Ligera	Cadena Pesada

40 36

Q1*	Q1
V3	K64*
T5	P73*
P40	S74
G57	
A60	
S67	
E81	

Las cadenas ligeras y pesadas de secuencias de amino ácido primarias y de y del anticuerpo DS6, y de versiones humanizadas e las mismas, están descritas en la presente. Sin embargo, el alcance de la presente invención no está limitado a anticuerpos y fragmentos que comprenden esas secuencias. En vez de ello, todos los anticuerpos y fragmentos que enlazan de manera específica a CA6 como un glicótopo específico de tumor único en el receptor Muc1 están incluidos en la presente invención. Preferiblemente, los anticuerpos y fragmentos que enlazan de manera específica a CA6 también antagonizan la actividad biológica del receptor. De manera más preferible, dichos anticuerpos además carecen sustancialmente de actividad agonista. Por lo tanto, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la presente invención pueden diferir del anticuerpo DS6 o los derivados humanizados del mismo, en las secuencias de amino ácido de su andamio, CDRs, y/o cadena ligera y cadena pesada, y aún quedan dentro del alcance de la presente invención.

Las CDRs del anticuerpo DS6 son identificadas mediante modelado y sus estructuras moleculares han sido pronosticadas. De nuevo, en tanto que las CDRs son importantes para el reconocimiento de epítipo, no son esenciales para los anticuerpos y fragmentos de la invención. En consecuencia, se proporcionun anticuerpos y fragmentos que tienen propiedades mejoradas producidas por ejemplo, mediante maduración de afinidad de un anticuerpo de la presente invención.

8

El gen de línea germinal IgV κ ap4 de cadena ligera de ratón y el gen de línea germinal IgVh J558. 41 de cadena pesada a partir de los cuales se derivó probablemente DS6 se muestran en la FIG. 11 alineados con la secuencia del anticuerpo DS6. La comparación identifica probables mutaciones somáticas en el anticuerpo DS6, incluyendo varias en las CDRs.

La secuencia de región variable de cadena pesada y de cadena ligera del anticuerpo DS6, y las secuencias de las CDRs del anticuerpo DS6 no se conocían previamente y se establecen en las Figuras 9A y 9B. Dicha información puede ser utilizada para producir versiones humanizadas del anticuerpo DS6.

Fragmentos de anticuerpo

Los anticuerpos de la presente invención incluyen los anticuerpos de longitud completa antes descritos, así como fragmentos de enlace de epítipo. Como se utiliza en la presente, "fragmentos de anticuerpo" incluyen cualquier porción de un anticuerpo que retiene la habilidad para enlazarse al epítipo reconocido por el anticuerpo de longitud total, denominados de manera general "fragmentos de enlace de epítipo." Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, cadena individual Fvs (scFv), anticuerpos de cadena individual, Fva enlazado por disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden ya sea una región VL o VH. Los fragmentos de enlace de epítipo que incluyen anticuerpos de cadena individual, pueden comprender la(s) región(es) variable(s) sola(s) o en combinación con la totalidad o una porción de los siguientes:

región impedida, dominios CH1, CH2, y CH3.

Dichos fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab o el fragmento $F(ab')_2$. De manera preferible, los fragmentos de anticuerpo contienen las seis CDRs de todo el anticuerpo, aunque los fragmentos que contienen menos de todas esas regiones, tales como tres, cuatro o cinco CDRs, también son funcionales. Además, los fragmentos pueden ser o combinar miembros de una de las siguientes clases de inmunoglobulina: IgG, IgM, IgA, IgD, o IgE, y las subclases de las mismas.

Los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ pueden ser producidos por división proteolítica, utilizando enzimas tales como papaina (fragmentos Fab) o pepsina (fragmentos $F(ab')_2$).

Los fragmentos FVs (scFvs) de cadena individual son fragmentos de enlace de epítipo que contienen por lo menos un fragmento de una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH) enlazado a por lo menos un fragmento de una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL). El enlazador puede ser un péptido flexible, corto seleccionado para asegurar que el dobléz tridimensional adecuado de las regiones (VL) y (VH) ocurre una vez que están enlazadas para mantener la especificidad de enlace de la molécula objetivo e todo el anticuerpo a partir del cual se derivó el fragmento de anticuerpo de cadena individual. La terminación carboxilo de la secuencia (VL) o (VH) puede ser enlazado de manera covalente por medio de un enlazador a la terminación amino ácido de una secuencia (VL) o (VH) complementaria.

Los fragmentos de anticuerpo de cadena individual de la presente invención contienen secuencias de amino ácido que

tienen por lo menos una de las regiones variable o de determinación complementaria (CDRs) de todos los anticuerpos descritos en esta especificación, aunque carecen de algunos o todos los dominios constantes de esos anticuerpos. Esos dominios constantes no son necesarios para el enlace de antígeno, aunque constituyen una porción principal de la estructura de los anticuerpos completos. Los fragmentos de anticuerpo de cadena individual pueden por lo tanto superar algunos de los problemas asociados con el uso de anticuerpos que contienen una parte o todo un dominio constante. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo de cadena individual tienden a estar libres de interacciones indeseables entre moléculas biológicas y la región constante de cadena pesada, u otra actividad biológica indeseable. Además, los fragmentos de anticuerpo de cadena individual son considerablemente más pequeños que los anticuerpos completos y por lo tanto pueden tener mayor permeabilidad capilar que los anticuerpos completos, permitiendo que los fragmentos de anticuerpo de cadena individual localicen y enlacen a sitios de enlace de antígeno objetivo de manera más eficiente. Asimismo, los fragmentos de anticuerpo pueden ser producidos en una escala relativamente grande en células procarióticas, facilitando de esta manera su producción. Además, el tamaño relativamente pequeño de los fragmentos de anticuerpo de cadena individual los hace menos probables de ocasionar una respuesta inmune en un receptor que los anticuerpos completos.

Los fragmentos de anticuerpo de cadena individual pueden ser generados a través de técnicas de clonación molecular, biblioteca de despliegue de fago de anticuerpo o similares bien

conocidas por el técnico con experiencia. Esas proteínas pueden ser producidas, por ejemplo, en células eucarióticas o células procarióticas, incluyendo bacterias. Los fragmentos de enlace de epítotope de la presente invención también pueden ser generados utilizando varios métodos de despliegue de fago conocidos en la técnica. En los métodos de despliegue de fago, los dominios de anticuerpo funcionales son desplegados sobre la superficie de las partículas del fago que transportan las secuencias de polinucléotidos que las codifican. En particular, dicho fago puede ser utilizado para desplegar dominios de enlace de epítotope expresados a partir de un repertorio o biblioteca de anticuerpo de combinación (e. g., humano o murino). El fago que expresa un dominio de enlace de epítotope que enlaza el antígeno de interés puede ser seleccionado o identificado con antígeno por ejemplo, por ejemplo utilizando antígeno etiquetado enlazado o capturado para una superficie o lecho sólido. El fago utilizado en estos métodos son comúnmente fagos filamentosos que incluyen dominios de enlace fd y M13 expresados a partir del fago con dominios de anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizado con disulfuro fusionados de manera recombinante a cualquier gen de fago III o proteína VIII de gen.

Los ejemplos de métodos de despliegue de fago que se pueden utilizar para hacer los fragmentos de enlace de epítotope de la presente invención incluyen aquellos descritos en Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182: 41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184: 177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24: 952-958; Persic et al., 1997, Gene 187: 9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology 57: 191-280; solicitud

5-40

PCT No. PCT/GB91/01134; solicitudes PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 y 5,969,108; cada una de las cuales está incorporada en su totalidad a la presente mediante referencia.

Después de la selección de fago, las regiones del fago que codifica los fragmentos pueden ser aisladas y utilizadas para generar los fragmentos de enlace de epítipo a través de la expresión en un huésped seleccionado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levadura y bacterias, utilizando tecnología de ADN recombinante, e. g., como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, las técnicas para producir de manera recombinante los fragmentos Fab9, Fab' y F(ab')₂ también se pueden emplear utilizando métodos conocidos en la técnica tales como aquellos descritos en la publicación de PCT WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, BioTechniques 12 (6): 864-869; Sawai et al., 1995, AJRI 34: 26-34; y Better et al., 1988, Science 240: 1041-1043; dichas referencias incorporadas en su totalidad mediante referencia. Los ejemplos de técnicas que se pueden emplear para producir Fvs y anticuerpos de cadena individual incluyen aquellas descritas en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,946,778 y 5,258,498; Huston et al., 1991, Methods in Enzymology 203: 46-88; Shu et al., 1993, PNAS 90: 7995-7999; Skerra et al., 1988, Science 240: 1038-1040.

CG-41

Equivalentes Funcionales

Entro del alcance de la presente invención se incluyen también los equivalentes funcionales del anticuerpo anti-CA6 y el anticuerpo anti-CA6 humanizado. El término "equivalentes funcionales" incluye anticuerpos con secuencias homólogas, anticuerpos quiméricos, anticuerpos artificiales y anticuerpos modificados, por ejemplo, en donde cada equivalente funcional está definido por su habilidad para enlazarse a CA6. Los técnicos con experiencia comprenderán que hay un traslape n el grupo de moléculas denominado "fragmentos de anticuerpo" y el grupo denominado "equivalentes funcionales". Los métodos para producir los equivalentes funcionales se describen, por ejemplo, en la Solicitud PCT WO 93/21319, la Solicitud de Patente Europea No. 239,400; la Solicitud PCT WO 89/09622; la Solicitud de Patente Europea 338,745; y la Solicitud de Patente Europea EP332,424, las cuales están incorporadas en su totalidad mediante referencia.

Los anticuerpos con secuencias homólogas con aquellos anticuerpos con secuencias de amino ácido que tienen una homología de secuencia de amino ácido de un anticuerpo anti-CA6 y un anticuerpo anti-CA6 humanizado de la presente invención. De manera preferible, la homología es con la secuencia de amino ácido de las regiones variables del anticuerpo anti-CA6 y el anticuerpo anti-CA6 humanizado de la presente invención. "Homología de secuencia" como se aplica a una secuencia de amino ácido en la presente está definida como una secuencia con por lo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, o 94% de

8-72

homología de secuencia, y de manera más preferible de por lo menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de homología de secuencia para otra secuencia de amino ácido, como se determina, por ejemplo, a través del método de búsqueda FASTA de acuerdo con Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85,2444-2448 (1988).

Como se utiliza en la presente, un anticuerpo quimérico es uno en el cual las diferentes porciones de un anticuerpo son derivadas a partir de diferentes especies animales. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una región variable derivada a partir de anticuerpo monoclonal de murino apareado con una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véanse por ejemplo, Morrison, 1985, Science 229: 1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4: 214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125: 191-202; Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,807,715; 4,816,567; y 4,816,397, las cuales están incorporadas en su totalidad a la presente mediante referencia.

Las formas humanizadas de los anticuerpos quiméricos se hacen por medio de sustitución, por ejemplo, de las regiones de determinación complementaria de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, en un dominio de estructura humana, véase por ejemplo, Publicación PCT No. W092/22653. Los anticuerpos quiméricos humanizados tienen de preferencia regiones constantes y regiones variables diferentes de las regiones de determinación complementaria (CDRs) derivadas sustancial o exclusivamente a partir de las regiones de anticuerpo humano correspondientes y las CDRs derivadas sustancial o exclusivamente a partir de un

mamífero diferente del humano.

Los anticuerpos artificiales incluyen fragmentos scFv, diacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos y mru (ver revisiones de Winter, G. y Milstein, C., 1991, Nature 349: 293-299; Hudson, P. J., 1999, Current Opinion in Immunology 11: 548-557), cada uno de los cuales tiene habilidad de enlace de antígeno. En el fragmento Fv de cadena individual (scFv), los dominios VH y VL de un anticuerpo están enlazados por medio de un péptido flexible. Comúnmente, este péptido enlazador tiene una longitud de aproximadamente 15 residuos de amino ácido. Si el enlazador es mucho menor, por ejemplo de 5 amino ácidos, se forman diabodies, los cuales son dímeros scFv bivalentes. Si el enlazador es reducido a menos de tres residuos de amino ácido, se forman estructuras triméricas y tetraméricas que son llamadas triabodies y tetrabodies. La menor unidad de enlace de un anticuerpo es una CDR, en forma común la CDR2 de la cadena pesada que tiene suficiente reconocimiento específico que se puede utilizar por separado. Dicho fragmento recibe el nombre de unidad de reconocimiento molecular o mru. Varias mrus pueden enlazarse juntas con péptidos enlazadores cortos, formando por lo tanto una proteína de enlace artificial con mayor avidez que una mru individual.

Los equivalentes funcionales de la presente solicitud también incluyen anticuerpos modificados, por ejemplo, anticuerpos modificados por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos modificados incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, a través de glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación,

derivación por medio de los grupos de protección/bloqueo, división proteolítica, enlace a un ligando celular u otra porción, etc. La unión covalente no evita que el anticuerpo genere una respuesta anti-idiotípica. Esas modificaciones se pueden llevar a cabo a través de técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitarse a, división química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. En forma adicional, los anticuerpos modificados pueden contener uno o más amino ácidos no clásicos.

Los equivalentes funcionales pueden ser producidos por medio de intercambio de diferentes CDRs en diferentes cadenas dentro de diferentes estructuras. Por lo tanto, por ejemplo, diferentes clases de anticuerpo son posibles para un conjunto determinado de CDRs a través de la sustitución de diferentes cadenas pesadas, por lo que, por ejemplo, se pueden producir los tipos de anticuerpos e isótopos IgG1-4, IgM, IgA1-2, IgD, IgE. De manera similar, los anticuerpos artificiales dentro del alcance de la invención pueden ser producidos al incrustar un conjunto dado de CDRs dentro de una estructura totalmente sintética.

Los equivalentes funcionales pueden ser fácilmente producidos por medio de mutación, eliminación, y/o inserción dentro de las secuencias de región variable y/o constante que flanquean a un conjunto particular de CDRs, usando una amplia variedad de métodos conocidos en la técnica.

Los fragmentos de anticuerpo y equivalentes funcionales de la presente invención abarcan aquellas moléculas con un grado detectable de enlace para CA6, cuando se comparan con el anticuerpo DS6. Un grado detectable de enlace incluye todos los

JD AB

valores en el rango de por lo menos 10-100%, de preferencia de por lo menos 50%, 60% o 70%, de manera más preferible por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% la habilidad de enlace del anticuerpo DS6 de murino a CA6.

5

Anticuerpos Mejorados

Las CDRs son de principal importancia para el reconocimiento de epítotope y el enlace de anticuerpo. Sin embargo, los cambios pueden hacerse a los residuos que comprenden las CDRs sin interferir con la habilidad del anticuerpo para reconocer y enlazarse a su epítotope cognado. Por ejemplo, se pueden efectuar los cambios que no afectan el reconocimiento del epítotope, incrementan aún la afinidad de enlace del anticuerpo para el epítotope.

15

20

Por lo tanto, también están incluidas dentro del alcance de la presente invención versiones mejoradas de los anticuerpos tanto de murino como humanizados, los cuales también reconocen y se enlazan de manera específica a CA6, de preferencia con a afinidad incrementada.

25

Varios estudios han inspeccionado los efectos de introducir uno o más cambios de amino ácidos en varias posiciones en la secuencia de un anticuerpo, en base al conocimiento de la secuencia de anticuerpo primario, a sus propiedades tales como enlace y nivel de expresión (Yang, W. P. et al., 1995, J. Mol. Biol., 254,392-403; Rader, C. et al. , 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95,8910-8915; Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539).

5, 47

En esos estudios, los equivalentes del anticuerpo primario han sido generados cambiando las secuencias de los genes de cadena pesada y ligera en la CDR1, CDR2, CDR3, o regiones de estructura, usando métodos tales como mutagenesis dirigida al sitio mediada por oligonucleótido, mutagenesis de cartucho, PCR propensa a error, lanzamiento de ADN, o cepas de mutante de *E. coli* (Vaughan, T. J. et al., 1998, *Nature Biotechnology*, 16,535-539; Adey, N. B. et al., 1996, Chapter 16, pp. 277-291, in "Phage Display of Peptides and Proteins", Eds. Kay, B. K. et al., Academic Press). Esos métodos de cambio de la secuencia del anticuerpo primario han resultado en afinidades mejoradas de los anticuerpos secundarios (Gram, H. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89,3576- 3580; Boder, E. T. et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97,10701-10705; Davies, J. y Riechmann, L., 1996, *Immunotechnolgy*, 2,169-179; Thompson, J. et al., 1996, *J. Mol. Biol.*, 256,77-88; Short, M. K. et al., 2002, *J. Biol.Chem.*, 277,16365-16370; Furukawa, K. et al., 2001, *J. Biol. Chem.*, 276,27622-27628).

A través de una estrategia dirigida de manera similar de cambio de uno más residuos de amino ácido del anticuerpo, las secuencias de anticuerpo descritas en esta invención se pueden utilizar para desarrollar anticuerpos anti-CA6 con funciones mejoradas, incluyendo afinidad mejorada para CA6.

Los anticuerpos mejorados incluyen también aquellos anticuerpos que tienen características mejoradas que son preparados a través de técnicas estándar de inmunización animal, formación de hibridoma, y selección de anticuerpos con características específicas.

J2 AB

Agentes citotóxicos

El agente citotóxico usado en el conjugado citotóxico de la presente invención puede ser cualquier compuesto que de como resultado la muerte de una célula, o induzca la muerte celular, o disminuya de alguna manera la viabilidad celular. Los agentes citotóxicos preferidos incluyen, por ejemplo, maitansinoides y análogos de maitansinoide, taxoides, CC-1065 y análogos CC-1065, dolastatina y análogos de dolastatina, definidos a continuación. Esos agentes citotóxicos son conjugados para los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, equivalentes funcionales, anticuerpos mejorados y sus análogos están descritos en la presente.

Los conjugados citotóxicos pueden ser preparados a través de métodos in vitro. A fin de enlazar un fármaco o un profármaco al anticuerpo, se utiliza un grupo de enlace. Los grupos de enlace adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles peptidasa y grupos lábiles esterasa. Los grupos de enlace preferidos son grupos disulfuro y grupos tioéter. Por ejemplo, los conjugados se pueden elaborar utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o a través de la formación de un enlace tioéter entre el anticuerpo y el fármaco o profármaco.

Maitansinoides

Entre los agentes citotóxicos que se pueden utilizar en la

53 49

presente invención para formar un conjugado citotóxico, están los maitansinoides y análogos de maitansinoide. Ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Los maitansinoides son fármacos que inhiben la formación de microtúbulo y que son altamente tóxicos para las células de mamífero.

Ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones. Dichos maitansinoides adecuados están descritos en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4, 424,219; 4,256,746; 4,294,757; 4,307,016; 4,313,946; 4,315,929; 4,331,598; 4,361,650; 4,362,663; 4,364,866; 4,450,254; 4,322,348; 4,371,533; 6,333,410; 5,475,092; 5,585,499; y 5,846,545.

Ejemplos específicos de análogos adecuados de maitansinol que tienen un anillo aromático modificado incluyen:

(1) C-19-decloro (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,256,746) (preparado mediante reducción LAH de ansamitocina P2);

(2) C-20-hidroxi (o C-20-demetil)+/-C-19-decloro (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,361,650 y 4,307,016) (preparado por medio de bidemetilación utilizando Streptomyces o Actinomyces o declorinación usando LAH); y

(3) C-20-demetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-decloro (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,294,757) (preparado mediante acilación utilizando cloruros de acilo).

Los ejemplos específicos de análogo adecuados de maitansinol que tiene modificaciones en otras posiciones incluyen:

Jr 50

[130] (1) C-9-SH (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,424,219) (preparado por medio de la reacción de maitansinol con H₂S o PZSS);

(2) C-14-alcoximetil (demetoxi/CH₂OR) (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,331,598);

(3) C-14-hidroximetil o aciloximetil (CH₂OH o CH₂OAc) (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,450,254) (preparado a partir de Nocardia);

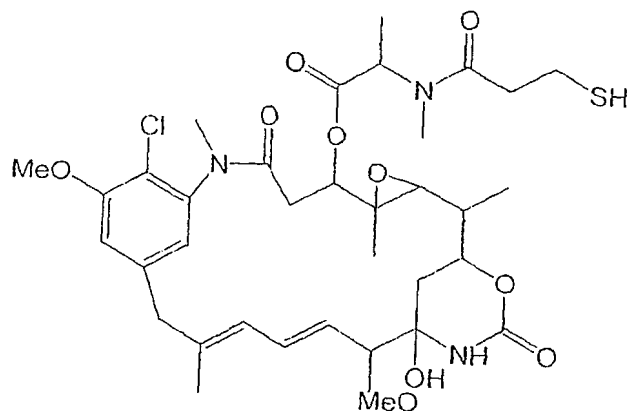
(4) C-15-hidroxi/aciloxi (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,364,866) (preparado por medio de la conversión de maitansinol mediante Streptomyces);

(5) C-15-metoxi (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,313,946 y 4,315,929) (aislado a partir de Trewia nudiflora);

(6) C-18-N-demetil (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,362,663 y 4,322,348) (preparado mediante la demetilación de maitansinol mediante Streptomyces); y

(7) 4,5-deoxi (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,371,533) (preparado por la reducción de tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

En una modalidad preferida, los conjugados citotóxicos de la presente invención utilizan el maitansinoide que contiene tiol (DM1), anteriormente llamado N^{2'}-deacetil-N^{2'}-(3-mercaptopropil)-maitansina, como el agente citotóxico. DM1 está representado por la formula estructural siguiente (I):



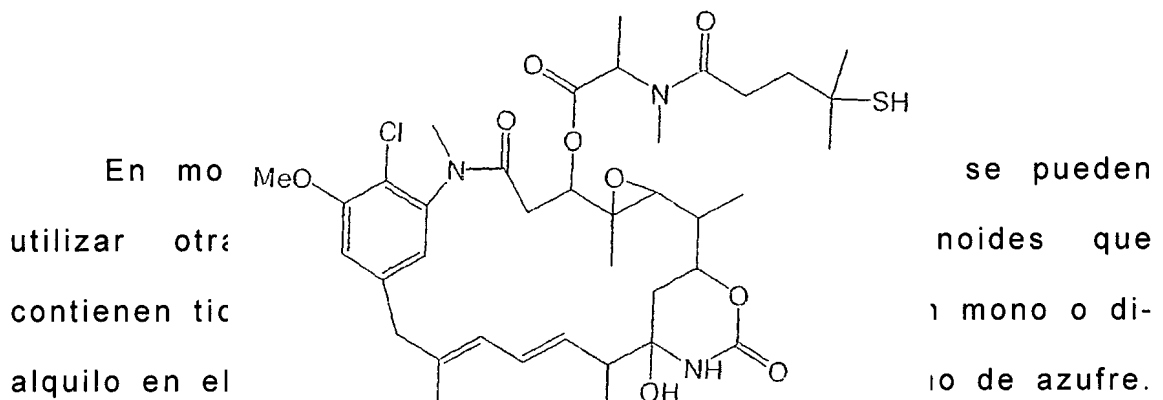
(I)

55-5T

5

En otra modalidad preferida, los conjugados citotóxicos de la presente invención utilizan el maitansinoide que contiene tiol N^{2'}-deacetil-N-^{2'}(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina como el agente citotóxico. DM4 está representado por la siguiente formula estructural (II):

10



15

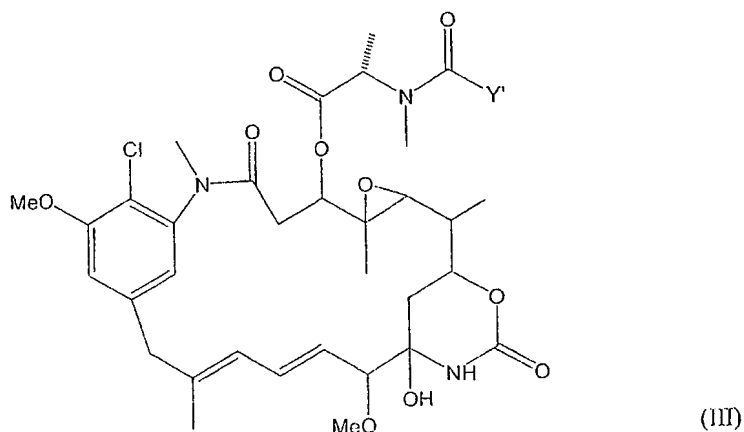
Estas incluyen un maitansinoide que tiene, en C-5, C-14 hidroximetil, C-15 hidroxil, o C-20 desmetil, una cadena lateral de amino ácido acilada con un grupo acilo que tiene un grupo sulfhidrilo oculto, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que tiene la funcionalidad tiol tienen uno o más sustituyentes, dichos sustituyentes que son CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o radical heterocíclico, y en donde además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de por lo menos tres átomos de carbono

20

25

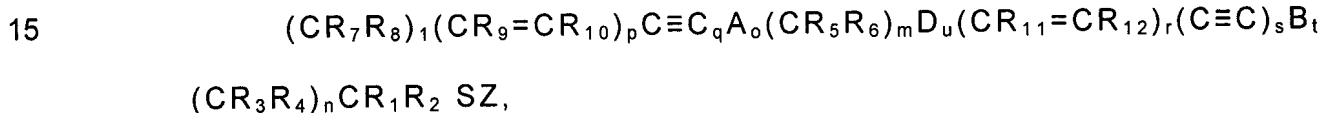
entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

Dichas maitansinas adicionales incluyen compuestos representados por la fórmula (III):



en donde:

Y' representa



en donde:

20

R₁ y R₂ son cada uno de manera independiente CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocíclico, y además R₂ puede ser H;

25

A, B, D son cicloalquilo o cicloalquenilo que tienen 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocíclico;

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, y R₁₂ son cada uno de manera independiente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado

o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocíclico;

l, m, n, o, p, q, r, s, t y u son cada uno de manera independiente 0 o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero n ningún momento; y

Z es H, SR o -COR, en donde R is alquilo o alquenilo lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, o simple o arilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocíclico.

Modalidades preferidas de la formula (III) incluyen compuestos de la fórmula (III) en donde:

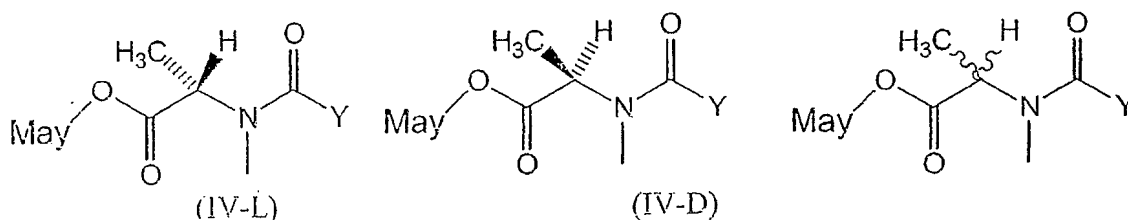
R1 es metil, R2 es H y Z es H.

R1 y R2 son metilo y Z es H.

R1 es metil, R2 es H, y Z es -SCH3.

R1 y R2 son metilo, y Z es-SCH3

Dichas maitansinas adicionales incluyen también compuestos representados por la fórmula (IV-L), (IV-D), o (IV-D, L):



(IV-D,L) en donde:

Y representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$, en donde:

R1 y R2 son cada uno de manera independiente CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocíclico, y además R2 puede ser H;

R3, R4, R5, R6, R7 y R8 son cada uno de manera independiente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocíclico;

l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0;

Z es H, SR o -COR en donde R es alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, o simple o arilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocíclico;

May representa un maitansinoide que tiene la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetil, C-15 hidroxil o C-20 desmetil.

Modalidades preferidas de las fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D, L) incluyen compuestos de las fórmulas (IV-L), (IV-D) y (IV-D, L) en donde:

R1 es metilo, R2 es H, R5, R6, R7, y R8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es H.

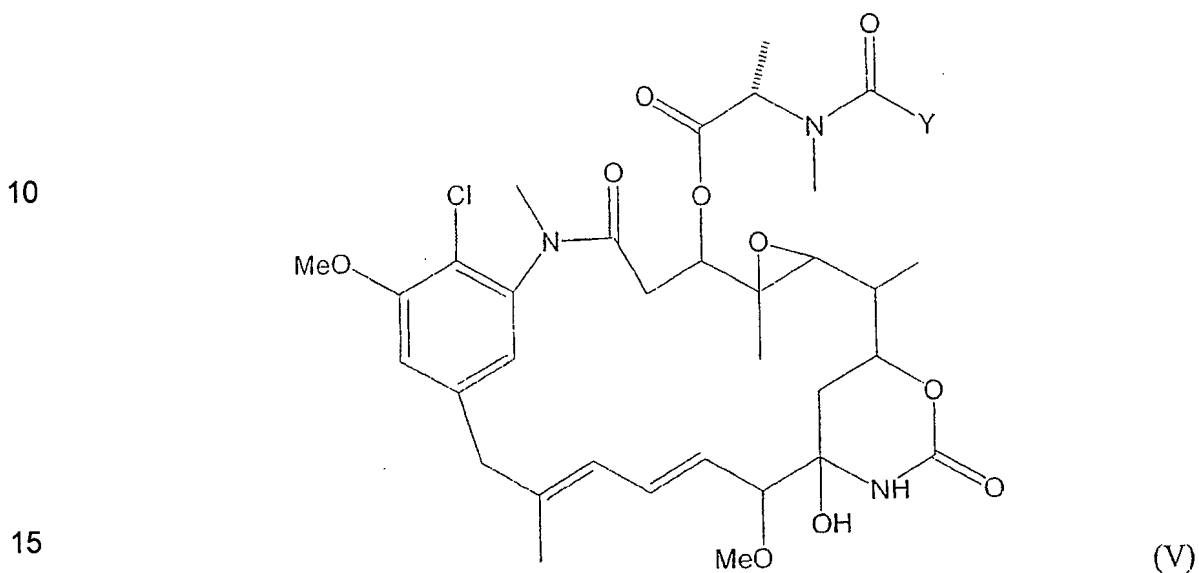
R1 y R2 son metilo, R5, R6, R7, R8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es H.

R1 es H, R2 es metilo, R5, R6, R7, y R8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

R1 es metilo, R2 es H, R5, R6, R7, R8 son cada uno H, I y m son 1, n es 0, y Z es -SCH3.

De manera preferible el agente citotóxico está representado por la fórmula (IV-L).

5 Dichas maitansinas adicionales incluyen también los compuestos representados por la fórmula (V):



en donde:

Y representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$, en donde:

20 R1 y R2 son cada uno de manera independiente CH3, C2H5, alquilo o alquenilo lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocíclico y además R2 puede ser H;

25 R3, R4, R5, R6, R7 y R8 son cada uno de manera independiente H, CH3, C2H5, alquilo o alquenilo lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o radical

heterocíclico;

l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0; y

Z es H, SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, o simple o arilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocíclico modalidades preferidas de la fórmula (V) incluyen compuestos de la fórmula (V) en donde:

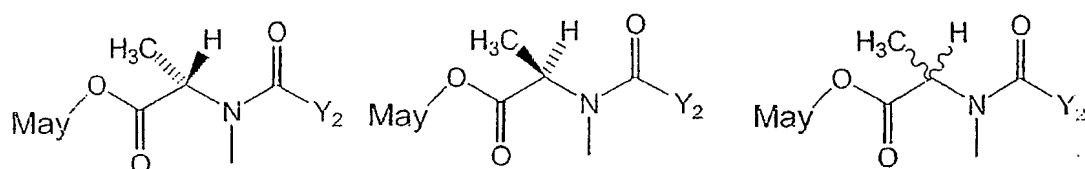
R1 es metilo, R2 es H, R5, R6, R7, y R8 son cada uno H; l y m son cada uno 1; n es 0; y Z es H.

R1 y R2 son metilo; R5, R6, R7, R8 son cada uno H, l y m son 1; n es 0; y Z es H.

R1 es metilo, R2 es H, R5, R6, R7, y R8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es -SCH3.

R1 y R2 son metilo, R5, R6, R7, R8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH3.

Dichas maitansinas adicionales incluyen además compuestos representados por la fórmula (VI-L), (VI-D), o (VI-D, L):



(VI-L)

(VI-D)

(VI-D, L)

en donde:

Y2 representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$

en donde:

R1 y R2 son cada uno de manera independiente CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocíclico, y además R2 puede ser H;

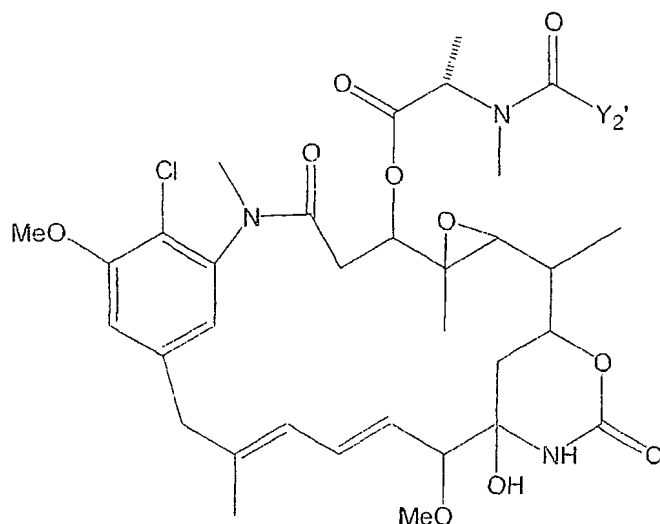
R3, R4, R5, R6, R7 y R8 son cada uno de manera independiente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo cíclico lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocíclico;

l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0;

Z2 es SR o COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, o simple o arilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocíclico; y

May es un maitansinoide.

Dichas maitansinas adicionales incluyen también compuestos representados por la fórmula (VII):

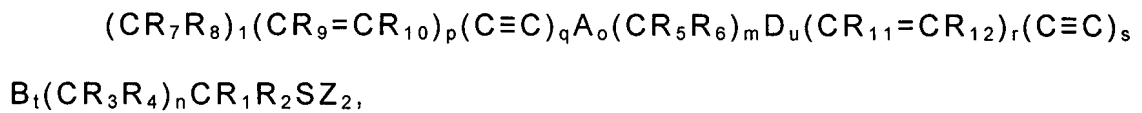


(VII)

62 58

5

Y2' representa



10

en donde:

R1 y R2 son cada uno de manera independiente CH3, C2H5, alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocíclico, y además R2 puede ser H;

15

A, B, y D es cada uno de manera independiente cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, simple o arilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocíclico;

20

R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, y R12 son cada uno de manera independiente H, CH3, C2H5, alquilo o alquenilo lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocíclico

25

l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno de manera independiente 0 o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero en ningún momento; y

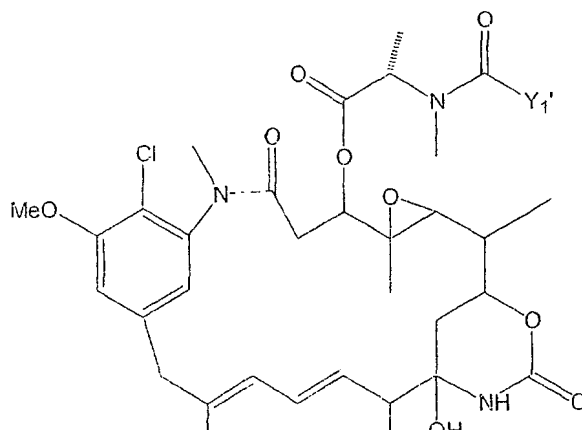
63 59

Z2 is SR o -COR, en donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene 3-10 átomos de carbono, o simple o arilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocíclico.

5 Modalidades preferidas de la fórmula (VII) incluyen compuestos de la fórmula (VII) en donde: R1 es metilo y R2 es H.

Los maitansinoides antes mencionados pueden ser conjugados para el anticuerpo DS6 anti-CA6, o un homólogo o fragmento del mismo, en donde el anticuerpo está enlazado al maitansinoide usando la funcionalidad tiol o disulfuro que está presente en el grupo acilo de una cadena lateral de amino ácido acilatada encontrada en C-3, C-14 hidroximetil, C-15 hidroxil o C-20 desmetil del maitansinoide, y en donde el grupo acilo de la cadena lateral de amino ácido acilatada tiene su funcionalidad tiol o disulfuro ubicada en un átomo de carbono que tiene uno o dos sustituyentes, dichos sustituyentes que son CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocíclico, y además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de por lo menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

Un conjugado preferido de la presente invención es uno que comprende el anticuerpo DS6 anti-CA6, o un homólogo o fragmento del mismo, conjugado para un maitansinoide de la fórmula (VIII):

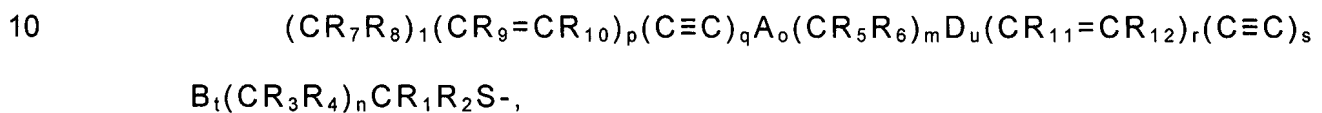


62 60

5

en donde:

Y1' representa



en donde:

A, B, y D, es cada uno de manera independiente cicloalquilo
 o cicloalquenilo que tiene 3-10 átomos de carbono, simple o arilo
 15 sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocíclico

R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, y R12 son cada uno
 de manera independiente H, CH3, C2H5, alquilo o alquenilo lineal
 que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo
 ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono,
 20 fenilo, fenilo sustituido o radical aromático heterocíclico o
 heterocíclico; y

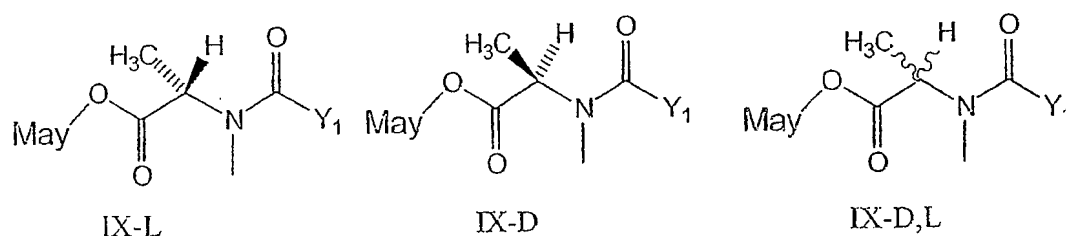
l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno de manera
 independiente 0 o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que
 por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero en ningún
 25 momento.

De manera preferible, R1 es metilo y R2 es H o R1 y R2 son
 metilo.

Un conjugado aún más preferido de la presente invención es

65-61

uno que comprende el anticuerpo DS6 anti-CA6, o un homólogo o fragmento del mismo, conjugado para un maitansinoide de la fórmula (IX-L), (IX-D), o (IX-D,L):



10 en donde:

Y1 representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$,

en donde:

R1 y R2 son cada uno de manera independiente CH3, C2H5, alquilo o alquenilo lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo, y además R2 puede ser H;

R3, R4, R5, R6, R7 y R8 son cada uno de manera independiente H, CH3, C2H5, alquilo o alquenilo lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocíclico;

l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0; y

25 May representa un maitansinol que tiene la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetil, C-15 hidroxil o C-20 desmetil.

Modalidades preferidas de las fórmulas (IX-L), (IX-D) y (IX-D, L) incluyen compuestos de las fórmulas (IX-L), (IX-D) y (IX-D,

L) en donde:

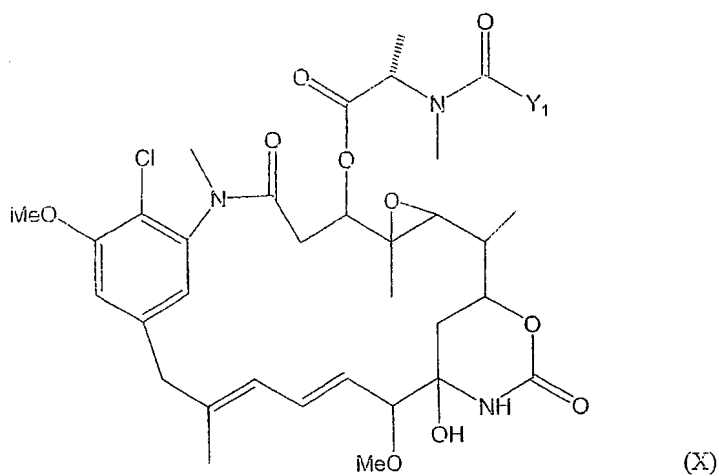
R1 es metilo y R2 es H o R1 y R2 son metilo,

R1 es metilo, R2 es H, R5, R6, R7 y R8 son cada uno H; l y m son cada uno 1; n es 0,

5 R1 y R2 son metilo; R5, R6, R7 y R8 son cada uno H; l y m son 1; n es 0.

De preferencia el agente citotóxico está representado por la fórmula (IX-L).

10 Un conjugado preferido adicional de la presente invención es uno que comprende el anticuerpo DS6 anti-CA6, o un homólogo o fragmento del mismo, conjugado para un maitansinoide de la fórmula (X):



En donde los sustituyentes son como se definió antes para la fórmula (IX) anterior.

25 Son especialmente preferidos cualquiera de los compuestos antes descritos, en donde R1 es H, R2 es metilo, R5, R6, R7 y R8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, y n es 0.

Son especialmente preferidos de manera adicional cualquiera

de los compuestos antes descritos, n donde R1 y R2 son metilo, R5, R6, R7, R8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0.

Se prefiere además el esterisómero de L-aminoacilo.

Cada uno de los maitansinoides enseñados en la solicitud de patente de los Estados Unidos de Norteamérica pendiente número 10/849,136, presentada el 20 de mayo de 2004, también pueden ser utilizados en el conjugado citotóxico de la presente invención. La descripción completa de la solicitud de patente de los Estados Unidos de Norteamérica número 10/849,136 está incorporada a la presente mediante referencia.

Grupos de enlace que contienen disulfuro

A fin de enlazar el maitansinoide a un agente de enlace celular, tal como el anticuerpo DS6, el maitansinoide comprende una porción de enlace. La porción de enlace contiene un enlace químico que permite la liberación de maitansinoides totalmente activos en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen enlace disulfuro, enlaces lábiles de ácido, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles de peptidasa y enlaces lábiles de esterasa. Se prefieren los enlaces de disulfuro.

La porción de enlace comprende también un grupo químico reactivo. En una modalidad preferida, el grupo químico reactivo puede ser enlazado de manera covalente al maitansinoide por medio de una porción de enlace del enlace de disulfuro.

Los grupos químicos reactivos particularmente preferidos son ésteres de N-succinimidilo y ésteres de N-sulfosuccinimidilo.

Los maitansinoides particularmente preferidos que

comprenden una porción de enlace que contiene un grupo químico reactivo son ésteres C-3 de maitansinol y sus análogos en donde la porción de enlace contiene un enlace disulfuro y el grupo químico reactivo comprende un éster de N succinimidilo o de N-sulfosuccinimidilo.

Muchas posiciones en los maitansinoides pueden servir como la posición para enlazar químicamente la porción de enlace. Por ejemplo, se espera que la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo sean útiles. Sin embargo, se prefiere la posición C-3 y la posición C-3 del maitansinol es especialmente preferida.

En tanto que la síntesis de los ésteres de maitansinol que tienen una porción de enlace se describe en términos de porciones de enlace que contienen enlace de disulfuro, alguien con experiencia en la técnica comprenderá que las porciones de enlace con otros enlaces químicos (como se describió antes) también se pueden utilizar con la presente invención, como los pueden hacer otros maitansinoides. Los ejemplos específicos de otros enlaces químicos incluyen enlaces lábiles de ácido, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles de peptidasa y enlaces lábiles de esterasa. La descripción de la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,208,020, incorporada a la presente, enseña la producción de maitansinoides que tiene dichos enlaces.

La síntesis de maitansinoides y derivados de maitansinoide que tienen una porción disulfuro que ostenta un grupo reactivo se describe en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 6, 441,163 y 6,333,410, y la Solicitud de los Estados Unidos

de Norteamérica No. 10/161, 651, cada una de las cuales está incorporada a la presente mediante referencia.

Los maitansinoides que contienen el grupo reactivo, tales como Demi, se hacen reaccionar con un anticuerpo, tal como el anticuerpo DS6, para producir conjugados citotóxicos. Esos conjugados pueden ser purificados por medio de HPLC o por filtración de gel.

Varios esquemas excelentes para la producción de dichos conjugados anticuerpo-maitansinoide se proporcionan en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica 6,333,410, y las Solicitudes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 09/867,598, 10/161,651 y 10/024,290, cada una de las cuales está incorporada a la presente en su totalidad.

En general, una solución de un anticuerpo en regulador de pH acuoso puede ser incubada con un exceso molar de maitansinoides que tiene una porción disulfuro que ostenta un grupo reactivo. La mezcla de reacción puede ser extinguida por medio de la adición e amina en exceso (tal como etanolamina, taurina, etc.). el conjugado maitansinoide-anticuerpo puede entonces ser purificado por medio de filtración de gel.

El número de moléculas de maitansinoide enlazadas por molécula de anticuerpo se puede determinar a través de la medición espectrofotométrica de la relación de la absorbancia a 252 nm y 280 nm. Se prefiere un promedio de 1-10 moléculas de maitansinoide/moléculas de anticuerpo.

Los conjugados de anticuerpos con fármacos de maitansinoide pueden ser evaluados para su habilidad para suprimir la proliferación de varias líneas celulares indeseables in

vitro. Por ejemplo, la línea celular tal como la línea de carcinoma epidermoide humano A-431, la línea celular de cáncer de pulmón de célula pequeña humana SW2, la línea de tumor de seno humano SKBR3 y la línea de linfoma de Burequipot Namalwa pueden ser utilizadas con facilidad para la determinación de la citotoxicidad de estos compuestos. Las células que van a ser evaluadas pueden estar expuestas a los compuestos durante 24 horas y las fracciones supervivientes de las células medidas en ensayos directos a través de métodos conocidos. Los valores IC_{50} pueden ser calculados después a partir de los resultados de los ensayos.

Grupos de enlace que contienen PEG

Los maitansinoides también pueden ser enlazados a agentes de enlace celular utilizando grupos de enlace PEG, como se establece en la Solicitud de los Estados Unidos de Norteamérica No. 10/024,290. Esos grupos de enlace PEG son solubles tanto en agua como en solventes no acuosos, y pueden ser utilizados para unir uno o más agentes citotóxicos a un agente de enlace celular. Los grupos de enlace PEG ilustrativos incluyen enlazadores PEG hetero-bifuncionales que se enlazan a agentes citotóxicos y agentes de enlace celular en extremos opuestos de los enlazadores a través de un grupo sulfhidrilo o disulfuro funcional en un extremo, y un éster activo en el otro extremo.

Como un ejemplo general de la síntesis de un conjugado citotóxico utilizando un grupo de enlace PEG, se hace referencia de nuevo a la Solicitud de los estados Unidos de Norteamérica No. 10/024,290 para detalles específicos. La síntesis inicia con la

2, 67

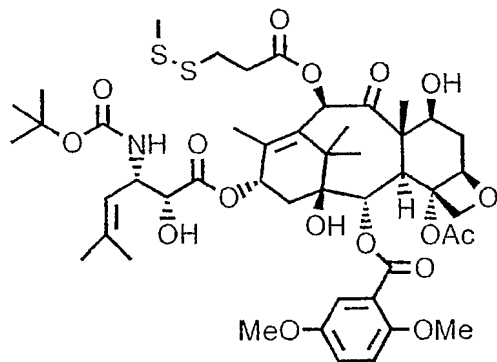
reacción de uno o más agentes citotóxicos que ostentan una porción PEG reactiva con un agente de enlace celular, resultando en el desplazamiento del éster activo terminal de cada porción PEG reactiva por medio del residuo de amino ácido del agente de enlace celular, para producir un conjugado citotóxico que comprende uno o más agentes citotóxicos enlazados de manera covalente a un agente de enlace celular a través de un grupo de enlace PEG.

10 Taxanos

El agente citotóxico usado en los conjugados citotóxicos de acuerdo con la presente invención también pueden ser un taxano o derivado del mismo.

15 Los taxanos son una familia de compuestos que incluye paclitaxel (Taxol), un producto natural citotóxico, y docetaxel (Taxotere), un derivado a semi-sintético, dos compuestos que son ampliamente utilizados en el tratamiento del cáncer. Los taxanos son venenos de eje mitótico que inhiben la despolimerización de
20 tubulina, dando como resultado la muerte celular. En tanto que docetaxel y paclitaxel son agentes útiles en el tratamiento del cáncer, su actividad antitumoral es limitada debido a su toxicidad no específica hacia las células normales. Además, los compuestos como paclitaxel y docetaxel en si mismos no son suficientemente
25 potentes para ser utilizados en conjugados de agentes de enlace celular.

Un taxano preferido para el uso en la preparación de conjugados citotóxicos es el taxano de la fórmula (XI):



(XI)

Los métodos para la síntesis de taxanos que se pueden utilizar en los conjugados citotóxicos de la presente invención, junto con los métodos para conjugar los taxanos para los agentes de enlace celular tales como anticuerpos, se describen en detalle en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,416,064, 5,475,092, 6,340,701, 6,372,738 y 6,436,931, y en las Solicitudes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 10/024,290, 10/144,042, 10/207,814, 10/210,112 y 10/369,563.

Análogos CC-1065

El agente citotóxico utilizado en los conjugados citotóxicos de acuerdo con la presente invención también pueden ser CC-1065 o un derivado el mismo.

CC-1065 es un potente antibiótico anti-tumoral aislado a partir del caldo de cultivo de *Streptomyces zelensis*. CC-1065 es aproximadamente 1000-veces más potente in vitro que los fármacos anti-cáncer comúnmente utilizados, tales como doxorubicina, metotrexato y vincristina (B. K. Bhuyan et al. *Cáncer Res.*, 42, 3532-3537 (1982)). CC-1065 y sus análogos están

descritos en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 6,372,738, 6,340,701, 5,846,545 y 5,585,499.

La potencia citotóxica de CC-1065 ha sido correlacionada con su actividad de alquilación y su actividad de enlace-ADN o de intercalación-ADN. Esas dos actividades residen en partes separadas de la molécula. Por lo tanto, la actividad de alquilación está contenida en la subunidad de ciclopropapirrolindol (CPI) y la actividad de enlace-ADN reside en las dos subunidades de pirroloindol.

Aunque CC-1065 tiene ciertas características atractivas como un agente citotóxico, tiene limitaciones en el uso terapéutico. La administración de CC-1065 a ratones ocasionó una hepatotoxicidad retardada que condujo a la mortalidad en el día 50 después de una dosis intravenosa individual de 12.5 µg/kg {V. L. Reynolds et al., J. Antibiotics, XXIX, 319-334 (1986)}. Esto ha estimulado los esfuerzos para desarrollar análogos que no ocasionan toxicidad retrasada, y se ha descrito la síntesis de análogos más simples modelados en CC-1065 {M. A. Warpehoski et al., J. Med. Chem., 31,590-603 (1988)}.

En otra serie de análogos, la porción CPI fue reemplazada por una porción ciclopropabenzindol (CBI) {D. L. Boger et al., J. Org. Chem., 55, 5823-5833, (1990), D. L. Boger et al., BioOrg. Med. Chem. Lett., 1, 115-120 (1991)}. Esos compuestos mantienen la alta potencia in vitro del fármaco relacionado, sin ocasionar toxicidad retrasada en ratones. Al igual CC-1065, esos compuestos son agentes de alquilación que se enlazan al canal menor del ADN de una manera covalente para ocasionar la muerte celular. Sin embargo, la evaluación clínica de los análogos más promisorios,

Adozelesin y Carzelesin, ha conducido a resultados decepcionantes {B. F. Foster et al., Investigational New Drugs, 13,321-326 (1996); 1. Wolf et al., Clin. Cáncer Res., 2,1717-1723 (1996)}. Esos fármacos exhiben escasos efectos terapéuticos debido a su alta toxicidad sistémica.

La eficacia terapéutica de los análogos CC-1065 puede ser enormemente mejorada al cambiar la distribución in vivo a través del suministro dirigido hacia el sitio del tumor, dando como resultado una baja toxicidad para los tejidos no objetivo, y por lo tanto, menor toxicidad sistémica. Para lograr este objetivo, se han descrito los conjugados de análogos y derivados de CC-1065 con agentes de enlace celular que se dirigen de manera específica a las células tumorales {Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica; 5,475,092; 5,585,499; 5,846,545}. Esos conjugados exhibe comúnmente alta citotoxicidad específica de objetivo in vitro, y excepcional actividad anti-tumoral en modelos de xenoinjerto de tumor humano en ratones {R. V. J. Chari et al., Cáncer Res., 55, 4079-4084 (1995)}.

Los métodos para sintetizar análogos CC-1065 que pueden ser utilizados en los conjugados citotóxicos de la presente invención, junto con los métodos para la conjugación de los análogos para los agentes de enlace celular tales como anticuerpos, se describen en detalle en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,475,092, 5,846,545, 5,585,499, 6,534,660 y 6,586,618 y en las Solicitudes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 10/116,053 y 10/265,452.

Otros Fármacos

75 71

Fármacos tales como metotrexato, daunorubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, caliqueamicina, tubulisina y análogos de tubulisina, duocarmicina y análogos de duocarmicina, dolastatina y análogos de dolastatina también son adecuados para la preparación de conjugados de la presente invención. Las moléculas de fármaco también pueden ser enlazadas a las moléculas de anticuerpo a través de una molécula portadora intermediaria tal como albúmina del suero. Los compuestos de Doxorubicina y Danorubicina, como se describen, por ejemplo, en el documento de los Estados Unidos de Norteamérica No. de Serie 09/740991, también pueden ser útiles como agentes citotóxicos.

Composición terapéutica

La presente invención proporciona también una composición terapéutica que comprende:

- (a) una cantidad efectiva de uno o más conjugados citotóxicos, y
- (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

De manera similar, la presente invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células objetivo, o tejido que contiene células objetivo, con una cantidad efectiva de un conjugado citotóxico, o agente terapéutico que comprende un conjugado citotóxico, ya sea solo o en combinación con otros agentes citotóxicos o terapéuticos.

La presente invención comprende también un método para tratar a un sujeto que tiene cáncer utilizando la composición terapéutica de la presente invención.

Los conjugados citotóxicos pueden ser evaluados para potencia in vitro y especificidad a través de métodos previamente descritos (véase, por ejemplo, R. V. J. Chari et al, Cáncer Res. 55: 4079-4084 (1995)). La actividad anti-tumoral puede ser evaluada en modelos de xenoinjerto de tumor humano en ratones a través de métodos descritos también de manera previa (véase, por ejemplo., Liu et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8618-8623 (1996)).

Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos y pueden ser determinados por aquellos con experiencia en la técnica como las garantías de situación clínica. Como se utiliza en la presente, los portadores incluyen diluyentes y excipientes.

Los ejemplos de portadores, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) solución salina regulada en su pH con fosfato de Dulbecco, pH-7.4, que contiene o no aproximadamente 1 mg/ml hasta 25 mg/ml de albúmina de suero humano, (2) 0.9% solución salina (0.9% p/v cloruro de sodio (NaCl)), y (3) 5% (p/v) dextrosa; y puede contener también un antioxidante tal como triptamina y un agente estabilizador tal como Tween 20.

El método para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas se puede practicar in vitro, in vivo, o ex vivo. Como se utiliza en la presente, inhibir el crecimiento significa hacer más lento el crecimiento de una célula, disminuir la viabilidad celular, ocasionar la muerte de una célula, lisis de una célula e inducir la muerte celular, ya sea en un período corto o

largo.

Los ejemplos de usos in vitro incluyen tratamientos de medula ósea autóloga antes de su transplante dentro del mismo paciente a fin de eliminar las células enfermas o malignas; tratamientos médula ósea antes de su transplante para eliminar células T competentes y evitar la enfermedad injerto contra huésped (GVHD); tratamiento de cultivos de célula para eliminar todas las células excepto las variantes deseadas que no expresan el antígeno objetivo; o para eliminar variantes que expresan el antígeno indeseable.

Las condiciones de uso in-vitro no-clínico son fácilmente determinadas por alguien con experiencia en la técnica.

Los ejemplos de uso ex vivo clínico son para remover células tumorales o células linfóides de la medula ósea antes del transplante autólogo en tratamiento del cáncer o en tratamiento de enfermedad autoinmune, o para retirar células T y otras células linfoides desde médula ósea autóloga o alogénica o tejido antes del transplante a fin de evitar la enfermedad injerto contra huésped (GVHD). El tratamiento se puede llevar a cabo como sigue. La médula ósea es cosechada desde el paciente u otro individuo y después incubada en medio que contiene suero al cual se agrega el agente citotóxico de la invención. Las concentraciones varían desde aproximadamente 10 μ M hasta 1 pM, durante aproximadamente 30 minuto hasta aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37°C. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación, s decir, la dosis, son determinadas fácilmente por alguien con experiencia en la técnica. Después de la incubación las células de medula ósea son lavadas

28 24

con medio que contiene suero y son devueltas al paciente mediante infusión intravenosa de acuerdo con métodos conocidos. En circunstancias en donde el paciente recibe otro tratamiento tal como un curso de quimioterapia ablativa o irradiación corporal completa entre el tiempo de cultivo de la médula y la reinfusión de las células tratadas, las células de médula tratadas se almacenan congeladas en nitrógeno líquido utilizando equipo médico estándar.

Para uso in vivo clínico, el conjugado citotóxico de la invención será suministrado como soluciones que son probadas para esterilidad y niveles de endotoxina. Los ejemplos de protocolos adecuados de administración de conjugado citotóxico son como sigue. Los conjugados son dados semanalmente durante 4 semanas como un bolo intravenoso cada semana. Las dosis de bolo son dadas en 50 hasta 100 ml de solución salina normal a la cual pueden agregarse de 5 hasta 10 ml de albúmina de suero humano. Las dosis serán de hasta 10 μ g hasta 100 mg por administración, i. v. (rango de 100 ng hasta 1 mg/kg por día). De manera más preferible, las dosis variarán desde 50 μ g hasta 30 mg. De manera más preferible, las dosis variarán desde 1 mg hasta 20 mg. Después de cuatro semanas de tratamiento, el paciente puede continuar recibiendo el tratamiento en una base semanal. Los protocolos clínicos específicos con respecto a la ruta de administración, excipientes, diluyentes, dosis, horarios, etc., pueden ser determinados por alguien con experiencia en la técnica como las garantías de situación clínica.

Ejemplos de condiciones médicas que pueden ser tratadas de acuerdo con los métodos in vivo o ex vivo de eliminación de

poblaciones celulares seleccionadas incluyen la malignidad de cualquier tipo incluyendo, por ejemplo, cáncer del pulmón, seno, colon, próstata, riñón, páncreas, ovario, cervix y órganos linfáticos, osteosarcoma, carcinoma sinovial, un sarcoma o un carcinoma en la cual CA6 es expresado y otros cánceres aún por determinar en los cuales el glicótopo CA6 es expresado de manera predominante; enfermedades autoinmunes, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide, y esclerosis múltiple; rechazos de injerto, tal como rechazo de trasplante renal, rechazo de transplante hepático, rechazo de transplante de pulmón, rechazo de transplante cardíaco, y rechazo de transplante de médula ósea; enfermedad de injerto contra huésped; infecciones virales, tales como infección de mV, infección de VIH, SIDA, etc.; e infecciones parasitarias, tales como giardiasis, amibiasis, esquistosomiasis, y otras como ,lo determine alguien con experiencia en la técnica.

Equipo

La presente invención incluye también equipos, por ejemplo, que comprenden un conjugado citotóxico e instrucciones descritos para uso del conjugado citotóxico para eliminación de tipos de célula particulares. Las instrucciones pueden incluir direcciones para uso de los conjugados citotóxicos in vitro, in vivo o ex vivo.

Comúnmente, el equipo tendrá un compartimiento que contiene el conjugado citotóxico. El conjugado citotóxico puede estar en una forma liofilizada, forma líquida, u otra forma corregible para ser incluidos en un equipo. El equipo puede contener elementos adicionales necesarios para la práctica del

97 96

método descrito en las instrucciones en el equipo, tal como una solución esterilizada para reconstituir un polvo liofilizado, agentes adicionales para combinación con el conjugado citotóxico antes de la administración a un paciente, y herramientas que ayudan a la administración del conjugado a un paciente.

Modalidades Adicionales

La presente invención proporciona además anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados y fragmentos de enlace de epítotope de los mismos que son etiquetados adicionalmente para uso en aplicaciones de investigación y diagnóstico. En modalidades preferidas, la etiqueta es una radioetiqueta, un fluoróforo, a cromóforo, un agente de formación de imagen o un ión metálico.

Se proporciona también un método para el diagnóstico en el cual los anticuerpos etiquetados o fragmentos de enlace de epítotope de los mismos son administrados a un sujeto que se sospecha que tiene un cáncer, y se mide o monitorea la distribución de la etiqueta dentro del cuerpo del sujeto.

Ejemplos

El amplio alcance de esta invención se comprende mejor con referencia a los siguientes ejemplos, los cuales no están destinados a limitar la invención a modalidades específicas.

Ejemplo 1: Identificación de líneas celulares antígeno positivas y antígeno negativas por medio de ensayos de enlace de citometría de flujo

5

10

15

20

25

Los ensayos de citometría de flujo fueron utilizados para localizar el epítipo DS6, CA6, para la superficie de celular. Las líneas celulares humanas se obtuvieron a partir de la American Type Culture Collection (ATCC) con excepción de las células OVCAR5 (Kearse et al., Int. J. Cáncer 88 (6): 866-872 (2000)), OVCAR8 y IGROV1 (M. Seiden, Massachusetts General Hospital). Todas las células fueron cultivadas en RPMI 1640 complementado con 4 mM L-glutamina, 50 U/ml penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin (Cambrex Bio Science, Rockland, ME) y 10%v/v de suero fetal bovino (Atlas Biologicals, Fort Collins, CO), referido en lo sucesivo en la presente como el medio de cultivo. Las células fueron mantenidas en un incubador humidificado a 37°C, 5% CO₂.

Las células ($1-2 \times 10^{-5}$ células/pozo) fueron incubadas en hielo durante 3-4 horas, con concentraciones diluidas de manera serial del anticuerpo DS6 preparadas en un regulador de pH FACS (2% suero de cabra, RPMI) en placas de 96 pozos. Las células fueron centrifugadas en una centrífuga de tablero a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Después de remover el medio, los pozos fueron rellenados con 150 µl de regulador de pH FACS. La etapa de lavado se repitió después. IgG cabra anti-ratón FITC-etiquetado (Jackson hnmunoresearch) fue diluido 1:100 para regulador de ph FACS e incubado con las células durante 1 hora sobre hielo. La placa fue cubierta en lámina metálica para evitar el fotoblanqueo

de la señal. Después de dos lavados, las células fueron fijadas con 1% formaldehído y analizadas en un citómetro de flujo.

De manera predominante, el epítipo fue encontrado en líneas celulares de origen en ovárico, mamario, cervical, y pancreático (Cuadro 3) como se pronosticó a partir de la inmunohistoquímica de tumor. Sin embargo, algunas líneas celulares de otros tipos de tumor exhibieron expresión limitada de CA6. El anticuerpo DS6 se enlaza con un K_D aparente de 135.6 pM (en células PC-3, Cuadro 3). La fluorescencia media máxima (Cuadro 3) de las curvas de enlace (Figura 1) en las líneas celulares antígeno positivas es sugerente de la densidad de antígeno relativa.

Cuadro 3

Línea Celular	Tejido	Antígeno	MMF*	Kd Aparente (M)	Línea Celular	Tejido	Antígeno	MMF*	Kd Aparente (M)
HL-60	Sangre	-			Caov-3	Ovario	+	465.20	5.478×10^{-09}
Jurkat	Sangre	-			Caov-4	Ovario	+	149.00	4.043×10^{-09}
Namalwa	Sangre	-			ES-2	Ovario	-		
U-937	Sangre	-			IGROV1	Ovario	-		
T98G	Cerebro	+	35.94	1.775×10^{-10}	OV-90	Ovario	-		
BT-20	Seno	+	232.20	9.142×10^{-10}	OVCAR-3	Ovario	-		
BT-474	Seno	-			OVCAR5	Ovario	+	97.10	1.473×10^{-09}
BT-483	Seno	+	1911.00	1.366×10^{-09}	OVCAR8	Ovario	-		
BT-549	Seno	+	71.39	1.046×10^{-09}	PA-1	Ovario	-		
CAMA-1	Seno	+	12.46	2.330×10^{-09}	SK-OV-3	Ovario	-		
MCF-7	Seno	+	81.41	2.890×10^{-09}	SW 626	Ovario	-		
MDA-MB-157	Seno	+	8.635	1.972×10^{-10}	TOV-112D	Ovario	-		
MDA-MB-231	Seno	+	31.85	1.460×10^{-09}	TOV-21G	Ovario	+	87.79	3.067×10^{-10}
MDA-MB-468	Seno	+	71.58	8.127×10^{-10}	AsPC-1	Páncreas	-		
SK-BR-3	Seno	-			BxPC-3	Páncreas	+	79.99	5.263×10^{-09}
T-47-D	Seno	+	559.58	3.424×10^{-09}	HPAC	Páncreas	+	2228.0	2.348×10^{-08}
ZR-75-1	Seno	+	811.67	4.229×10^{-09}	HPAF-II	Páncreas	+	266.50	2.811×10^{-09}
HeLa	Cervix	+	242.50	6.938×10^{-10}	Hs766T	Páncreas	+	182.90	2.319×10^{-09}
KB	Cervix	+	119.56	1.110×10^{-09}	MIAPaCa2	Páncreas	-		
WISH	Cervix	+	1133.55	2.380×10^{-09}	MPanc96	Páncreas	-		
Colo25	Colon	-			SU.86.86	Páncreas	+	36.86	1.043×10^{-09}
DLD-1	Colon	-			SW1990	Páncreas	+	36.17	3.679×10^{-10}
HCT-8	Colon	-			PC-3	Próstata	+	24.81	1.356×10^{-10}
HT-29	Colon	-			A375	Piel	-		
Cak-1	Riñón	-			SKMEL28	Piel	-		
A549	Pulmón	-			KLE	Útero	-		
SW2	Pulmón	-							

* fluorescencia media relative maxima promedio

Ejemplo 2: Caracterización de Epítipo DS6

Las propiedades del antígeno DS6, CA6, fueron analizadas por medio de inmunotinción de las tinciones de punto de lisados

2379

de célula CA6-positivas (CaoV-3) que fueron digeridas con tratamientos proteolítico (pronasa y proteinasa K) y/o glicolítico (neuramidasa y ácido periódico). Para controles positivos, otros anticuerpos que reconocen una variedad de tipos de epítotope fueron probados e lisados de líneas celulares antígeno positivas (Caov-3 y CM1; Colo205 y C242; SKMEL28 y R24). CM1 es un anticuerpo que reconoce un epítotope de proteína del dominio de repetición tandem de número variable (VNTR) de Muc-1 y por lo tanto, proporciona un control para un epítotope de proteína. C242 enlaza a un glicótotope dependiente de ácido siálico específico de cáncer colorectal novedoso sobre Muc-1 (CanAg) que proporciona un control para un glicótotope sobre una proteína, R24 se enlaza a la gangliósido GD3 que es específico para melanoma y proporciona por lo tanto un control para un glicótotope sobre un andamio no-proteína.

Las células Caov-3, Colo205, y SKMEL28 fueron colocadas en placas en placas de cultivo de tejido de 15 cm. El medio de cultivo (30 mL/placa) fue renovado el día anterior a la lisis. Un regulador de pH RIPA modificado (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP40, 0.25% deoxicolato de sodio), inhibidores de proteasa (PMSF, Pepstatina A, Leupeptina, y Aprotinina), y PBS fueron pre-enfriado sobre ice. Después el medio de cultivo fue aspirado desde las placas, las células fueron lavadas dos veces con 10 ml PBS enfriado. Todas las etapas subsecuentes fueron conducidas sobre hielo y/o en un cuarto vacío a 4°C. Después de que fue aspirado el ultimo lavado de PBS, las células fueron lisadas en 1-2 mL de regulador de lisis (regulador de pH RIPA con inhibidores de proteasa recién agregados para

una concentración final de 1 mM PMSF, 1 μ M Pepstatina A, 10 μ g/ml Leupeptina, y 2 μ g/ml Aprotinina). Los lisados fueron raspados de las placas usando un separador celular y triturados mediante pipeteo de las suspensiones hacia arriba y hacia abajo (5-10 veces) con una aguja 1EG. Los lisados fueron sometidos a rotación durante 10 min y después centrifugados en una microcentrífuga a un máximo de (13K rpm) durante 10 minutos. Las pellas fueron descartadas y los sobrenadantes fueron probados después utilizando un equipo de prueba Bradford Protein (Biorad).

Los lisados (2 μ l fueron pipeteados directamente sobre 0.2 μ m de membranas de nitrocelulosa secas. Se permitieron las marcas para secado de aire durante aproximadamente 30 minutos. La membrana fue seccionada en piezas que contenían cada una marca individual. Las marcas fueron incubadas en presencia de pronasa (1 mg/ml enzima, 50 mM Tris pH 7.5, 5 mM CaCl_2), proteinasa K (1 mg/ml enzima, 50 mM Tris pH 7.5, 5 mM CaCl_2), neuraminidasa (20 mU/ml enzima, 50 mM acetato de sodio pH 5.5, 5 mM CaCl_2 , 100 μ g/ml BSA) o ácido periódico (20 mM, 0.5M acetato de sodio pH 5) durante 1 hora a 37°C. Los reactivos fueron adquiridos con Roche (enzimas) y VWR (ácido periódico). Las membranas fueron lavadas (5 min) en regulador de lavado T-TBS (0.1% Tween 20, 1 X TBS), bloqueadas en regulador de bloqueo (3% BSA, T-TBS) durante 2 horas a temperatura ambiente, e incubadas durante la noche con 2 μ g/ml de anticuerpo primario (es decir DS6, CM1, C242, R24) en regulador de bloqueo a 4°C. Las membranas fueron lavadas tres veces durante 5 minutos en T-TBS y después incubadas en anticuerpo secundario IgG de cabra-anti-ratón HRP-conjugado (o humano) (Jackson ImmunoResearch; 1:

2000 dilución en regulador de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las inmunotinciones fueron lavadas utilizando un sistema ECL (Amersham).

Las inmunotinciones (Figura 2) de los lisados de control digeridos mostraron que la señal CM1 fue destruida por los tratamientos proteolíticos en tanto que las señales de los digeridos glicolíticos no fueron afectadas como se esperaría para un anticuerpo que reconoce un epítipo de proteína. La señal C242 fue destruida por los tratamientos proteolítico o glicolítico como se esperaría para un anticuerpo que reconoce un glicótipo encontrado en una proteína. La señal R24, no afectada por los tratamientos proteolíticos, fue abolida con tratamientos de neuraminidasa o periodato como se espera para un anticuerpo que reconoce un gangliosido. La inmunotinción DS6 de las tinciones de punto del lisado Caov-3 digerido mostraron pérdida de señal al tratamiento con los compuestos proteolíticos y glicolíticos. Por lo tanto, al igual que C242, DS6 se enlaza a un epítipo de carbohidrato en un núcleo proteinaceo. Además, la señal en la inmunotinción DS6 fue sensible tratamiento neuraminidasa. Por lo tanto, CA6, al igual que CanAg, es un glicótipo dependiente de ácido siálico.

A fin de confirmar la naturaleza de carbohidrato de CA6, el lisado Caov-3 fue marcado sobre membrana PVDF y tratado con el agente de deglicosilación química, ácido trifluorometansulfónico (TFMSA), bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 5 minutos. La tinción fue lavada con T-TBS e inmunoteñida con CM1 o DS6 (Figura 3). La señal DS6 fue destruida al tratamiento con ácido proporcionando evidencia adicional de que CA6 es un

glicótopo. La mejoría de la señal CM1 con el tratamiento TFSMA indica que el tratamiento con ácido no afecta la proteína sobre el filtro y sugiere que el tratamiento glicolítico no enmascarado del epítipo de proteína reconocido por CM1.

5 Para aclarar de manera adicional la estructura del carbohidrato sobre el cual reside CA6, las tinciones de punto fueron digeridas con N-glicanasa, O-glicanasa, y/o sialidasa (Figura 4). Los lisados celulares Caov-3 (100 µg, 30 µl) fueron incubados a 100°C durante 5 minutos con 2.5 µl de regulador de
10 desnaturalización (Glyko) que contiene SDS y β-mercaptoetanol. Los lisados desnaturalizados fueron digeridos después como 1 µl de N-glicanasa, O-glicanasa, y/o Sialidasa A (Glyko) a 37°C durante 1 hora. Los lisados digeridos fueron marcados después (2 µl) sobre nitrocelulosa e inmunoteñidos como se describió con
15 anterioridad.

 La N-glicanasa no tuvo efecto aparente sobre las señales de inmunotinción DS6. Sin embargo, las muestras digeridas con sialidasa no produjeron señal. Debido a que la O-glicanasa no puede digerir carbohidratos O-enlazados sialiatados sin
20 tratamiento previo con sialidasa, la señal DS6 de las muestras procesadas con O-glicanasa sola no sería afectada. La N-glicanasa, en contraste, no requiere pretratamiento con enzimas glicosídicas para actividad. El hecho de que el tratamiento de N-glicanasa no afecta la señal DS6 sugiere que epítipo CA6 está
25 presente con mayor probabilidad en cadenas de carbohidrato O-enlazado sialiatado.

Ejemplo 3: Aclaración del antígeno sobre el cual se encuentra el

epítoto CA6

Para identificar el antígeno sobre el cual se encuentra el sialoglicótopo CA6, los inmunoprecipitados DS6 fueron analizados mediante SDS-PAGE y tinción Western. Los sobrenadantes de lisado celular (1 mL/muestra; 3-5 mg proteína) fueron pre-aclarados con lechos de Proteína G (30 µl, equilibrados con 1 ml de regulador RIPA, durante 1-2 h, con rotación a 4°C. Todas las etapas subsecuentes fueron conducidas sobre hielo y/o en un cuarto enfriado a 4°C. Los lechos pre-aclarados fueron sometidos a giro brevemente (2-3 s) en una microcentrífuga. Los sobrenadantes pre-aclarados fueron transferidos a tubos nuevos e incubados durante la noche con 2 µg de DS6, con rotación. Se agregaron lechos nuevos de Proteína G, equilibrados (30 µl) a los lisados e incubados durante 1 hora, con rotación. Las suspensiones lecho-lisado fueron sometidas a giro brevemente en una microcentrífuga y se tomaron muestras de los lisados post-inmunoprecipitación de manera opcional. Los lechos fueron lavados 5-10 veces con 1 mL de regulador RIPA.

Las muestras de DS6 inmunoprecipitadas fueron digeridas después con 30 µl neuraminidasa (20 mU neuraminidasa (Roche), 50 mM acetato de sodio pH 5, 5 mM CaCl₂, 100 pg/ml BSA) o 30 µl ácido periódico (20 mM ácido periódico (VWR), 0.5M acetato de sodio pH 5) durante 1 hora a 37°C. Fueron suspendidos de nuevo en 30 µl de regulador de carga de muestra 2X (que contiene (3-mercaptopetanol). Los lechos fueron sometidos a ebullición durante 5 minutos y los sobrenadantes del regulador de carga fueron cargados sobre geles 4-12% o 4-20% Tris- Glycine (Invitrogen).

Los geles fueron operados en regulador de operación de electroforesis Laemmli a 125 V durante 1.5 h. Las muestras de gel fueron transferidas, durante la noche a 20 mA, sobre membranas de nitrocelulosa de 0.2 μm (Invitrogen) usando un aparato e transferencia Mini Trans-blot (Biorad). Las membranas fueron inmunoteñidas con DS6 como se describió antes en el Ejemplo 2.

De manera alternativa, los lechos inmunoprecipitados fueron desnaturalizados primero y después digeridos enzimáticamente con N-glicanasa, O-glicanasa y/o sialidasa A (Glyko). Los lechos fueron resuspendidos en 27 μl de regulador de incubación y 2 μl de solución de desnaturalización (Glyko) e incubados a 100°C durante 5 minutos. Después del enfriamiento a temperatura ambiente, se agregó la solución detergente (2 μl) y las muestras fueron incubadas con 1 μl de N-glicanasa, O-glicanasa, y/o Sialidasa A a 37°C durante 4 horas. Después de agregar el regulador de carga de muestra 5X (7 μl), las muestras fueron sometidas a ebullición durante 5 minutos. Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE e inmunoteñidas como se describió antes.

Los inmunoprecipitados DS6 a > 250 kDa de banda de proteína pueden verse en los lisados de célula antígeno positiva (Figura 5A, B, y C). En algunas líneas celulares (por ejemplo T-47D), se observa un doblete. Se abolió la banda > 250 kDa en inmunoprecipitados Caov-3 que fueron tratados con neuraminidasa o ácido periódico (Figura 5 A y B) sugiriendo que el epítipo CA6 reside en la banda > 250 kDa. Se demostró también que la banda > 250 kDa es insensible al tratamiento con N-glicanasa de los inmunoprecipitados consistente con el CA6 que reside en un carbohidrato O-enlazado (Figura 5F). Sosteniendo de manera

adicional que la banda 250 kDa es el antígeno CA6 está el hecho de que los inmunoprecipitados DS6 no son esa banda partir de las células antígeno negativas DS6 (Figura 5D y E).

Varias líneas de evidencia sugirieron que el antígeno CA6 antigen fue Muc1. Debido al alto peso molecular y la sensibilidad a las enzimas glicolíticas específicas de carbohidrato O-enlazadas, parece probable que el antígeno CA6 fuera una mucina. La sobreexpresión de mucina está bien caracterizada en tumores particularmente del seno u el ovario, compatible con las reactividades de tumores mayores de DS6. Además, CA6, al igual que CanAg (a sialoglicótopo en Muc1), no es susceptible a la precipitación de ácidos perclóricos sugiriendo que el antígeno CA6 está altamente O-glicosilatado. La observación que en algunas líneas celulares que expresan DS6, DS6 inmunoprecipitó un doblete de > 950 kDa sugirió que el CA6 fue Muc1. Un sello distintivo de Muc1 en humanos es la presencia de dos alelos Muc1 que difieren en número de repeticiones tandem resultando en la expresión de dos proteínas Muc1 de diferentes pesos moleculares.

Para probar si CA6 se encuentra en Muc1, inmunoprecipitados DS6 de lystate Caov-3 fueron sometidos a SDS-PAGE e inmunoteñidos con DS6 o un anticuerpo Muc1 VNTR, CM1. Como se puede ver en la Figura 6A, CM1 reacciona fuertemente con la banda > 250 kDa inmunoprecipitada por DS6. En la Figura 6B, los inmunoprecipitados DS6 y CM1 desde el lisado celular HeLa muestran el mismo doblete > 250 kDa cuando son inmunoteñidos con DS6 o CM1. Esos resultados indican que el epítipo CA6 está ubicado de hecho en la proteína Muc-1. El doblete DS6 observado en células HeLa (y T-47D) puede ser

explicado por el hecho de que la expresión Muc-1 está dirigida por distintos alelos que tienen diferente número de repeticiones tándem.

Aunque CM1 y DS6 se enlazan a la misma proteína Muc-1, son epítopes distintos. La deglicosilación química de las tinciones de punto del lisado Caov-3 por medio de ácido trifluorometansulfónico (TFMSA) abolió la señal DS6 (Figura 3). Sin embargo, este mismo tratamiento mejoró la señal CM1. La deglicosilación puede haber revelado epítopes ocultos para el anticuerpo CM1. Además, una comparasión de los resultados de enlace de la citometría de flujo de DS6 y CM1 (Cuadro 4) demuestra que el epítope CA6 no existe en cada expresión celular Muc1. Es interesante observar que el epítope CA6 no es expresado en Colo205 (Cuadro 3), una línea celular que se conoce que expresa altos niveles del sialoglicótopo Muc1 CanAg.

Cuadro 4

	Línea Celular	DS6 MMF*	Kd Aparente (M)	MMF* CM1	Kd Aparente (M)
DS6 positivo & CM1 positivo	BT549	71.39	1.046x 10 ⁻⁹	187.90	6.056 x 10 ⁻⁹
	CaOV3	465. 20	5. 478 x 10 ⁻⁹	1031.00	7. 479 # 10 ⁻⁰⁹
	HeLa	242.50	6.938x10 ⁻¹⁰	334.80	2.907 x 10 ⁻⁰⁹
	KB	119. 56	1. 110 x 10 ⁻⁰⁹	338.00	5.345 x 10 ⁻⁹
DS6 negative & CM1 positive	MCF7	81. 41	2.890 x 10 ⁻⁹	1023.00	8.694 x 10 ⁻⁹
	KLE	27. 48	-	561. 70	8. 156 x 10 ⁻⁰⁹
	OVCAR3	21.19	-	192.50	5.949 x 10 ⁻⁰⁹
	SKOV3	17. 53	-	49. 41	6.246 x 10 ⁻⁰⁹

*MMF = fluorescencia media máxima relativa

Ejemplo 4: Análisis Cuantitativo de epítope CA6 esparcido

Debido a que el epítope CA6 epítope reside en Muc1, una molécula que se sabe es esparcida dentro del torrente sanguíneo en muchos pacientes de cáncer, se tomo un enfoque cuantitativo para determinar si dichos niveles serían prohibitivos para la

89

terapia de anticuerpo DS6. Se considera que el enlace del anticuerpo circulante al antígeno conduce a la rápida separación de los complejos inmunes de la sangre. Si una porción significativa de la dosis de anticuerpo administrada es removida rápidamente desde la circulación es probable que la cantidad que alcanza el tumor esté disminuida resultando en actividad anti-tumoral disminuida de un anticuerpo terapéutico. Cuando el anticuerpo es conjugado para un compuesto citotóxico altamente potente la rápida separación del conjugado podría incrementar de manera potencial la toxicidad no específica. Por lo tanto, en el caso de los conjugados anticuerpo-fármaco pequeño tales como DS6-DM1, pueden esperarse altos niveles de antígeno esparcido para reducir tanto el efecto anti-tumoral como incrementar la toxicidad limitante de dosis.

Recientes pruebas clínicas de terapéuticos de anticuerpo han generado información para el impacto de la concentración de antígeno esparcido sobre la farmacocinética. Por ejemplo, en pruebas clínicas con trastuzumab (Herceptin), un anticuerpo utilizado para el tratamiento de cáncer de seno metastático que expresa her2/neu, se demostró que los farmacocinéticos de separación de trastuzumab no son alterados cuando el nivel de Her2/neu esparcido fue de menos de 500 ng/mL (Pegram et al., J. Clin. Oncol. 16 (8): 2659-71 (1998). Asumiendo un peso molecular de Her2/neu esparcido de 110, 000 Daltons, una concentración molar de Her2/neu esparcido por debajo de 4.5 nM parece tener poca influencia en los farmacocinéticos.

En otro ejemplo, una prueba clínica con cantuzumab mertansina (huC242- DM1) indicó que no había correlación con los

92 28

niveles de CanAg de pretratamiento esparcido (epítotope C242) y los farmacocinéticos de separación de anticuerpo (Tolcher et al., J. Clin. Oncol. 21 (2): 211-22 (2003). El epítotope CanAg, similar al epítotope CA6 reconocido por DS6, es un sialoglicótotope O-enlazado específico de tumor único sobre Muc1. Sin embargo, la naturaleza heterogénea del epítotope CanAg lo hace difícil de cuantificar en términos molares. En la población general los alelos Muc1 varían en longitud dependiendo del número de repeticiones tándem en el dominio de repetición tándem de número variable (VNTR). Se presentan varios sitios de glicosilación O-enlazada en cada repetición tándem. Agregándose a la complejidad de la expresión CanAg está la variación de célula a célula en la actividad de glicosil transferasa inherente. Por lo tanto es posible un amplio rango de epítotopes CanAg por molécula Muc1 incluso en un solo paciente. Además, la relación de epítotope CanAg por molécula Muc1 será diferente a través de una población de pacientes. Por esta razón, CanAg esparcido en muestras de suero es medido mediante ELISA de intercalación en donde Muc1 esparcido con epítotope CanAg es capturado por C242 y detectado mediante un sistema C242/Estreptavidina HRP biotinilatado. El CanAg esparcido es cuantificado en unidades estandarizadas (U) proporcionales al número de epítotopes por ml de suero en vez de una concentración molar de Muc1. Por analogía, una situación similar se presenta para la cuantificación de epítotopes CA6 esparcidos. En contraste, para trastuzumab solamente hay un epítotope por molécula de her2/neu esparcido simplificando en gran medida la cuantificación del antígeno esparcido.

A fin de relacionar los niveles de epítotope esparcido CA6 con

aquellos encontrados en pruebas clínicas con trastuzumab y cantuzumab mertansina, se desarrolló un método para obtener las concentraciones molares de epítopes esparcidos complejos tales como sialoglicótopos en Muc1. Primero, se estableció una prueba ELISA de intercalación simple para DS6. Una representación de la prueba se muestra en la Figura 7A. DS6 fue utilizado para capturar Muc1 que tiene epítipo CA6. Debido a que cada molécula Muc1 tiene múltiples epítopes CA6, se utilizó también DS6 biotinilatado como el anticuerpo rastreador. El enlace DS6 biotinilatado para CA6 capturado se detectó mediante Estreptavidina-HRP utilizando ABTS como el sustrato. El epítipo CA6 fue capturado a partir del suero de paciente de cáncer de ovario o a partir de estándares que provienen de un equipo de prueba Muc1 comercialmente disponible (CA15-3) utilizados para monitorear el Muc1 esparcido en pacientes con cáncer de seno. Las unidades/ml DS6 fueron fijadas de manera arbitraria iguales a las unidades estándares/ml CA15-3.

En la Figura 7B se muestran los resultados de la prueba ELISA de intercalación DS6 en la cual se utilizaron los estándares CA 15- 3. La curva generada es muy similar a aquella obtenida con estándares CA15-3 en el ensayo CA15-3. A fin de convertir unidad/ml DS6 a una concentración molar de CA6 se requiere una curva estándar para DS6 biotinilatado que convierte la señal a picogramas de DS6. Asumiendo una estequiometría de uno a uno entre el epítipo CA6 y el anticuerpo DS6 biotinilatado y un peso molecular de 160,000 Daltons por DS6 biotinilatado se pueden calcular los mols de CA6 capturado por volumen de muestra agregada.

En la Figura 8A y B hay representaciones de dos medios alternativos para generar una curva estándar para DS6 biotinilatado. En la Figura 8A, se utilice el anticuerpo policlonal IgG de cabra anti-ratón para capturar DS6 biotinilatado que a su vez es detectado de una manera idéntica a aquella utilizada en la prueba ELISA de intercalación mostrada en la Figura 7. En el método mostrado en la Figura 8B el DS6 biotinilatado es colocado en placas directamente sobre la placa ELISA y detectado como en la Figura 8A. Como se ve en la Figura 8C las curvas estándar de DS6 biotinilatado generadas por cada método están en buena concordancia.

En el Cuadro 5 se muestra el análisis de muestras de suero de paciente con cáncer de ovario para varios antígenos esparcidos. CA125 ELISA es utilizado de manera general para monitorear el tratamiento de pacientes con cáncer de ovario al medir CA125 unidades/ml esparcidas. El estatus CA125 fue proporcionado con las muestras de suero. CA15-3 ELISA se utiliza de manera general para monitorear el tratamiento de pacientes con cáncer de seno al medir las unidades/ml Muc1 esparcido utilizando los anticuerpos de captura y detección que reconocen epítopes distintos de aquellos reconocidos por DS6. En el Cuadro 5, CA15-3 es medido en muestras de suero de pacientes con cáncer de ovario.

Cuadro 5

No. Suero	CA125 ¹ (U/ml)	CA15-3 ¹ (U/ml)	DS6 ² (U/ml)	DS6 ³ (pM)	DS ⁶ (pM)
4	72.80	117.72	29.79	52.13	188.94
5	3651.90	98.19	567.02	654.44	>2560.00
6	930.50	87.08	504.15	667.56	2505.00
7	76.00	72.70	135.65	246.94	778.25
8	32.50	18.44	39.96	65.19	239.88
9	551.70	292.39	> 975.61	1512.31	> 2560.00
10	90.00	42.40	49.48	85.19	305.88
11	200.50	60.58	92.32	152.38	526.75
12	283.00	35.67	83.65	135.81	485.06
13	197.50	20.61	35.92	61.06	216.25
14	100.60	6.13	12.39	23.19	88.06
15	34.60	59.18	199.85	286.63	1228.56

Er-91

17	196.40	56.75	66.53	130.44	405.88
18	16.90	30.45	34.43	60.81	223.69
19	22.00	263.93	118.98	191.69	728.94
22	110.70	21.44	16.46	29.94	111.38

¹ determinado por equipo ELISA commercial

² determinado por estándares CA15-3 comerciales (1 CA15-3 U = 1DS6 U)

³ curva estándar IgG cabra anti-ratón & biotina-DS6

⁴ curva estándar biotina-DS6

5

10

15

20

25

Para los valores CA15-3 reportados en el Cuadro 5, se utilizó un equipo CA15-3 Enzyme Immuno Assay comercialmente disponible de CanAg Diagnostics. Para las unidades/ml DS6 se generó una curva estándar usando los estándares CA15-3 (a partir del equipo CA15-3 Enzyme Immune Assay de CanAg Diagnostics) en la prueba de intercalación DS6. Las unidades/ml DS6 fueron arbitrariamente fijados iguales a las unidades/ml CA15-3. En las últimas dos columnas el CA6 esparcido picomolar (pM) se calculó utilizando las curvas estándares de DS6 biotinilatado mostradas en la Figura8C.

Para el análisis cuantitativo de los niveles de CanAg, los niveles de suero de CanAg fueron aquellos reportados para los pacientes que participan en una prueba clínica de cantuzumab mertansina antes del tratamiento (Tolcher et al., J. Clin. Oncol. 21 (2): 211-22 (2003). Una prueba ELISA análoga a aquella descrita para DS6 se utilizó para hacer una curva estándar CanAg empleando estándares CanAg. Se utilizó C242 para capturar los estándares CanAg. La detección de CanAg capturado se logró empleando rastreador C242 biotinilatado seguido por desarrollo con estreptavidina-HRP usando ABTS como sustrato. Se construyó una curva estándar de C242-biotinilatado como se hizo para el DS6 biotinilatado permitiendo la conversión de unidades/ml para una concentración molar de epítopes CanAg circulantes. En el Cuadro 6 los niveles de CanAg a partir de pacientes en la prueba

clínica de cantuzumab mertansina son reportados junto con las concentraciones molares calculadas correspondientes de CanAg circulante.

5

Cuadro 6

CanAg ¹ (U/ml)	CanAg ² (pM)	CanAg ³ (pM)
31240	19185.7	34592.8
8687	3535	9619.3
7456	4579	8256.2
3686	2263.7	4081.6
1447	888.7	1602.3
1262	775	1397.4
718	441	795.1
547	335.9	605.7
394	242	436.3
381	234	421.9
329	202.1	364.3
322	197.8	356.6
306	187	338.8
284	174.4	314.5
247	151.7	273.5
242	148.6	268
229	140.6	253.6
227	139.4	251.4
184	113	203.7
120	73.7	132.9
107	65.7	118.5
100	61.4	110.7
81	49.7	89.7
81	49.7	89.7
67	41.1	74.2
53	32.5	58.7
45	27.6	49.8
43	26.4	47.6
39	24	43.2
36	22.1	39.9
24	14.7	26.6
18	11.1	19.9
17	10.4	18.8
< 10	6.1	11.3
< 10	6.1	11.3
< 10	6.1	11.3
< 10	6.1	11.3

¹ niveles de pretratamiento de circulating CanAg measured by sandwich ELISA

² curva estándar de IgG e cabra anti-ratón & biotina-C242

³ curva estándar de biotina-C242

10

15

20

Una comparación de los niveles pM de C6 esparcido en las pacientes con cáncer de ovario con aquellos calculados para CanAg esparcido en pacientes con cáncer CanAg-positivo demuestra que en general los niveles de A6 esparcido son similares a los niveles de CanAg esparcido. Además, solamente 2 de cada 16 muestras de suero de pacientes con cáncer de ovario tienen potencialmente niveles de CA6 mayores de 4.5nM, (muestras de suero 5 y 9 para las cuales la señal estuvo fuera del rango de la curva estándar), el nivel sobre el cual se observaron farmacocinéticas de herceptina alterados en las pruebas clínicas con pacientes con cáncer de seno Her2/neu-positivas. Los niveles

93

de CanAg por encima de 4.5nM se observaron solamente en 3 de las 37 pacientes de prueba clínica. En esta prueba clínica no hubo correlación con los niveles de CanAg esparcido y la separación más rápida de la cantuzumab mertansina. Sin embargo, la paciente con el nivel más elevado de CanAg (31240 U/ml) fue muestreada solamente durante 8 horas después de la transfusión. Esos resultados indican que ciertos epítopes de Muc1, tales como CA6 y CanAg, en tanto que se esparcen en pacientes con cáncer, no se esparcen en niveles prohibitivos para el tratamiento terapéutico de anticuerpo.

Ejemplo 6: Clonación de Regiones Variables del Anticuerpo DS6 de Murino.

Los anticuerpos monoclonales de murino tales como DS6 tienen utilidad limitada en una preparación clínica debido a que son reconocidos como extraños por el sistema inmune humano. Los pacientes desarrollan rápidamente anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA) lo que resulta en la rápida separación de los anticuerpos de murino. Por esta razón, a la región variable de DS6 murino (muDS6) se le aplicó doble superficie para producir anticuerpos DS6 humanizados (huDS6).

Las regiones variables del anticuerpo DS6 de murino fueron clonadas mediante RT-PCR. El ARN total fue purificado a partir de un matraz T175 confluyente de células de hibridoma DS6 utilizando el equipo Qiagen RNeasy miniprep. Las concentraciones de ARN fueron determinadas por medio de espectrofotometría UV y se efectuaron reacciones RT con 4-5 µg de ARN total usando el

equipo Gibco Superscript II e imprimadores de hexámero aleatorios.

Las reacciones PCR fueron efectuadas con imprimadores degenerados en base a aquellos descritos en Wang Z et al., J Immunol Methods. Jan 13; 233 (1-2): 167-77 (2000). La mezcla de reacción RT fue utilizada directamente para degenerar las reacciones PCR. El imprimador de cadena ligera 3', HindKL, (TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTG C) (ID SEC NO: 25)

y el imprimador de cadena pesada 3', BamIGI, (GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC) (ID SEC NO: 26) fueron utilizados, y para los imprimadores PCR de extremo 5' fueron Sac1MK

(GGGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA) (ID SEC NO: 27) para la cadena ligera y una mezcla igual de EcoR1MH1 (CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC) (ID SEC NO: 28) y EcoR1MH2 (CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG) (ID SEC NO: 29) para la cadena pesada (bases mezcladas: H = A+T+C, S = G+C, Y = C+T, K G+T, M = A+C, R = A+G, W = A+T, V = A+C+G, N = A+T+G+C).

Las reacciones PCR fueron estándar excepto que fueron complementadas con 10% DMSO (50 µl concentraciones finales que contienen mezclas de reacción de 1X regulador de reacción (ROCHE), 2mM cada dNTP, 1mM cada imprimador, 2 µl reacción RT, 5 µl DMSO, y 0.5 µl Taq (ROCHE)). Las reacciones PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador de investigación MJ utilizando un programa adaptado a partir de Wang Z et al., (J Immunol Methods. Jan 13; 233 (1-2): 167-77 (2000)): 1) 94°C, 3

27. 05

minutos; 2) 94°C, 15 segundos; 3) 45°C, 1 minuto; 4) 72°C, 2 minutos; 5) ciclo regresa a la etapa #2 29 veces; 6) termina con una etapa de extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos PCR fueron clonados en pBluescript IISK+(Stratagene) usando enzimas de restricción creadas por los imprimadores PCR. Los servicios de secuenciación Seqwright secuenciaron los clones de cadena pesada y ligera.

A fin de confirmar las secuencias ADNc de extremo 5', se ejecutó la PCR y clonación adicionales. Las secuencias de ADNc de cadena ligera y de cadena pesada DS6, determinadas a partir de los clones PCR degenerados, fueron colocadas dentro del sitio Web de búsqueda de NCBI Blast y se guardaron las secuencias de anticuerpo de murino con secuencia de señal presentadas. Los imprimadores PCR fueron diseñados a partir de esos péptidos de señal utilizando extensiones conservadas entre las secuencias relacionadas de ADN. Los sitios de restricción EcoRI fueron agregados a los imprimadores de secuencia líder (Cuadro 7) y estos fueron utilizados en las reacciones RT-PCR como se describió antes.

Cuadro 7
Imprimadores Degenerados de Secuencia de Señal DS6

Nombre	Secuencia	
Cadena Pesada-DS6HClead	ttttgaattcaataactacaggtgtccact	-ID SEC NO: 30
Cadena Ligera-KTILClead	ttttgagctccagattttcagcttctgct	-ID SEC NO: 31

Varios clones de cadena ligera y pesada individuales fueron secuenciados para identificar y evitar posibles errores de secuencia de generados por polimerasa. Solamente se obtuvo una secuencia para los clones RT-PCR de cadena ligera y cadena

pesada. Esas secuencias fueron suficientes para diseñar imprimadores que podrían amplificar las secuencias de cadena ligera y de cadena pesada de DS6 de murino que se extienden dentro de de la secuencia de señal. Los clones subsecuentes a partir de esas reacciones PCR de seguimiento confirmaron las secuencias de extremo 5' de la región variable que había sido alterada por los imprimadores degenerados originales. Los resultados acumulativos a partir de los diversos clones ADNc proporcionaron las secuencias de cadena ligera y de cadena pesada de DS6 de murino finales presentadas en la Figura 9. Utilizando las definiciones Kabat y AbM, se identificaron las tres CDRs de cadena ligera y de cadena pesada (Figuras 9 y 10). Una búsqueda de la base de datos NCBI IgBlast indica que la región variable de cadena ligera del anticuerpo muDS6 se deriva más probablemente a partir del gen de línea germinal IgV ? ap4 de murino en tanto que la región variable de cadena pesada se deriva con mayor probabilidad a partir del gen de línea germinal IgVh J558.41 de murino (Figura 11).

Ejemplo 7: Determinación del Residuo de Superficie de Región Variable del Anticuerpo DS6

Las técnicas de aplicación de doble superficie al anticuerpo descritas por Pedersen et al. (1994) y Roguska et al. (1996) inician mediante el pronóstico de los residuos de superficie de las secuencias variables del anticuerpo de murino. Un residuo de superficie está definido como un amino ácido que tiene por lo menos 30% de su área de superficie total accesible para una molécula de agua. En ausencia de una estructura resuelta para

100 62

encontrar los residuos de superficie para muDS6, se alinearon los diez anticuerpos con las secuencias más homólogas en el conjunto de 127 archivos de estructura de anticuerpo (Figura 12). La accesibilidad del solvente para cada posición Kabat fue promediada para esas secuencias alineadas (Figuras 13A y B).

Las posiciones de superficie con accesibilidades promedio de entre 25% y 35% fueron sometidas a una segunda ronda de análisis mediante comparación de un subconjunto de anticuerpos que contienen dos residuos idénticos flanqueando en cada lado (Figuras 13A y B). después del análisis de segunda ronda, los 21 residuos de superficie pronosticados para la cadena pesada de muDS6 se incrementaron a 23, agregando Tyr3 y Lys23 a la lista de residuos con accesibilidad de superficie pronosticada mayor del 30%. En la mayoría de los anticuerpos de doble superficie se utiliza la definición Kabat de la cadena pesada CDR1, aunque para DS6 se utilizó de manera inadvertida la definición AbM durante los cálculos de manera que el residuo de cadena pesada T28 no fue definido como un residuo de superficie de estructura como podría haber sido de otra manera. El número de posiciones de superficie de cadena ligera se redujo de 16 a 15 debido a que la accesibilidad de superficie pronosticada de Ala80 se redujo de 30.5% a 27. 8% en el análisis de segunda ronda. Juntas, las secuencias variables de cadena pesada y ligera de muDS6 tienen 38 residuos de estructura accesibles de superficie pronosticados.

Ejemplo 8: Selección de anticuerpo humano

Las posiciones de superficie de la región variable de DS6 de

murino fueron comparadas con las posiciones correspondientes en las secuencias de anticuerpo humano en la base de datos Kabat (Johnson G, Wu TT. Nucleic Acids Res. Jan 1; 29(1): 205-6(2001)). El software de manejo de la base de datos de anticuerpo SR (Searle, 1998) fue utilizado para extraer y alinear los residuos de superficie a partir de pares de anticuerpo humano de cadena pesada y ligera naturales. La superficie de región variable de anticuerpo humano con los residuos de superficie más idénticos, dando consideración especial a las posiciones que vienen dentro de 5A de una CDR, fueron seleccionados para reemplazar los residuos de superficie de región variable del anticuerpo DS6 de murino.

Ejemplo 9: Vector de expresión para anticuerpos quiméricos y humanizados

Las secuencias apareadas de cadena ligera y pesada fueron clonadas en un vector de expresión de mamífero individual. Los imprimadores PCR para las secuencias variables humanas crearon sitios de restricción que permitieron que se agregara la secuencia de señal humana en el vector de clonación pBluescriptII. Las secuencias variables podrían ser clonadas entonces en el plásmido de expresión de mamífero con EcoRI y BsiWI o HindIII y ApaI para la cadena ligera o la cadena pesada respectivamente (Figura 14). Las secuencias variables de cadena ligera fueron clonadas en-estructura sobre la región constante IgKappa humana y las secuencias variables de cadena pesada fueron clonadas dentro de la secuencia de región constante IgGammal humana.

En los plásmidos de expresión final, los promotores CMV humanos impulsan la expresión de las secuencias ADNc de cadena ligera y pesada.

5 Ejemplo 10: Identificación de Residuos Que Pueden Afectar Negativamente la Actividad DS6

10 En la mayoría de las humanizaciones hasta ahora un modelo molecular del anticuerpo del sujeto se ha construido para identificar los residuos próximos a una CDR como residuos potencialmente problemáticos. Con un número en expansión de anticuerpos de doble superficie a partir de los cuales trabajar, la experiencia histórica es por lo menos tan efectiva como en los problemas de pronóstico para construir un modelo, así que no se
15 construyó modelo molecular para DS6. En vez de ello, se identificaron los residuos de superficie de DS6 de murino fueron comparados con aquellos de anticuerpos de doble superficie previamente y residuos con bajo a alto riesgo para afectar la actividad de enlace del anticuerpo.

20 Conjuntos similares de residuos son identificados de manera repetida estando dentro de 5Å de una CDR tanto en las estructuras de anticuerpo resueltas disponibles como en los modelos moleculares a partir de humanizaciones previas. Utilizando estos datos, el Cuadro 1 proporciona los residuos de DS6 de murino que
25 probablemente están próximos a y posiblemente dentro de 5Å de una CDR. Muchas de esas posiciones también han sido cambiadas en humanizaciones previas, aunque solamente la posición de cadena pesada 74 ha resultado siempre en una pérdida de

actividad de enlace. El residuo de murino fue retenido en esta posición tanto en huC242 como en huB4 a fin de conservar la actividad de enlace del anticuerpo de murino. Por otra parte, esta misma posición fue cambiada para el residuo humano correspondiente en 6.2G5C6 humanizado sin pérdida de actividad (6.2G5C6 es el anticuerpo anti-IGF1-R referido de manera frecuente simplemente como anti-C6). En tanto que los residuos en el Cuadro 1 podrían presentar un problema en el anticuerpo humanizado, el residuo P73 de cadena pesada será de particular interés debido a las experiencias previas en esta posición.

Ejemplo 11: Selección de la Superficie Humana Más Homóloga

Las superficies de anticuerpo humano candidatas para aplicación de doble superficie muDS6 fueron extraídas a partir de la base de datos de secuencia de anticuerpo Kabat utilizando el software SR. Este software proporciona una interfaz para buscar solamente las posiciones de residuo especificadas contra la base de datos de anticuerpo. Para preservar los pares naturales, se compararon los residuos de superficie de las cadenas tanto ligera como pesada. Las superficies humanas más homólogas a partir de la base de datos Kabat fueron alineadas en orden de rango de la identidad de secuencia. Las 3 superficies superiores como son alineadas por el software de base de datos SR Kabat están dadas en el Cuadro 2. Las superficies fueron comparadas después para identificar que superficies humanas requerirían los cambios mínimos para los residuos identificados en el Cuadro 1. El anticuerpo anti-Rh (D), 28E4 (Boucher et al, 1997), requiere el número mínimo de cambios de residuo de superficie (11 total) y

104
tot

solamente 3 de esos residuos están incluidos en la lista de residuos potencialmente problemáticos. Ya que el anticuerpo 28E4 proporciona la superficie humana más homóloga, es el mejor candidato para resurface muDS6.

5

Example 12: Construcción de las Secuencias de ADN para Anticuerpos DS6 humanizados

10

Los 11 cambios de residuo de superficie para DS6 se hicieron utilizando mutagenesis PCR. La mutagenesis PCR fue ejecutada en los clones de ADNc de la región variable de DS6 de murino para construir el gen DS6 humano de doble superficie. Los conjuntos imprimadores de humanización fueron diseñados para hacer los cambios de amino ácido requeridos para el DS6 de doble superficie DS6, mostrados a continuación en el Cuadro 8.

15

Cuadro 8

Nombre de Imprimador	Secuencia de Imprimador	
DS6HCapa	cgatgggcccttggtggagctgcagagacagtgaccaga	ID SEC NO : 32
DS6LCBsi	ttttcgacgtttcagctccagcttggt	ID SEC NO : 33
DS6HC5end	Caggtgtacactccaggttatctccagcagctct	ID SEC NO : 34
huC6HCAPA	cgatgggcccttggtggagcgccagagacagtgaccaga	ID SEC NO : 35
ds61c5et	cagggtgacactccgagattgttctcaccagctccagcaacc atgtctgcatct	ID SEC NO : 36
ds6LCr18	ggcactgcaggttatggtagccctctccctggaga	ID SEC NO : 37
ds61cs77f	caatcageagcatggaggtgaaga	ID SEC NO : 38
ds61cs77r	gctccatgctgctgattgtgaga	ID SEC NO : 39
DS6HCwkp	cagggtgacactccaggtcagctcgtagctggggctg agggtgtgaagcccgggcctcagt	ID SEC NO : 40
DS6HCt	ttgactgcagacacatcctccagcaca	ID SEC NO : 41
ds6hcQT	gtgtctgcagtaattggccttgccctggaactctgat	ID SEC NO : 42
huDS6HCapa	cgatgggcccttggtggagcgccagagacagtgacaaga	ID SEC NO : 43

20

25

Las reacciones PCR fueron estándar excepto que fueron complementadas con 10% DMSO (50 µl mezclas de reacción contenían concentraciones finales de 1X regulador de reacción (ROCHE), 2 mM cada dNTP, 1 mM cada imprimador, 100 ng plantilla, 5 µl DMSO, y 0.5 µl Taq (ROCHE)). Fueron operadas en un termociclador MJ Research con el siguiente programa: 1) 94°C,

105
102

1 minuto; 2) 94°C, 15 segundos; 3) 55°C, 1 minuto; 4) 72°C, 1 minuto; 5) ciclo regresa a la etapa # 2 29 veces; 6) termina con una etapa de extensión final a 72°C durante 4 min. Los productos PCR fueron digeridos con sus enzimas de restricción correspondientes y clonados dentro de los vectores de clonación pBluescript. Los clones fueron secuenciados para confirmar los cambios de amino ácidos.

Ya que el residuo de cadena pesada de cambio P73 ha ocasionado problemas en el pasado, se construyeron dos versiones de la cadena pesada, una con el 28E4 T73 humano y una que retiene el P73 de murino. Los otros 10 residuos de superficie fueron cambiados de murino al residuo 28E4 humano en ambas versiones de DS6 humanizado (Cuadro 2). En adhesión con el método de nomenclatura usual, la más humana es la versión 1.0 ya que tiene los 11 residuos de superficie humanos. La versión de cadena pesada que retiene el P73 de murino es la versión nombrada 1.2 en caso de que se requieran versiones adicionales así que se reserva la versión 1.1 para una versión que contenga el número máximo de residuos de murino. Las secuencias de amino ácido de las dos versiones humanizadas se muestran alineadas con la secuencia de amino ácido de DS6 de murino en Figura 15A y B. Ambos genes del anticuerpo DS6 humanizado fueron clonados en el plásmido de expresión de anticuerpo (Figura 14) para transfecciones transitorias y estables. Las secuencias de ADNc y e amino ácido de las versiones humanizadas v1.0 y v1. 2 de región variable de cadena ligera son las mismas y se muestran en la Figura 16. Las secuencias de ADNc y de amino ácido de las versiones humanizadas v1.0 y v1.2 se muestran en la 17A y B.

Ejemplo 13: Expresión y purificación de huDS6 en células CHO y mediciones de afinidad

5 Para determinar si las versiones DS6 humanizadas retuvieron o no la afinidad de enlace de muDS6 fue necesario expresar y purificar los anticuerpos. Las células CHO fueron transfectadas con los plásmidos de expresión de anticuerpo respectivos. Debido a que los niveles de expresión transitoria de huDS6 fueron muy
10 bajos, se seleccionaron líneas celulares estables.

 Se cultivaron células CHODG44 (4.32×10^6 células/placa) en llacas de 15 cm en medio no-selectivo (Alpha MEM + nucleótidos (Gibco), complementado con 4 mM L-glutamina, 50 U/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina, y 10% v/v FBS) y colocadas en un
15 incubador humidificado a 37°C, 5% CO₂. Al día siguiente, las células fueron transfectadas con los plásmidos de expresión huDS6 vl. 0 y vl. 2 utilizando una versión modificada del protocolo recomendado Qiagen para Polyfect Transfection. El medio no-selectivo fue aspirado desde las células. Las placas fueron
20 lavadas con 7 ml de PBS pre-calentado (37°C) y rellenas con 20 ml de medio no-selectivo. El ADN de plásmido (11 µg) fue diluido en 800 µl de Hybridoma SFM (Gibco). Después, se agregaron 70 µl de Polyfect (Qiagen) a la mezcla ADN/SFM. La mezcla Polyfect fue sometida a remolino suavemente durante varios segundos e
25 incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregó medio no-selectivo (2.7 ml) a la mezcla. Esta mezcla final fue incubada con las células colocadas en placas durante 24 horas.

 La mezcla/medio de transfectación fue retirada de las placas

y las células fueron tripsinizadas y contadas entonces. Las células fueron colocadas en placas en medio selectivo (Alpha MEM-nucleótidos, complementado con 4 mM L-glutamina, 50 U/ml penicilina, 50, µg/ml estreptomycin, 10% v/v FBS, 1.25 mg/ml G418) en placas de 96 pozos (250 µl/pozo) en varias densidades (1800, 600, 200, y 67 células/pozo). Las células fueron incubadas durante 2-3 semanas, complementado el medio si es necesario. Los pozos fueron tamizados para los niveles de producción de anticuerpo utilizando una prueba ELISA cuantitativa. Una placa Immulon 2HB de 96 pozos fue recubierta con el anticuerpo 2 IgG F(ab) cabra anti-humano IgG F(ab)₂ anticuerpo (Jackson ImmunoResearch; 1 µg/pozo en 100 µl 50 mM regulador de carbonato de sodio pH 9.6) e incubada durante 1.5 h a temperatura ambiente, con oscilación. Todas las etapas subsecuentes fueron conducidas a temperatura ambiente. Los pozos fueron lavados dos veces con T-TBS (0.1% Tween-20, TBS) y bloqueados con 200 µl de regulador de bloqueo (1% BSA, T-TBS) durante 1 hora. Los pozos fueron lavados dos veces con T-TBS. En una placa separada, el anticuerpo estándar, EM164 (100 ng/ml), y los sobrenadantes de cultivo fueron diluidos de manera serial (1: 2 o 1:3) en regulador de bloqueo. Esas diluciones (100 µl) fueron transferidas a la placa ELISA e incubadas durante 1 hora. Los pozos fueron lavados tres veces con T-TBS e incubados con 100 µl de IgG Fc-AP cabra anti-humano (Jackson Immuno Research) diluido 1:3000 en regulador de bloqueo durante 45 minutos. Después de 5 lavados con T-TBS, los pozos fueron desarrollados utilizando 100 µl de reactivo de desarrollo PNPP (10 mg/ml PNP (Fosfato de p-Nitrofenilo, Sal Disódica; Pierce), 0.1 M

dietanolamina pH 10.3 regulador) durante 25 minutos. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de placa ELISA. Las lecturas de absorbancia (del sobrenadante de cultivo) en la porción lineal de la curva estándar fueron utilizadas para determinar los niveles de anticuerpo.

Los clones de mayor producción, identificados por medio de la prueba ELISA, fueron expandidos después y se prepararon existencias de células congeladas. Para producir una cantidad suficiente de anticuerpo para purificar, las células fueron expandidas sobre placas de 15 cm ($\sim 1 \times 10^6$ células/placa) con 30 ml de medio selectivo e incubadas durante 1 semana. Los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados en tubos cónicos de 250 ml, sometidos a agitación en una centrífuga de tablero (2000 rpm, 5 minutos, 4°C), y después filtrados estériles a través de un aparato de filtro de 0.2 μ m.

Para purificación de DS6, se agregaron pellas de NaOH a los sobrenadantes de cultivo filtrados a un pH final de 8.0. Una columna Hi Trap rProtein A (Amersham) fue equilibrada con 20-50 volúmenes de columna de regulador de enlace. El sobrenadante fue carga en la columna utilizando una bomba peristáltica. Después, la columna fue lavada con 50 volúmenes de columna de regulador de enlace. El anticuerpo enlazado fue eluido de la columna utilizando regulador de elución (100 mM ácido acético, 50 mM NaCl, pH 3) en tubos fijados en un colector de fracción. El anticuerpo eluido fue neutralizado después utilizando regulador de neutralización (2 M K_2HPO_4 , pH 10.0) y dializado después durante la noche en PBS. El anticuerpo dializado fue filtrado a través de un filtro de jeringa de 0.2 μ m. Se midió la absorbancia a 280 nm

para determinar la concentración de proteína final.

La afinidad del hulgG purificado fue comparada con muDS6 por medio de citometría de flujo. En el primer conjunto de experimentos se midió el enlace directo a una línea celular que expresa CA6, WISH. Como se muestra en la Figura 18A el DS6 quimérico, huDS6 v1.0, y huDS6 v1.2 muestran afinidades muy similares con KDs aparentes de 3.15 nM, 3.71 nM, y 4.2 nM, respectivamente sugiriendo que la aplicación de doble superficie no tiene alteradas las CDRs. Esas afinidades son sólo ligeramente menores que para muDS6 ($K_d = 1.93$ nM) mostrado en la Figura 18B.

Para confirmar que las versiones huDS6 retienen la afinidad de muDS6, se condujeron experimentos de enlace competitivo. La ventaja de este formato es que el mismo sistema de detección es utilizado tanto para los anticuerpos de murino como humanos; este es biotina-muDS6/estreptavidina-DTAF. En algunos casos, el K_d aparente medio experimentalmente puede variar tan solo debido al reactivo secundario utilizado para detectar en forma indirecta el enlace. Esto se ilustra mediante una comparación del K_d aparente biotina-DS6 cuando se utiliza Cabra anti-Ratón-FITC ($K_d = 2.80$ nM; Figura 18B) o cuando se emplea estreptavidina-DTAF ($K_d = 6.76$ nM; Figura 19A). Los resultados de la prueba de enlace competitivo que compara la habilidad de muDS6, huDS6 v1.0, y huDS6 v1.2 para competir con biotina-DS6 se muestran en la Figura 19B. Los ECSO aparentes son 12.18 nM, 37.07 nM, y 22.64 nM para muDS6, huDS6 v1.0, y huDS6 v1.2, respectivamente. Esos resultados indican que la aplicación de doble superficie de muDS6 que produce un DS6 humanizado DS6 ocasiona poca reducción en

110 107

la afinidad de enlace.

Ejemplo 14: Preparación del conjugado citotóxico DS6-DM1

El anticuerpo DS6 (8 mg/ml) fue modificado utilizando un exceso molar de 8 veces de N-succinimidil-4-(2-piridilditio) pentanoato (SPP) para introducir grupos ditiopiridilo. La reacción se llevó a cabo en 95% v/v Regulador A (50 mM KPi, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6.5) y 5% v/v DMA durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción ligeramente turgente fue filtrado por gel a través de una columna NAP o Sephadex G25 (equilibrada en Regulador A). El grado de modificación fue determinado al medir la absorbancia del anticuerpo a 280 nm y el DTT liberó 2-mercaptopiridina (Spy) a 280 y 343nm. El DS6 modificado fue conjugado después a 2.5 mg Ab/mL utilizando un exceso molar 1.7-veces de N^{2'}-deacetil-N^{2'}-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (L- DM1) sobre SPy. La reacción se llevó a cabo en Regulador A (97% v/v) con DMA (3% v/v). La reacción fue incubada a temperatura ambiente durante la noche por ~20 horas. La mezcla de reacción opaca fue centrifugada (1162 x g, 10 minutos) y el sobrenadante fue filtrado por gel a través de una columna NAP-25 o S300 (Tandem 3,3x 26/10 columnas de desalinización, medio G25) equilibrada en Regulador B (1X PBS pH 6.5). La pella fue desechada. El conjugado fue filtrado estéril utilizando un filtro de 0.22 µm Millex-GV y fue dializado en Regulador B con un Slide-A-Lyzer. El número de moléculas DM1 enlazadas por molécula de DS6 se determinó al medir la absorbancia en 252 nm y 280 nm del material filtrado. Se encontró que la relación DM1/Ab ratio es 4.36

111 108

y la producción de etapa de DS6 conjugado fue del 55%. La concentración de anticuerpo conjugado fue de 1.32 mg/mL. El conjugado purificado fue caracterizado bioquímicamente por medio de cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) y se encuentra que es 92% monómero. El análisis de DM1 en el conjugado purificado indicó que 99% fue enlazado de manera covalente al anticuerpo. En la Figura 20, el enlace citométrico de flujo del conjugado DS6-DM1 y DS6 no modificado a células Caov-3 muestra que la conjugación resulta solamente en una ligera pérdida de afinidad.

Ejemplo 15: Citotoxicidad in vitro de DS6-DM1

Como un anticuerpo natural, DS6 no ha mostrado una actividad proliferante o inhibidora de crecimiento en cultivos celulares (Figura 21) Sin embargo, cuando DS6 es incubado con células en presencia de un conjugado DM1 para DS6 de cadena pesada y ligera de IgG Cabra anti-ratón, DS6 es muy efectivo en el direccionamiento y suministro de este conjugado a la célula dando como resultado citotoxicidad indirecta (Figura 21). Para probar de manera adicional la actividad inherente de DS6 natural, se condujo una prueba de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) utilizando DS6 de murino y humanizado. Las células HPAC y ZR-75-1 (25000 células/pozo) fueron colocadas en placas de 96 pozos, en presencia de 5% suero humano o de conejo y varias diluciones de DS6 de murino o humano, en 200 µl de medio RHBP (RPMI-1640, 0.1 % BSA, 20mM HEPES (pH 7.2-7.4), 100 U/ml penicilina y 100 ug/ml estreptomicina). Las células fueron

incubadas durante 2 horas a 37°C. Después se agregó reactivo Alamar Blue (10% de concentración final) (Biosource) al sobrenadante. Las células fueron incubadas durante 5-24 horas antes de medir la fluorescencia. Tanto DS6 de murino como humano no tuvieron efecto en una prueba de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) (Figura 22) Esto sugiere que la aplicación terapéutica de DS6 requeriría la conjugación de una molécula efectora tóxica.

La citotoxicidad del anticuerpo DS6 conjugado con maitansinoide fue examinada utilizando 2 formatos de prueba diferentes en varias líneas celulares DS6 positivas. Se condujeron pruebas clonogénicas en donde las células (1000-2500 células/pozo) fueron colocadas en placas de 6 pozos en 2 ml de conjugado diluido en medio de cultivo. Las células fueron expuestas de manera continua al conjugado en varias concentraciones, en forma general entre 3×10^{-11} M hasta 3×10^{-9} M, y fueron incubadas en una cámara humidificada a 37°C, 6% CO₂ durante 5-9 días. Los pozos fueron lavados con PBS y las colonias fueron teñidas con una solución de 1% w/v violeta cristal/10 % v/v formaldehído/PBS. La cepa no enlazada fue lavada después completamente a partir de los pozos con agua destilada, y se dejaron secar las placas. Las colonias fueron contadas utilizando un microscopio de disección Leica StereoZoom 4.

La eficacia de colocación en placas (PE) fue calculada como el número de colonias/número de células colocadas en placas. La fracción superviviente fue calculada como PE de células tratadas/PE de las células no tratadas. La concentración IC₅₀ se determinó mediante graficado de la fracción superviviente de

células contra la concentración molar del conjugado. En una prueba clonogénica (Figura 23), DS6-DM1 fue efectivo en la eliminación de células Caov-3 con un IC_{50} estimado de 800 pM. Las células antígeno negativas, A375, fueron afectadas solamente de manera ligera por el conjugado a una concentración de 3×10^{-9} M, la concentración más elevada de DS6-DM1 probada, que demuestra que la actividad de eliminación del conjugado está dirigida de manera específica hacia las células que expresan antígeno. Sin embargo, a pesar de de la sensibilidad aparente a la maitansina, muchas de las otras líneas celulares DS6 positivas no fueron particularmente sensibles al inmunconjugado. Todas las líneas celulares cervicales (HeLa, KB, y WISH) fueron sensibles al conjugado considerando que solamente un número selecto de líneas de cáncer de ovario y de seno mostraron cualesquiera efectos citotóxicos. Ninguna de las líneas celulares pancreáticas pareció haber sido afectada.

En la prueba MTT, las células fueron sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de 1000- 5000 células/pozo. Las células fueron colocadas en placas con diluciones seriales de DS6 natural o inmunconjugado DS6-DM1 en 200 μ l de medio de cultivo. Las muestras fueron procesadas por triplicado. Las células y mezclas de anticuerpo/conjugado fueron incubadas después durante 2-7 días, en cuyo tiempo se determinó la viabilidad celular a través de una prueba MTT (bromuro de [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio]). Se agregó MTT (50 μ g/pozo) al sobrenadante de cultivo y se dejó incubar durante 3-4 horas a 37°C. El medio fue retirado y el MTT formazan fue solubilizado en DMSO (175 μ l/pozo). Se midió la absorbancia a 540-545 nm. En una prueba de

viabilidad celular MTT (Figura 24C), el inmunoconjugado fue capaz de eliminar de manera efectiva células Caov-3 con un IC_{50} estimado de 1.61 nM. Los pozos con las concentraciones más elevadas no contuvieron células viables en comparación con el anticuerpo natural que no tuvo efecto (Figuras 21 y 24).

Los resultados de las pruebas MTT en las otras líneas celulares fueron ligeramente diferentes (Figura 24A, B, y D-I). En muchos casos, aunque se observó alguna citotoxicidad, el conjugado no fue capaz de eliminar por completo toda la población celular (con excepción de las células WISH). Las células BT-20, OVCAR5, y HPAC fueron particularmente resistentes: en los pozos de concentración de conjugado más elevada (32 nM), más del 50% de las células aún fueron viables.

Ejemplo 16: Actividad Anti-tumoral de Conjugado In vivo

Para demostrar la actividad in vivo del conjugado DS6-DM1, se establecieron xenoinjertos de tumor humano en ratones SCID. Se desarrolló un modelo subcutáneo de línea celular de carcinoma cervical humano, KB. Las células KB fueron cultivadas in vitro, recolectadas, y 5×10^6 células en 100 μ L de medio libre de suero fueron inyectadas sobre el hombro derecho de cada ratón y se dejaron crecer durante 6 días hasta un volumen de tumor promedio de $144 \pm 125 \text{ mm}^3$ en cuyo momento se inicio el tratamiento con fármaco. Se dio a los ratones PBS, conjugado a 150 μ g/kg DM1, o conjugado a 225 μ g/kg DM1 (2 ratones por grupo) por vía intravenosa diariamente durante 5 días. Las respuestas tóxicas

fueron monitoreadas diariamente durante el tratamiento. Los volúmenes de tumor (Figura 25A) y que corresponden a pesos corporales (Figura 25B) fueron monitoreados a través del estudio.

Los tumores KB tratados con control PBS crecieron rápidamente con un tiempo de duplicación de aproximadamente 4 días. En contraste, ambos grupos de ratones tratados con conjugado exhiben regresión tumoral completa 14 días y 18 días después de la iniciación del tratamiento para los grupos de dosis 225 $\mu\text{g/kg}$ y 150 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente. En la dosis de 150 $\mu\text{g/kg}$ el retraso el tumor fue de aproximadamente 70 días. El tratamiento a 225 $\mu\text{g/kg}$ resultó en curaciones ya que no hubo evidencias de recurrencia de tumor a la terminación del estudio en el día 120. Como se ve en la figura Figura 25B los ratones en el grupo de 150 $\mu\text{g/kg}$ no mostraron pérdida de peso indicando que la dosis fue bien tolerada. En la dosis más elevada los ratones experimentaron solamente una reducción temporal del 3% en el peso corporal. Durante el 5to. día en curso del tratamiento, los ratones no exhibieron signos visibles de toxicidad. Tomado en conjunto, éste Studio demuestra que el tratamiento DS6-DM1 puede curar a loa ratones de los tumores de xenoinjerto KB en una dosis no tóxica.

La actividad DS6-DM1 fue probada de manera adicional en un panel de modelos de xenoinjerto subcutáneo (ver Figura 26). Las líneas celulares de tumor utilizadas para hacer los xenoinjertos exhibieron un rango de sensibilidades a maitansina in vitro y densidades de epítipo CA6 (Cuadro 9 a continuación). Las células OVCAR5 y TOV-21G son líneas celulares de tumor de ovario; HPAC es una línea celular de tumor pancreático; HeLa es una línea celular de tumor cervical. Las células OVCAR5 y TOV-

21G tienen baja expresión de CA6 de superficie; las células HeLa tienen un nivel intermedio de expresión de CA6 de superficie; las células HPAC tienen una alta densidad CA6 de expresión de superficie. Las células TOV-21G y HPAC son sensibles a maitansina; las células OVCAR5 y HeLa son 2-7-veces menos sensibles a maitansina.

Cuadro 9

Línea Celular	MMF*	Kd Aparente (M)	Prueba Clonogénica Maitansina IC ₅₀ (M)	Prueba Clonogénica Conjugado IC ₅₀ (M)	Prueba MTT Conjugado EC ₅₀ (M)
BT-20	232.20	9.14 x 10 ⁻⁹	3.50 x 10 ⁻¹⁰	> 3.00 x 10 ⁻⁰⁹	1.44 x 10 ⁻⁰⁹
BT-483	1911.00	1.37 x 10 ⁻⁸	1.50 x 10 ⁻¹⁰	1.00 x 10 ⁻¹⁰	N/A
Caov-3	465.20	5.48 x 10 ⁻⁹	3.20 x 10 ⁻¹¹	8.00 x 10 ⁻¹⁰	1.61 x 10 ⁻⁰⁹
Caov-4	149.00	4.04 x 10 ⁻⁰⁹	6.00 # 10 ⁻¹⁰	> 3.00 # 10 ⁻⁰⁹	N/A
HeLa	> 242.50	6.94 x 10 ⁻¹⁰	1.00 # 10 ⁻¹⁰	1.80 x 10 ⁻⁰⁹	N/A
HPAC	2228.00	2.35 x 10 ⁻⁰⁸	5.50 x 10 ⁻¹¹	1.80 x 10 ⁻⁰⁹	1.84 x 10 ⁻⁰⁹
HPAF-II	266.50	2.81 x 10 ⁻⁰⁸	6.00 x 10 ⁻¹⁰	>3.00 x 10 ⁻⁰⁹	1.00 x 10 ⁻⁰⁸
Hs766T	182.90	2.32 x 10 ⁻⁰⁸	>3.00 x 10 ⁻⁰⁹	>3.00 x 10 ⁻⁰⁹	>3.20 x 10 ⁻⁰⁸
KB	119.56	1.11 x 10 ⁻¹⁰	3.00 x 10 ⁻¹¹	1.40 x 10 ⁻⁰⁹	3.01 x 10 ⁻⁰⁹
OVCAR5	97.10	1.47 x 10 ⁻⁰⁸	3.20 x 10 ⁻¹⁰	>3.00 x 10 ⁻⁰⁹	8.46 x 10 ⁻⁰⁷
T-47D	559.58	3.42 x 10 ⁻⁰⁹	1.20 x 10 ⁻¹⁰	>3.00 x 10 ⁻⁰⁹	N/A
TOV-21G	87.79	3.07 x 10 ⁻¹⁰	4.80 x 10 ⁻¹¹	2.00 x 10 ⁻⁰⁹	6.88 x 10 ⁻⁰⁹
WISH	1133.55	2.38 x 10 ⁻⁰⁹	9.00 x 10 ⁻¹¹	4.60 x 10 ⁻¹⁰	6.69 x 10 ⁻¹⁰
ZR-75-1	811.67	4.30 x 10 ⁻⁰⁹	1.00 x 10 ⁻¹⁰	N/A	9.45 x 10 ⁻¹⁰

* fluorescencia media relativa máxima promedio

Las 4 líneas celulares fueron cultivadas in vitro, recolectadas, y 1 x 10⁷ células en 100PL de un medio libre de suero fueron inyectadas bajo el hombro derecho de cada ratón (6 ratones por modelo) y se dejaron crecer durante 6 días hasta un volumen de tumor promedio de 57.6 ± 6.7 y 90.2 ± 13.4 mm3 para los grupos de prueba y control respectivamente de OVCAR5, 147.1 ± 29. 6 y 176.2 ± 18.9 mm3 para los grupos de prueba y control respectivamente de HPAC, 194.3 ± 37.2 y 201.7 ± 71.7 mm3 para los grupos de prueba y control respectivamente de HeLa, y 96.6 ± 22.8 y 155.6 ± 13.4 mm3 para los grupos de prueba y control respectivamente de TOV-21 G, en cuyo momento se inicio el tratamiento de fármaco. Para cada modelo se trataron tres ratones de control con dos dosis semanales de PBS y tres ratones de prueba fueron tratados con dos dosis semanales de conjugado (600 µg/kg DM1) por vía intravenosa. Las respuestas tóxicas

114

fueron monitoreadas diariamente durante el tratamiento y los volúmenes de tumor y los pesos corporales fueron monitoreados a través del estudio. La eficacia del conjugado para los diferentes modelos se muestra de manera gráfica en las Figuras 26A, C, E, y G y los pesos corporales correspondientes están graficados en las Figuras 26B, D, F, y H. Las líneas celulares OVCAR5, TOV-21G, y HPAC forman tumores agresivos como se puede ver en los controles PBS para cada modelo. El modelo HeLa tuvo un período de retraso de aproximadamente 3 semanas antes de iniciar el crecimiento exponencial. En todos los modelos, el tratamiento de conjugado DS6-DM1 resultó en una regresión completa del tumor en todos los ratones. Para los modelos TOV-21G, HPAC, y HeLa los ratones se mantuvieron libres de tumor en el día 61. En el modelo OVCAR5 los tumores tuvieron recurrencia aproximadamente en el día 45 después de la inoculación del tumor. Por lo tanto, el tratamiento de DS6-DM1 en este modelo resulta en un retraso de crecimiento de tumor de aproximadamente 34 días. El retraso de crecimiento es significativo ya que las células OVCAR5 son menos sensibles a la maitansina y tienen menor expresión de epítipo CA6. En modelos en donde la densidad de epítipo CA6 es superior o el modelo tiene mayor sensibilidad a la maitansina, la regresión del tumor es más fuerte. Es importante observar que solamente se administraron 2 dosis. Claramente el programa de dosificación utilizado en este estudio no fue tóxico para los ratones ya que no se observó pérdida de peso. Es probable que pudieran lograrse curaciones con dosis de conjugado adicionales o más elevadas.

El cáncer de ovario humano es en gran medida una

enfermedad del peritoneo. Las células OVCAR5 crecen de manera agresiva como un modelo intraperitoneal (IP) en ratones SCID que forman nódulos de tumor y producen ascitos de una manera similar a la enfermedad humana. Para demostrar la actividad en un modelo IP, se utilizó DS6-DM1 para tratar ratones que tienen tumores OVCAR5 IP (Figura 27). Las células OVCAR5 fueron cultivadas in vitro, cosechadas y 1×10^7 células en 100 μ L de medio libre de suero fueron inyectadas por vía intraperitoneal. Se dejaron crecer los tumores durante 6 días en cuyo momento se inicio el tratamiento. Los ratones fueron tratados semanalmente durante 2 semanas con PBS o conjugado DS6-DM1 a una dosis de 600 μ g/kg DM1 y monitoreados para la pérdida de peso que resulta a partir de la enfermedad peritoneal. Para el día 28, el grupo PBS de ratones había perdido más del 20% del peso corporal y fueron sacrificados. El grupo tratado fue sacrificado en el día 45 después de exceder una pérdida de peso corporal del 20%. Este estudio demuestra que DS6-DM1 es capaz de retrasar el crecimiento del tumor en el modelo agresivo OVCAR5 IP a pesar del hecho de que las células OVCAR5 son menos sensibles a la maitansina y tienen pocos epítopes CA6 por célula. Debido a que el programa de dosificación utilizado no produjo signos visibles de toxicidad, es probable que pudieran utilizarse dosis adicionales y superiores para lograr retrasos de crecimiento de tumor adicionales o curaciones.

Ejemplo 17: Síntesis y Caracterización de Conjugado Citotóxico Taxoide DS6-SPP-MM1-202

DS6 fue modificado con el enlazador N-sulfosuccinimidil4-nitro-2-piridil-pentanoato (SSNPP). A 50 mg de DS6 Ab en 90% Regulador A, se agregaron 10 equivalentes 10% DMA de SSNPP en DMA. La concentración final de Ab fue 8 mg/ml. La reacción fue agitada durante 4 horas a temperatura ambiente, purificada después mediante cromatografía G25. La extensión de la modificación de anticuerpo se midió espectrofotométricamente utilizando la absorbancia a 280 nm (anticuerpo) y 325 (enlazador) y se encontró que tiene 3.82 enlazadores/anticuerpo. La recuperación del anticuerpo fue 43.3 mg dando un rendimiento del 87%. La conjugación de DS6-nitroSPP fue conjugada con Taxoid MM1-202 (1812 P.16). La conjugación se llevó a cabo en una escala de 42 mg en 90% Regulador A, 10% DM1. El taxoide fue agregado en 4 alícuotas de 0.43 eq/enlazador (cada alícuota) sobre un período de aproximadamente 20 horas. Para este momento la reacción se había vuelto notoriamente turbia.

Después de la purificación G25 el conjugado resultante, recuperado a un rendimiento de aproximadamente 64% tuvo alrededor de 4.3 taxoides/Ab y dejó aproximadamente 1 equivalente de enlazador sin reaccionar. Para enriar el enlazador sin reaccionar, se agregó 1 equivalente de cisteina/enlazador sin reaccionar al conjugado con agitación durante la noche. Un matiz amarillento definido fue notorio a la adición de la cisteina indicando la liberación de tiopiridina. La solución de reacción fue dializada después en Regulador B/0.01% Tween 20 seguido por diálisis adicional en Regulador B solo durante varios días. El conjugado final tuvo 2.86 fármacos/anticuerpo. La recuperación de anticuerpo fue de 4.7 mg, dando un rendimiento general del 35%.

Además el conjugado fue caracterizado bioquímicamente por medio de SEC y se encontró que tiene 89% de monómero, 10.5% de dímero y 0.5% de agregado de peso molecular superior.

5 Los resultaos de un análisis de citometría de flujo qué compara el enlace de taxoide DS6-SPP-MM1-202 contra anticuerpo DS6 en células HeLa se muestra en la Figura 28. Los resultados indican que DS6 retiene la actividad de enlace cuando es conjugado para un taxano.

SEQUENCE LISTING

<110> ImmunoGen, Inc.
PAYNE, Gillian
CHUN, Philip
TAVARES, Daniel

<120> A CA6 ANTIGEN-SPECIFIC CYTOTOXIC CONJUGATE AND METHODS OF USING THE SAME

<130> F179122

<150> 60/488,447

<151> 2003-07-21

<160> 63

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Ser Tyr Asn Met His
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr
1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met His
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 7

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> exon

<222> (1)..(321)

<400> 7

caa att gtt ctc acc caa tct cca gca atc atg tct gca tct cca ggg 48
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

gag aag gtc acc ata acc tgc agt gcc cac tca agt gta agt ttc atg 96
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met
20 25 30

cac tgg ttc cag cag aag cca ggc act tct ccc aaa ctc tgg att tat 144
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

agc aca tcc agc ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc ggt ggc agt 192
Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser
50 55 60

gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc cga atg gag gct gaa 240
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

gat gct gcc act tat tac tgc cag caa agg agt agt ttc ccg ctc acg 288
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
 85 90 95

ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgt 321
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 8
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> humanized murine antibody sequence

<220>
 <221> exon
 <222> (1)..(321)

<400> 8 48
 gag att gtt ctc acc cag tct cca gca acc atg tct gca tct cca ggg
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

gag agg gtc acc ata acc tgc agt gcc cac tca agt gta agt ttc atg 96
 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met
 20 25 30

cac tgg ttc cag cag aag cca ggc act tct ccc aaa ctc tgg att tat 144
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45

agc aca tcc agc ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc ggt ggc agt 192
 Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser
 50 55 60

gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc agc atg gag gct gaa 240
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

gat gct gcc act tat tac tgc cag caa agg agt agt ttc ccg ctc acg 288
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
 85 90 95

ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgt 321
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 9
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> exon

<222> (1)..(351)

<400> 9

cag gct tat ctc cag cag tct ggg gct gag ctg gtg agg tct ggg gcc	48
Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala	
1 5 10 15	

tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt acc agt tac	96
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
20 25 30	

aat atg cac tgg gta aag cag aca cct gga cag ggc ctg gaa tgg att	144
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	

gga tat att tat cct gga aat ggt gct act aac tac aat cag aag ttc	192
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe	
50 55 60	

aag ggc aag gcc aca ttg act gca gac cca tcc tcc agc aca gcc tac	240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Pro Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	

atg cag atc agc agc ctg aca tct gaa gac tct gcg gtc tat ttc tgt	288
Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys	
85 90 95	

gca aga cga gat tgg gtc ccg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctt	336
Ala Arg Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu	
100 105 110	

gtc act gtc tct gca	351
Val Thr Val Ser Ala	
115	

<210> 10

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> humanized murine antibody sequence

<220>

<221> exon

<222> (1)..(351)

<400> 10

cag gct cag ctc gtg cag tct ggg gct gag gtg gtg aag ccc ggg gcc	48
Gln Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	

tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt acc agt tac	96
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
20 25 30	

aat atg cac tgg gta aag cag aca cct gga cag ggc ctg gaa tgg att	144
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	

35	40	45	
gga tat att tat cct gga aat ggt gct act aac tac aat cag aag ttc			192
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe			
50	55	60	
cag ggc aag gcc aca ttg act gca gac aca tcc tcc agc aca gcc tac			240
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
atg cag atc agc agc ctg aca tct gaa gac tct gcg gtc tat ttc tgt			288
Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
	85	90	95
gca aga gga gat tcg gtc ccg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctt			336
Ala Arg Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
	100	105	110
gtc act gtc tct gcc			351
Val Thr Val Ser Ala			
	115		
<210>	11		
<211>	351		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	humanized murine antibody sequence		
<220>			
<221>	exon		
<222>	(1)..(351)		
<400>	11		
cag gct cag ctc gtg cag tct ggg gct gag gtg gtg aag ccc ggg gcc			49
Gln Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt acc agt tac			96
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
	20	25	30
aat atg cac tgg gta aag cag aca cct gga cag ggc ctg gaa tgg att			144
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
gga tat att tat cct gga aat ggt gct act aac tac aat cag aag ttc			192
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe			
50	55	60	
cag ggc aag gcc aca ttg act gca gac cca tcc tcc agc aca gcc tac			240
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Pro Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
atg cag atc agc agc ctg aca tct gaa gac tct gcg gtc tat ttc tgt			288
Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
	85	90	95

gca aga gga gat tgg gtc ccg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctt 336
 Ala Arg Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

gtc act gtc tct gcc 351
 Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 12

Gln Val Thr Ala Ile Pro Lys Pro Gly Gly Ala Ser Arg Glu Lys
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Glu Val Thr Ala Thr Pro Arg Pro Gly Gly Ala Ser Ser Glu Lys
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Glu Val Thr Gly Thr Pro Arg Pro Gly Gly Asp Ser Arg Glu Lys
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Glu Val Thr Gly Thr Pro Arg Pro Gly Gly Asp Ser Arg Glu Lys
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 16

Gln Tyr Gln Ala Leu Arg Ser Lys Lys Pro Gly Gln Gln Lys Lys Gly
1 5 10 15

Pro Ser Ser Ser Glu Gln Ser
20

<210> 17
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Gln Gln Val Ala Val Lys Pro Lys Lys Pro Gly Gln Gln Lys Gln Gly
1 5 10 15

Thr Ser Ser Ser Glu Gln Ser
20

<210> 18
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Gln Val Ala Val Lys Pro Lys Lys Pro Gly Gln Gln Lys Gln Gly Glu
1 5 10 15

Ser Ser Ser Glu Gln Ser
20

<210> 19
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Gln Val Ala Val Lys Pro Lys Lys Pro Gly Gln Gln Lys Gln Gly Glu
1 5 10 15

Ser Ser Ser Glu Gln Ser
20

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 20

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
1 5 10

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 21

Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn
1 5 10

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 22

Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr
1 5

<210> 23
<211> 95
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 23

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

<210> 24
<211> 98

8/25

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 24

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 25
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 25
tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tgggtgc

46

<210> 26
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 26
ggaggatcca tagacagatg ggggtgtcgt tttggc

36

<210> 27
<211> 32
<212> DNA

9/25

131

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 27

gggagctcga yattgtgnts acmcarwctm ca

32

<210> 28

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 28

cttcggaat tcsargtnma gctgsagsag tc

32

<210> 29

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 29

cttcggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg

35

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate primer

<400> 30

ttttgaattc aataactaca ggtgtccact

30

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

10/25

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate primer

<400> 31

ttttgagctc cagattttca gcttctgct

30

<210> 32

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 32

cgatggggccc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccaga

40

<210> 33

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 33

ttttcgtacg ttccagctcc agcttggt

28

<210> 34

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 34

caggtgtaca ctcccaggt tatctccagc agtct

35

<210> 35

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 35

cgatggggccc ttggtggagg cggcagagac agtgaccaga

40

<210> 36

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR primer
 <400> 36
 caggtgtaca ctccgagatt gttctcacc cagtctccagc aaccatgtct gcatct 56
 <210> 37
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR primer
 <400> 37
 ggcactgcag gttatggatga ccctctcccc tggaga 36
 <210> 38
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR primer
 <400> 38
 caatcagcag catggaggct gaaga 25
 <210> 39
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR primer
 <400> 39
 gcctccatgc tgctgattgt gaga 24
 <210> 40
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR primer
 <400> 40
 caggtgtaca ctcccaggct cagctcgtg cagtctggggc tgaggtgggtg aagcccgggg 60
 cctcagt 67
 <210> 41

<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 41
ttgactgcag acacatcttc cagcaca

27

<210> 42
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 42
gtgtctgcag tcaatgtggc cttgccctgg aacttctgat

40

<210> 43
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 43
cgatgggccc ttggtggagg cggcagagac agtgacaaga

40

<210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 44

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Phe Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

13/25

135

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Ile Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 45
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 45

Xaa Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Asn Ile
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Gly Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 46
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 46

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Ser Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Thr Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 47
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 47

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Val Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 48
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 48

Gln Ile Val Ser Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Arg Ser Tyr Met
 20 25 30

Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser Tyr Thr Phe Gly
 85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 49
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 49

Gln Thr Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Ile
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Ser Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

16/25

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ala Ser Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 52
<211> 110
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 52

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
100 105 110

<210> 53
<211> 109
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 53

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Glu Thr Ser Pro Lys Pro Trp
35 40 45

Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 54

<211> 117

<212> FRT

<213> Mus musculus

<400> 54

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

19/25

Ala Arg Gly Gly Lys Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 55
<211> 122
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 55

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Arg Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Phe Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Gly Gly Ser Tyr Arg Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 56
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 56

Gln Gly Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Trp Val Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Asn Lys Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Tyr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Gly Asn Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 57
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 57

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
21/25

100

105

110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 58
<211> 121
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 58

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Val Glu Leu Val Arg Ala Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn
20 25 30

Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Asn Asn Pro Gly Asn Gly Tyr Ile Ala Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Glu Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Lys Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 59
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 59

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Lys Thr Thr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 60
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 60

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Gly Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly His Ser Tyr Tyr Phe Tyr Asp Gly Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 61
<211> 124
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 61

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ala Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Val Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Gly Lys Gly Tyr Leu Ser Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ala Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Phe Tyr Gly Gly Ser Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Phe Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 62
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 62

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 63
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 63

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Asp Asp Asn Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val
115