

11/1/06



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06-2587

21. EXPEDIENTE No.

06-2587

54. TÍTULO UN CONJUGADO CITOTOXICO CAG ANTIGENO-
ESPECIFICO Y METODOS PARA UTILIZAR EL MISMO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K39/395, C07H21/04

71. SOLICITANTE IMMUNOGEN, INC.

DOMICILIO CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS
DE AMERICA

74. APODERADO HUBERTO RUBIO CANACHO

22. BOGOTÁ, D. C., 13 DE ENERO DE 2006

PETTORIO

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 2006-21-FEB.

① SOLICITUD DE:
☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Capítulo I ☒ Capítulo II

SOLICITANTE (71)
Nombre: **IMMUNOGEN, INC.**
Dirección: **128 Sidney Street**
Teléfono: **3132408** Fax: **3131647**
E-mail:
Domicilio: **CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**
Lugar de constitución: **MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**

REPRESENTANTE (74)
Nombre: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO** IDENTIFICACIÓN
Dirección: **Carrera 7 No. 74 - 64, Of. 506 C.C.** ☒ NIT ☐
O APODERADO Teléfono: **3132408** Fax: **3131647** C.E. ☐ OTRO ☐
E-mail: No. 17'192.002 T.P. 50.007 CSJ

② **INVENTOR(ES)** (72)
Nombre: 1.- **Gillian PAYNE**
2.- **Philip CHUN**
3.- **Daniel, J. TAVARES**
Dirección: 1.- **21 Oak Vale Road, Waban**
2.- **181 Pleasant Street #25, Malden**
3.- **27 Sylvester Rd, Natick**
Teléfono: **3132408** Fax: **3131647**
E-mail:
Domicilio: **MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

③ **PCT (86)**
Solicitud Internacional No. **PCT/US2004/023340** Fecha **21 DE JULIO DE 2.004**
Publicación Internacional No. **WO 2005/009369** Fecha **3 DE FEBRERO DE 2.005**

TITULO (54) "UN CONJUGADO CITOTÓXICO CAG ANTIGENO-ESPECIFICO Y METODOS PARA UTILIZAR EL MISMO"

Clasificación Internacional (51) **A61K39/395, C07H21/04**

Prioridad solicitud	(33) País de origen	(32) Fecha	(31) Número	de
SI ☒ NO ☐	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	21 DE JULIO DE 2.003	60/488,447	

Comprobante de pago No. **06-2,617** Fecha: **12 DE ENERO DE 2.006**

cpfm

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE PATENTE DE INVENCION
DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

(21) No. SOLICITUD: (51) INT. CL:
(22) FECHA DE PRESENTACIÓN: (71) SOLICITANTE: **IMMUNOGEN, INC.**

(30) PRIORIDAD: **ESTADOUNIDENSE**

(31) No. DE SOLICITUD: **60/488,447** (72) INVENTORES: **Gillian PAYNE**
Philip CHUN
Daniel, J. TAVARES

(32) FECHA DE PRESENTACIÓN: **21 DE JULIO DE 2.003**

(33) PAÍS: **ESTADOS UNIDOS DE AMERICA** (74) APODERADO: **Humberto RUBIO CAMACHO**

Solicitud Internacional No. **PCT/US2004/023340** Fecha **21 DE JULIO DE 2.004**

Publicación Internacional No. **WO 2005/009369** Fecha **3 DE FEBRERO DE 2.005**

FECHA ENTRADA EN FASE NACIONAL:

(54) TITULO: UN CONJUGADO CITOTÓXICO CA6 ANTIGENO-ESPECIFICO Y METODOS PARA UTILIZAR EL MISMO"

RESUMEN:

Un anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo que comprende por lo menos una región de determinación complementaria que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada a partir del grupo que consta de ID SEC NOS: 1-6:

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)

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

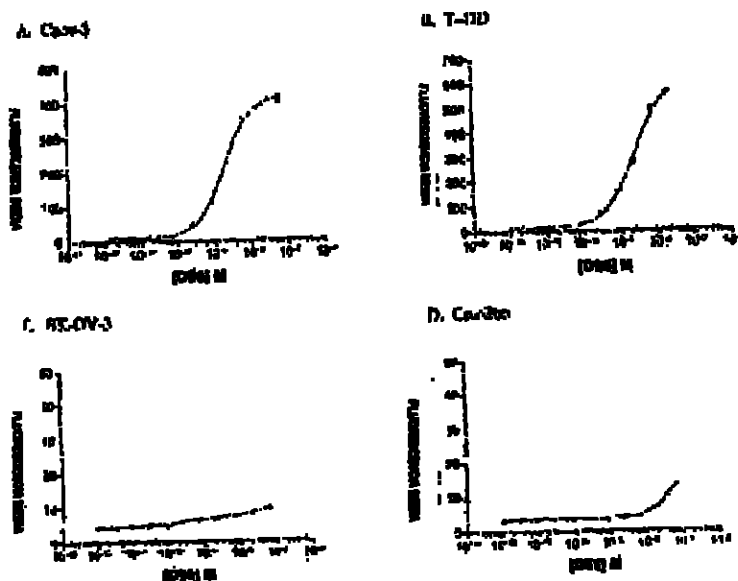
S T S S L A S (ID SEC NO: 5)

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

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica. *Se acompaña copia simple. Copia autenticada*
- ☒ Poderes, si fuere el caso. *reponer en el Exp. 05-014917*
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la publicación PCT
- ☒ Copia informe búsqueda internacional.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ Copia de las modificaciones efectuadas de acuerdo con el Artículo 28 PCT en Fase Nacional.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros

(11) Figura característica:



(12)

HUMBERTO RUBIO CAMACHO

FIRMA

[Handwritten signature]

C.C.

17'192.062 de Bogotá

T.P.

50.007 Consejo Superior de
La Judicatura

PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO A.C.IA.L.TDA
- SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicacion : 06002567 00000000 Folios: 191
Fecha (AM): 2006-01-13 14:10:10
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

REGISTRO
PATENTE DE INVENCION: "UN
CONJUGADO CITOTÓXICO CAS
ANTIENDO-ESPECIFICO Y METODOS PARA
UTILIZAR EL MISMO"

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 2,617
FECHA : ENERO 12 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO ABOGADOS L	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	37204143	12/01/2006	2,829,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

The Commonwealth of Massachusetts

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. **Country:** United States of America

This public document

2. **has been signed by:** Kelly Donnelly

3. **acting in the capacity of:** Notary Public

4. **bears the seal/stamp of:**

the State of Massachusetts, whose commission expires on July 18, 2008

Certified

5. **at:** Boston, Massachusetts

6. **the:** 16 March, 2005

7. **by:** the Secretary of the Commonwealth

8. **No.:** 1055182

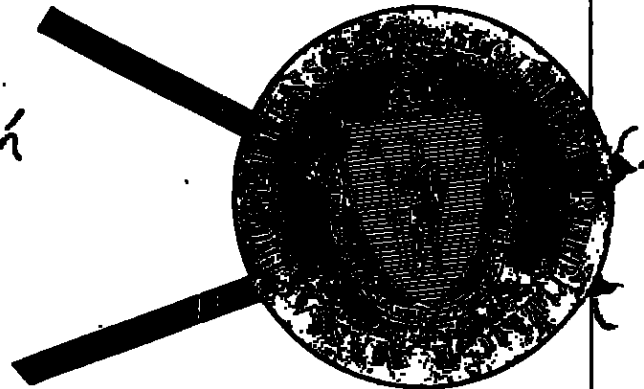
9. **Seal/stamp:**

Great Seal of the Commonwealth

10. **Signature:**



William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth



6
HUMBERTO RUBIO & CIA LTDA.
ABOGADOS

PODER

El abajo firmado, en nombre y representación de

IMMUNOGEN, INC

Domiciliado en:

**128 Sidney Street, Cambridge,
Massachusetts, Estados Unidos
de América**

por el presente conferimos poder amplio y suficiente a HUMBERTO RUBIO CAMACHO y/o TINEKE STOL TERZANI y/o HUMBERTO RUBIO STOL y/o ALVARO DIAZ LOZANO y/o MARCELA GOMEZ RUBIO domiciliados en Bogotá, Colombia, para solicitar de las oficinas y autoridades correspondientes la obtención de registros, renovaciones, trasposos y en general todo lo relacionado con el mantenimiento, obtención y protección de sus marcas de fábrica, denominaciones comerciales, marcas de comercio y patentes, licencias sanitarias a cuyo efecto le faculta para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios en cumplimiento del objeto indicado; elevar solicitudes, descripciones, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos; abonar todos los impuestos y cuotas de cualquier otros pagos determinados por la Ley, recibir todos los documentos presentados, solicitar testimonios, desistir y enmendar solicitudes, cobrar y percibir para oponerse y protestar contra cualquier solicitud, que a juicio del apoderado, pudieran prestarse a confusión o infringir o de cualquier modo perjudicar las marcas, denominaciones o patentes del Mandante. A los mandatarios se les otorga autorización amplia y bastante para contestar todos los reclamos y las demandas presentadas ante autoridades administrativas y judiciales, desistir de procedimientos, transar conflictos, pudiendo así mismo sustituir este. Poder en todo o en parte y revocar dichas sustituciones.

Dado y firmado hoy

En

Firma(s)/ Signature(s)


Walter A. Blattler, Vice President, Research

Nombre de cada firmante/
Name of each signor

**Executive Vice President,
Science and Technology**

Cargo de cada firmante/
Position of each signor

POWER OF ATTORNEY

The undersigned, in the name and on behalf of

IMMUNOGEN, INC.

with domicile at:

**128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139-4239, US**

hereby grant full and sufficient Power of Attorney to a HUMBERTO RUBIO CAMACHO y/o TINEKE STOL TERZANI y/o HUMBERTO RUBIO STOL y/o ALVARO DIAZ LOZANO y/o MARCELA GOMEZ RUBIO from Bogotá, Colombia, to apply to the proper officers and authorities for the issue of registrations, renewals, assignments, proofs of renewals and in general all that is related to the maintenance, obtention and protection of its trademarks, tradenames, commercial marks, patents and sanitary licenses; to which end it empowers them to take all steps necessary before said authorities for the object stated; to file petitions, prepare descriptions; make protests, declarations, appeals and objections; pay taxes and other charges required by law; apply for certifications, receive documents and take testimony abandon and amend applications and collect refunds; to oppose, ask for the cancellation of and protest any application or registration which in their judgment could lend to confusion or could be considered an infringement or could in any form prejudice the undersigned's trademarks, tradenames, patents and commercial marks. To the said mandatory sufficient Power is granted hereby to answer in the matter of all claims and demands that maybe presented, before administrative or judicial officers of any class, giving them likewise Power to abandon proceeding, settle conflicts, substitute these present in whole or in part and revoke such substitutions.

Given and signed this

in Cambridge, MA, USA

7
HUMBERTO RUBIO & CIA LTDA.
ABOGADOS

CERTIFICADO NOTARIAL (Individuo)

A los días del mes de ante mi,
Notario Público de compareció personalmente

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que
es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento
que precede, y quien(es) tiene(n) capacidad legal para
otorgarlo.

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy 8 de Agosto 2005
compareció(eron) personalmente

Walter A. Blattler

a quien(es) conozco como la(s) persona(s) que
firma(n) este documento en representación de la
sociedad/compañía denominada

IMMUNOGEN, INC.

Certifico:

a) Que

IMMUNOGEN, INC.

es una sociedad/compañía legalmente constituida y
existente de acuerdo con las Leyes de U.S.A.

b) Que el domicilio de dicha sociedad/compañía es
120 Sidney Street, Cambridge
Massachusetts U.S.A.

c) Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el
presente poder están comprendidos dentro del objeto
social de la mencionada sociedad/compañía.

d) Que

Walter A. Blattler

está autorizado para otorgar el presente poder. Lo
anterior está probado por medio de los documentos,
que certifico he visto.

Ciudad hoy 8 de Agosto
de 2005.

NOTARIAL CERTIFICATE (Individual)

On this 8 day of March before me, a Notary
Public of MA personally appeared to

me known, and known to me to be the person(s) who
executed that foregoing document, and who has
(have) legal capacity to execute it.

NOTARIAL CERTIFICATE (Corporation)

On this 8 day of March, 2005
personally appeared Walter Blattler

whom I know to be the person(s) who signed this
document as representative(s) of the
corporation/company named

Immunogen, Inc.

I Certify:

a) That

Immunogen, Inc.

is a corporation/company legally constituted and in
existence accordance with the law of U.S.A.

b) That the domicile of said corporation/company is

c) That the purpose or purposes for which the present
Power of Attorney is granted are compromised
within the object set forth in the charter of the
mentioned corporation/company.

d) That Mr(s).

Walter Blattler P

is authorized to grant the present Power of Attorney.
The aforementioned was duly proven through the
documents and I duly verify having seen them.

State MA

This 8 day of March, 2005

Kelly A. Donnelly

7.18.08 Commission

TRADUCCION OFICIAL No. 064-05, DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS, SELLADO CON EL SELLO DEL SUSCRITO TRADUCTOR OFICIAL, HOY MARZO 28, 2005, EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA.

La Comunidad de Massachusetts

William Francis Galvin

Secretario de la Comunidad

Apostilla

(Convention de la Haya du 5 octobre 1961)

1. Ciudad: Estados Unidos de América
Este documento publico
2. Ha sido firmado por: KELLY DONNELLY
3. Actuando como: NOTARIO PUBLICO
4. Porta el sello y estampilla de:
El Estado de Massachusetts, cuyo nombramiento vence Julio 18, 2008

CERTIFICADO

5. En: Boston-Massachusetts
6. El 16 de Marzo del 2005
7. por: el Secretario de la Comunidad
8. No. 1055182
9. Sello y estampilla:
10. Firma:

Gran Sello de la Comunidad

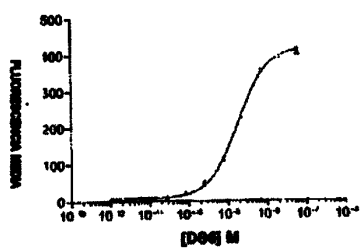
William Francis Galvin
Secretario de la Comunidad

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2005 MAR 30 A 46
Jefe de LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

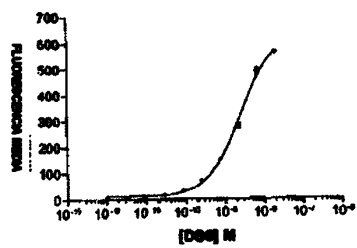
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
Sergio Cloutier
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

Sergio Cloutier Salazar Mendez
Traductor e Interprete Oficial
Resol. No. 2839 Minjusticia 1991

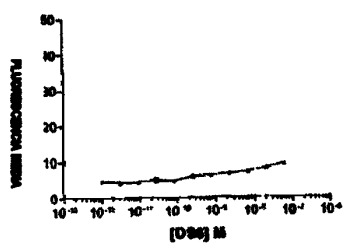
A. Caov-3



B. T-47D



C. SK-OV-3



D. Colo205

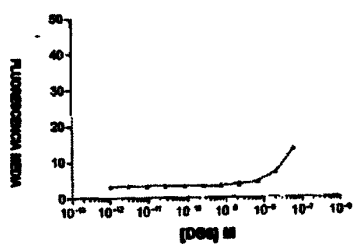


FIGURA 1

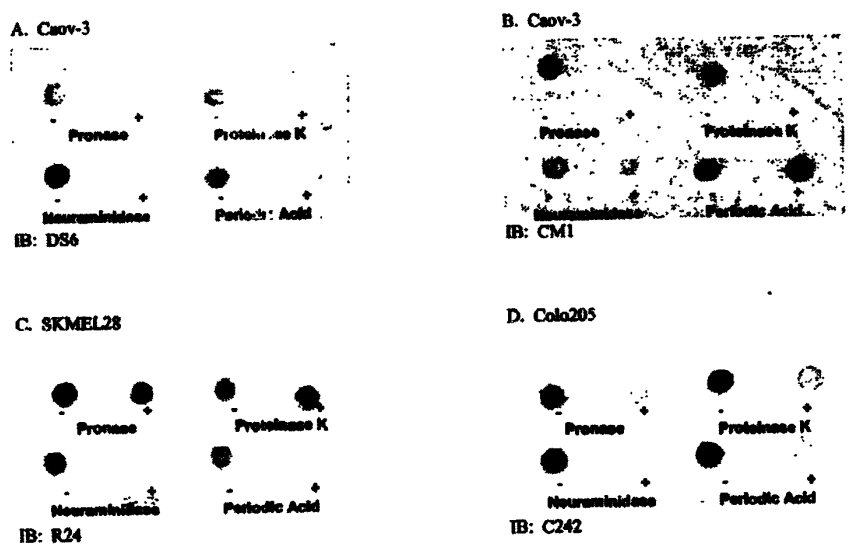


FIGURA 2

8

FIGURA 3

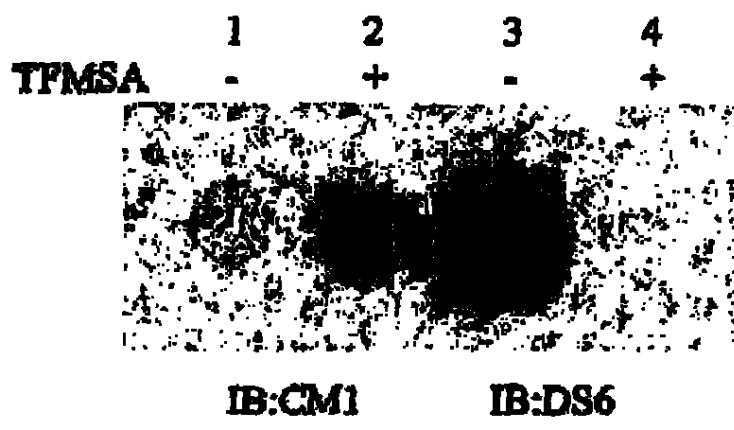


FIGURA 4

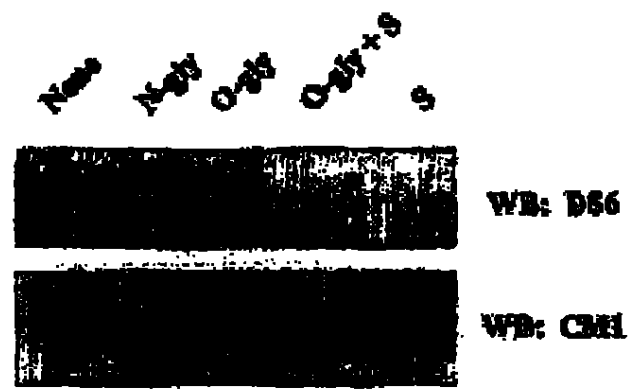


FIGURA 5

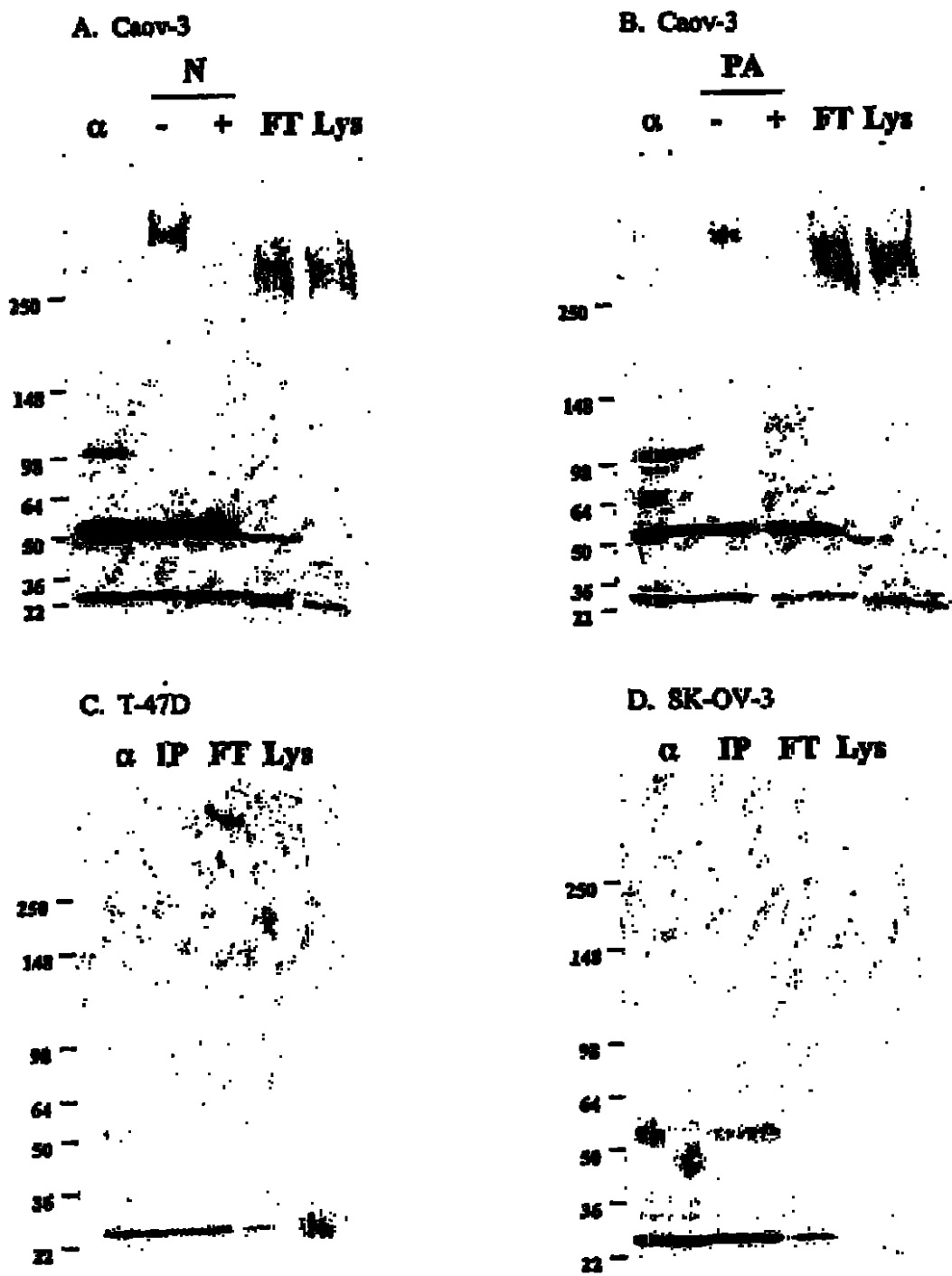
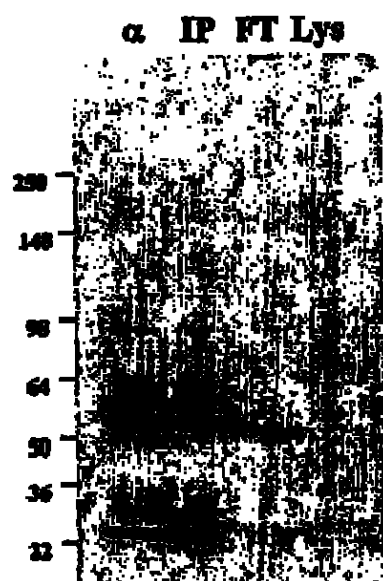


FIGURA 5 – (CONTINUACIÓN)

E. Colo205



F. Cacr-3

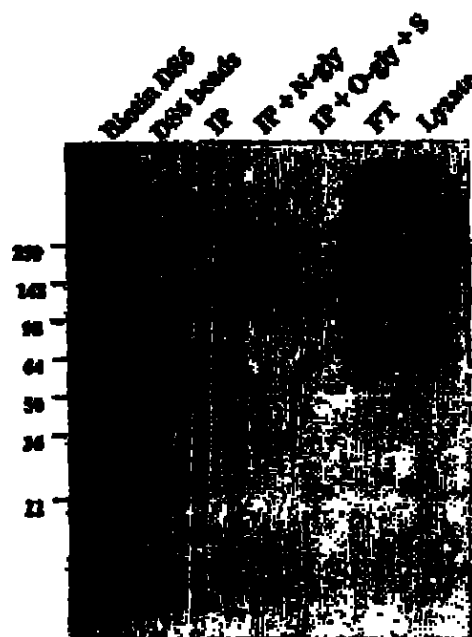


FIGURA 6

A. Caov-3

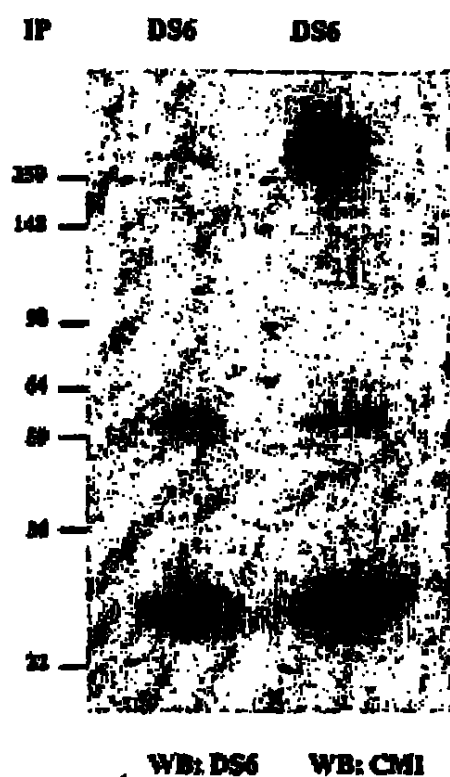


FIGURA 7

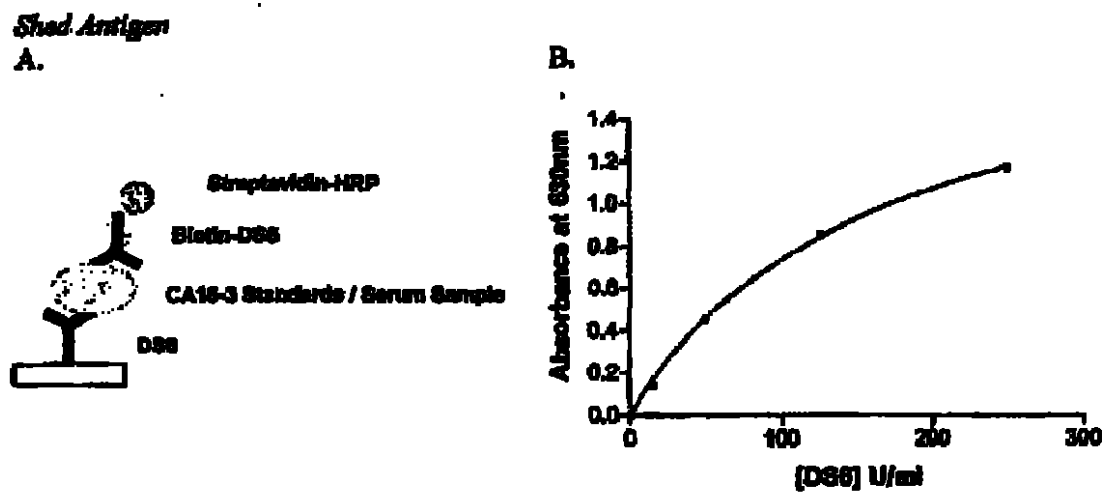


FIGURA 8

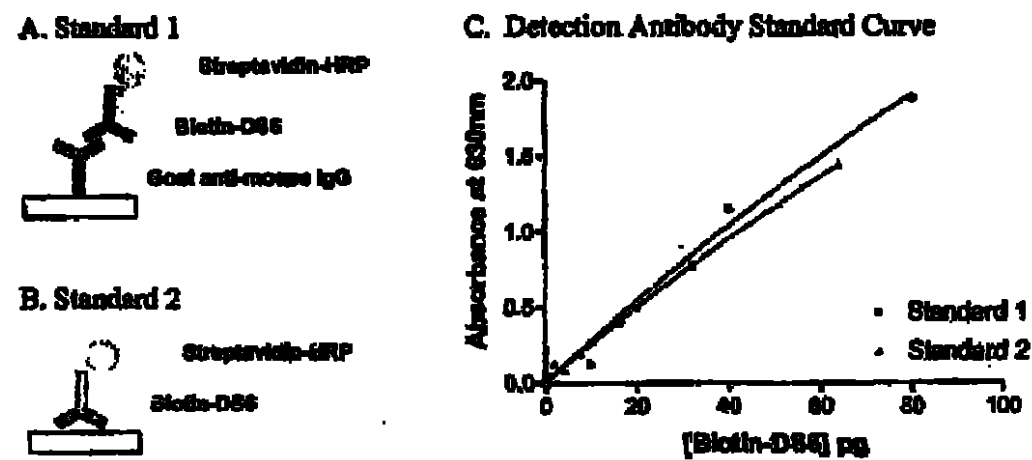


FIGURA 10

A. Light Chain

CDR1: S A H S S V S F M H - SEQ ID NO:4

CDR2: S T S S L A S - SEQ ID NO:5

CDR3: Q Q R S S F P L T - SEQ ID NO:6

B. Heavy Chain

CDR1: S Y N M H - SEQ ID NO:1

CDR2: Y I Y P G N G A T N Y N Q K F K G - SEQ ID NO:2

CDR3: G D S V P F A Y - SEQ ID NO:3

C. AbM Heavy Chain

CDR1: G Y T F T S Y N M H - SEQ ID NO:20

CDR2: Y I Y P G N G A T N - SEQ ID NO:21

CDR3: G D S V P F A Y - SEQ ID NO:22

FIGURA 11

Light Chain			
		1	50
IgVKap4	(1)	QIVLTQSPAIMSASPGERVITTCSESSSVSYNENFQQKPGTSPKLNITYT	
msDS6LC	(1)	QIVLTQSPAIMSASPGERVITTCSESSSVSYNENFQQKPGTSPKLNITYT	
		51	95
IgVKap4	(51)	SLLASGVPAHTSCSGSGTSYSLTISMEAEADAATYYQQRSSIP	
msDS6LC	(51)	SLLASGVPAHTSCSGSGTSYSLTISMEAEADAATYYQQRSSIP	
Heavy Chain			
		1	50
IgVh J558.41	(1)	QAYLQDSGAEIVRSGAEVNSCHASGYTFTSYIMHNVKQTPGQGLEWICY	
msDS6HC	(1)	QAYLQDSGAEIVRSGAEVNSCHASGYTFTSYIMHNVKQTPGQGLEWICY	
		51	98
IgVh J558.41	(51)	IYPGNGFTNYDKFGKATLTADTSSTINQISLTSED SAVYTCAR	
msDS6HC	(51)	IYPGNGFTNYDKFGKATLTADTSSTINQISLTSED SAVYTCAR	

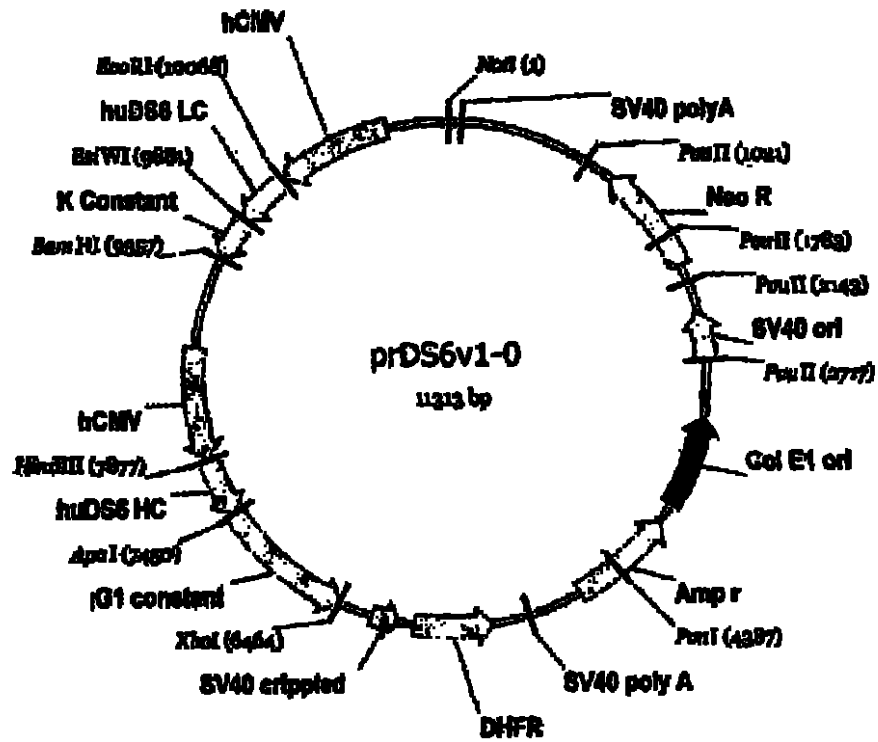
FIGURA 14

FIGURA 15

A. Light chain amino acid sequence (murine and human residue variability shaded)

Kabat #	1	51
muDS6LC	QIVLQSPFASASPGSRVTITCSARSSVSINHWFDQKPGTSPKLNITYST	
huDS6LC v1.0	QIVLQSPFASASPGSRVTITCSARSSVSINHWFDQKPGTSPKLNITYST	
huDS6LC v1.2	QIVLQSPFASASPGSRVTITCSARSSVSINHWFDQKPGTSPKLNITYST	
Kabat #	52	101
muDS6LC	SSLASGVFARFGSGSGTSYSLTISPHNEASRAATTCQQRSSFPFLTFGAG	
huDS6LC v1.0	SSLASGVFARFGSGSGTSYSLTISPHNEASRAATTCQQRSSFPFLTFGAG	
huDS6LC v1.2	SSLASGVFARFGSGSGTSYSLTISPHNEASRAATTCQQRSSFPFLTFGAG	
Kabat #	102	
muDS6LC	TELELR - SEQ ID NO:7	
huDS6LC v1.0	TELELR - SEQ ID NO:8	
huDS6LC v1.2	TELELR - SEQ ID NO:8	

B. Heavy chain amino acid sequence (murine and human residue variability shaded)

	1	50
5C	QATLQSGARFASASVENSCKASGYTFTSYNHWYQTFPGGLEWIGY	
.0	QATLQSGARFASASVENSCKASGYTFTSYNHWYQTFPGGLEWIGY	
huDS6HC v1.2	QATLQSGARFASASVENSCKASGYTFTSYNHWYQTFPGGLEWIGY	
Kabat #	51	96
muDS6HC	IYPGNATYNGKPKKATLTADPSSTATNQISSLTSEDSAVYFCARD	
huDS6HC v1.0	IYPGNATYNGKPKKATLTADPSSTATNQISSLTSEDSAVYFCARD	
huDS6HC v1.2	IYPGNATYNGKPKKATLTADPSSTATNQISSLTSEDSAVYFCARD	
Kabat #	97	114
muDS6HC	SVETAYNGQGLVTVSA - SEQ ID NO:9	
huDS6HC v1.0	SVETAYNGQGLVTVSA - SEQ ID NO:10	
huDS6HC v1.2	SVETAYNGQGLVTVSA - SEQ ID NO:11	

FIGURA 16

huDS6 Light Chain (v1.0 and v1.2) - SEQ ID NO:8

```

      R I V L T Q S P A T N S A S P G E
1  GAGATTGCTC TCACCCATC TCACGCAAC ATGCTGCAAT CTCAGGGCA

      R V T I T C S A R S S V S F N H
51 GAGGTCACC ATAACCTCA GTGCCACTC AAGTGTAGT TTCATGCACT

      W F Q Q K P G T S P K L N I Y S T
101 GGTTCAGCA GAGCCAGGC ACTCTGCCA AACTCTGGAT TTATAGCACA

      S S L A S G V P A A T G G S G S G
151 TCAGGCTGG CTCTGAGT COTGCTCC TTCTGTGCA GTGATCTGC

      T S Y S L T I S S N E A E D A A
201 GAGCTCTAC TCTCTCACA TCAGCAGCA GGAGGCTGAA GATGCTCCA

      T Y Y C Q Q R S S F P L T F G A G
251 CTTATTACTG CCAGCAAGG AGTAGTTTC CECTCAAGT CGGTGCTGG

      F K L E L K E
      ACCAGCTGS AACTGAAGC T

```

FIGURA 17

A. huDS6 Heavy Chain v1.0 - SEQ ID NO:10

Q A Q L Q V S G A E V V K P G A S
 1 CAGGCTCAGC TCCAGGTGTC TGGGGCTGAG GTGGTGAAGC CCGGGGCCTC

 V K M S C K A S G Y T F T S Y N
 51 AGTGAGATG TCGTGCAGG CTTCTGGCTA CACATTACG AGTTACAATA

 M R W V K Q T P G Q S L E W I G Y
 101 TGCCTGGGT AAGCAGACA CCTGGACAGG GCGTGGATG GATTGGATAT

 I Y P G N G A T N Y N C K P Q G K
 151 ATTATCCTG GAAATGGTC TACTACTAC AATCAGAGT TCCAGGGCAA

 A T L T A D T S S S T A Y M Q I
 201 GGGCAGTTG ACTGCAGACA CATCTCCAG CACAGCCTAC ATGCAGATCA

 S S L T S E D S A V Y F C A R G D
 251 GCAGCCTGAC ATCTGAGAC TCTGGGTCT ATTCTCTGC AAGAGGAGAT

 S V P F A Y W G Q G T L V T V S A
 301 TCGTCCGT TTGCTACTG GGGCCAAGG ACTCTGTCA CTGTCTCTC

351 C

B. huDS6 Heavy Chain v1.2 - SEQ ID NO:11

Q A Q L Q V S G A E V V K P G A S
 1 CAGGCTCAGC TCCAGGTGTC TGGGGCTGAG GTGGTGAAGC CCGGGGCCTC

 V K M S C K A S G Y T F T S Y N
 51 AGTGAGATG TCGTGCAGG CTTCTGGCTA CACATTACG AGTTACAATA

 M R W V K Q T P G Q S L E W I G Y
 101 TGCCTGGGT AAGCAGACA CCTGGACAGG GCGTGGATG GATTGGATAT

 I Y P G N G A T N Y N C K P Q G K
 151 ATTATCCTG GAAATGGTC TACTACTAC AATCAGAGT TCCAGGGCAA

 A T L T A D T S S S T A Y M Q I
 201 GGGCAGTTG ACTGCAGACC CATCTCCAG CACAGCCTAC ATGCAGATCA

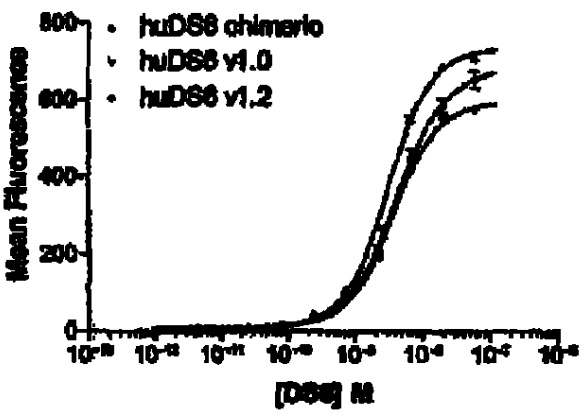
 S S L T S E D S A V Y F C A R G D
 251 GCAGCCTGAC ATCTGAGAC TCTGGGTCT ATTCTCTGC AAGAGGAGAT

 S V P F A Y W G Q G T L V T V S A
 301 TCGTCCGT TTGCTACTG GGGCCAAGG ACTCTGTCA CTGTCTCTC

351 C

FIGURA 18

A.



B.

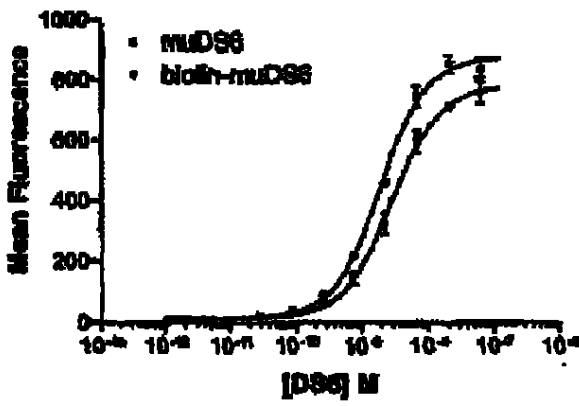


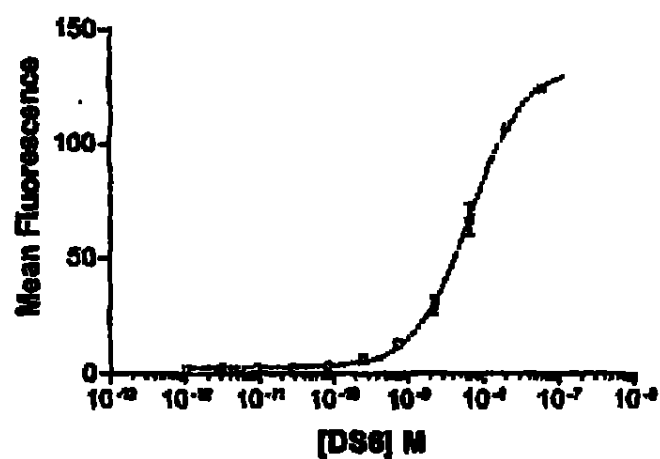
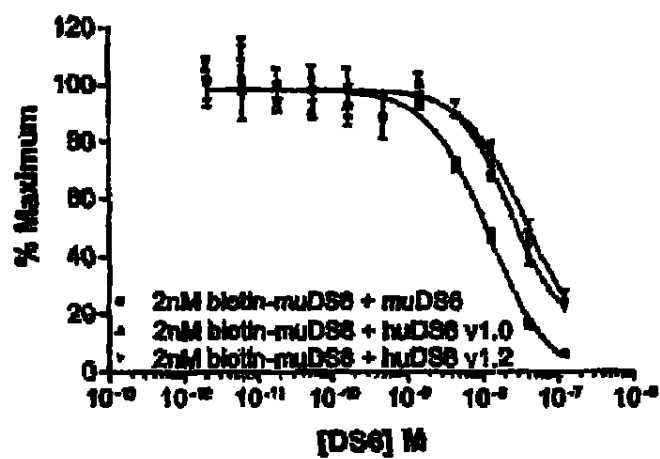
FIGURA 19**A.****B.**

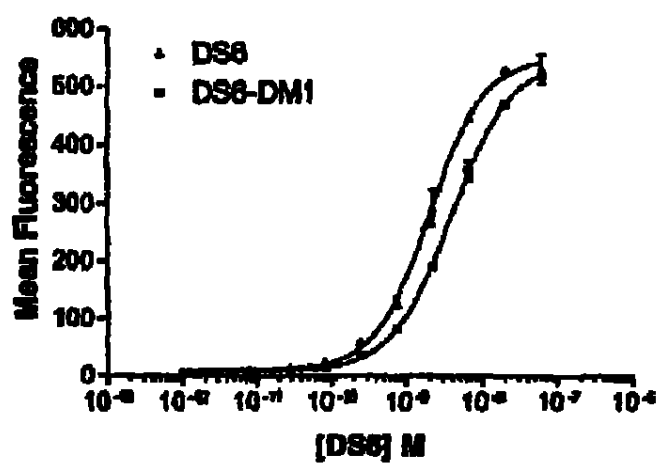
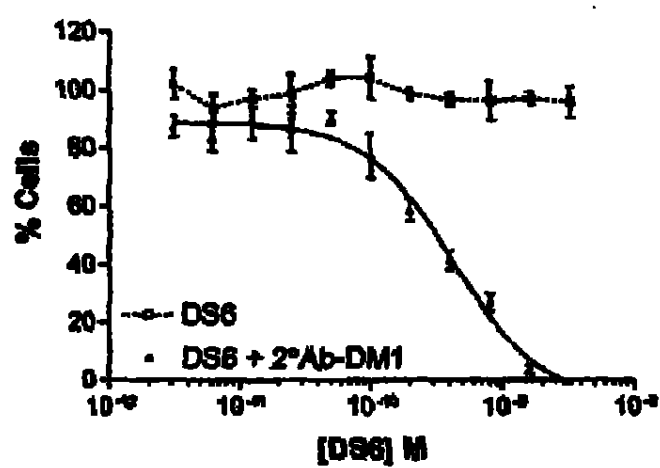
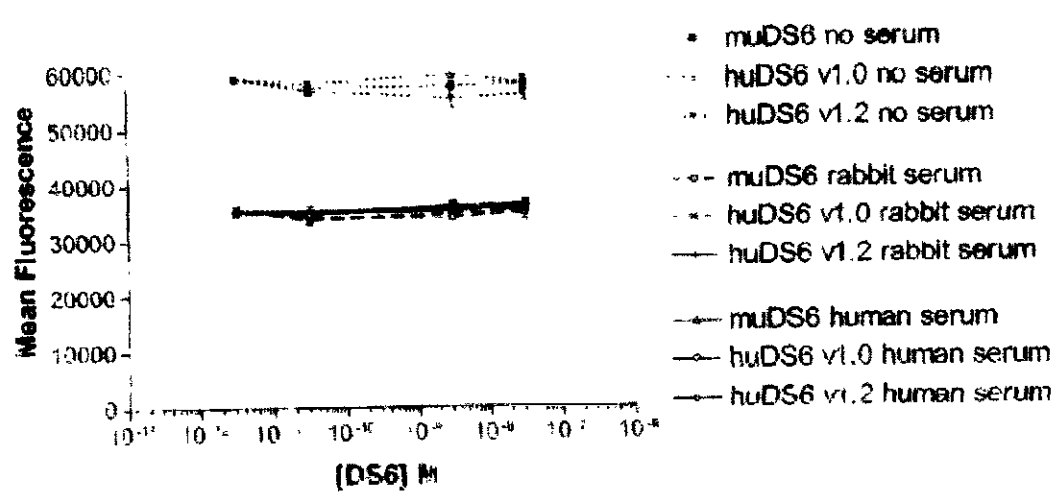
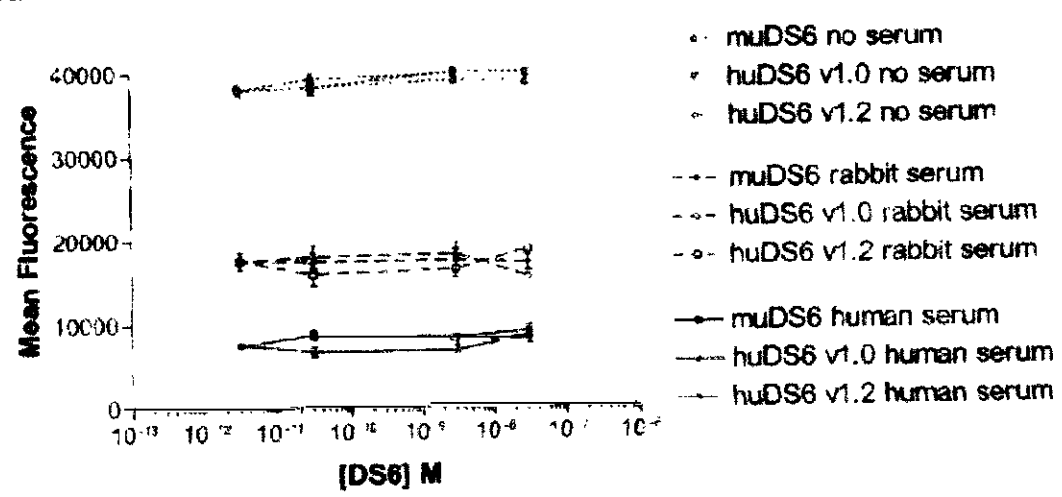
FIGURA 20**FIGURA 21**

FIGURA 22

A. HPAC



A. Human ovarian cancer cell lines

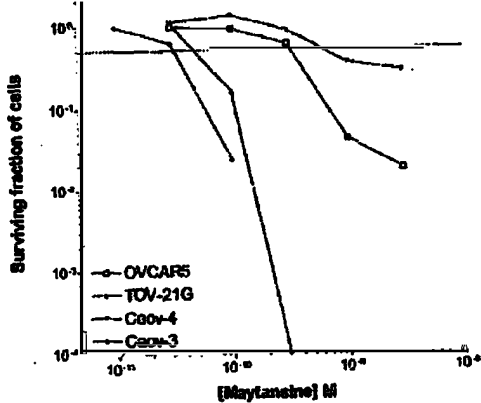
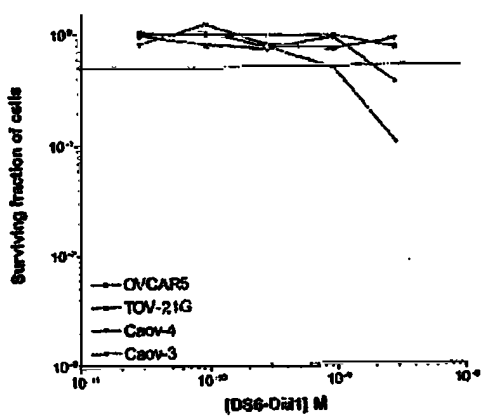


FIGURA 23

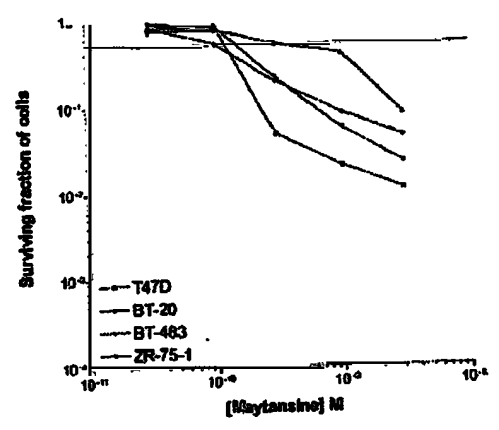
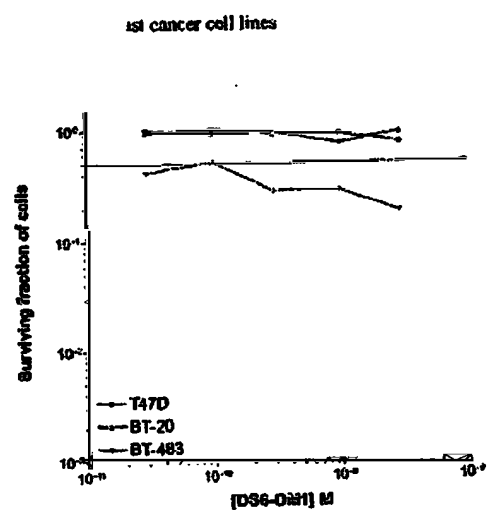


FIGURA 23 - Continuación

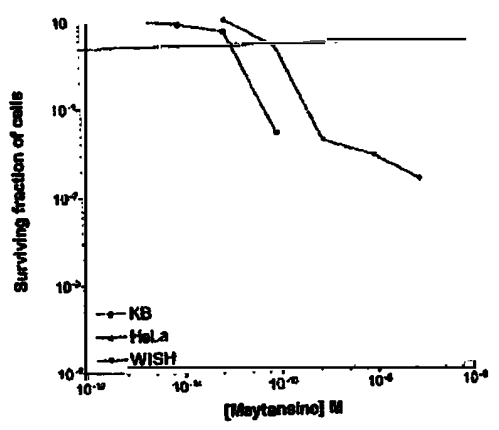
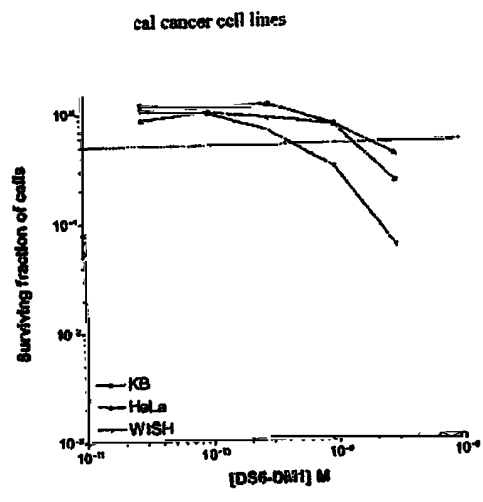


FIGURA 23 - Continuación

pancreatic cancer cell lines

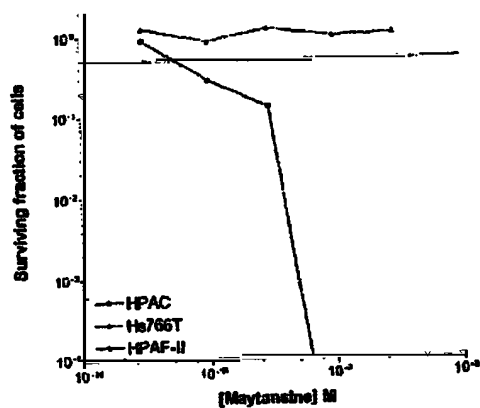
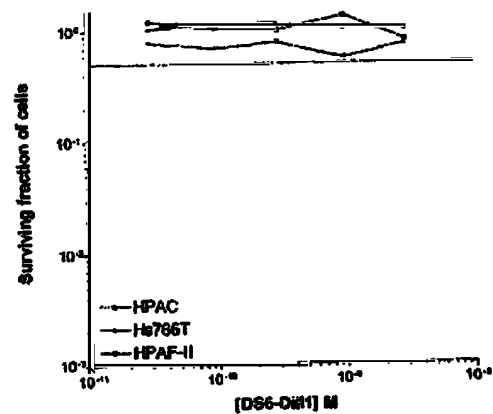


FIGURA 23 - Continuación

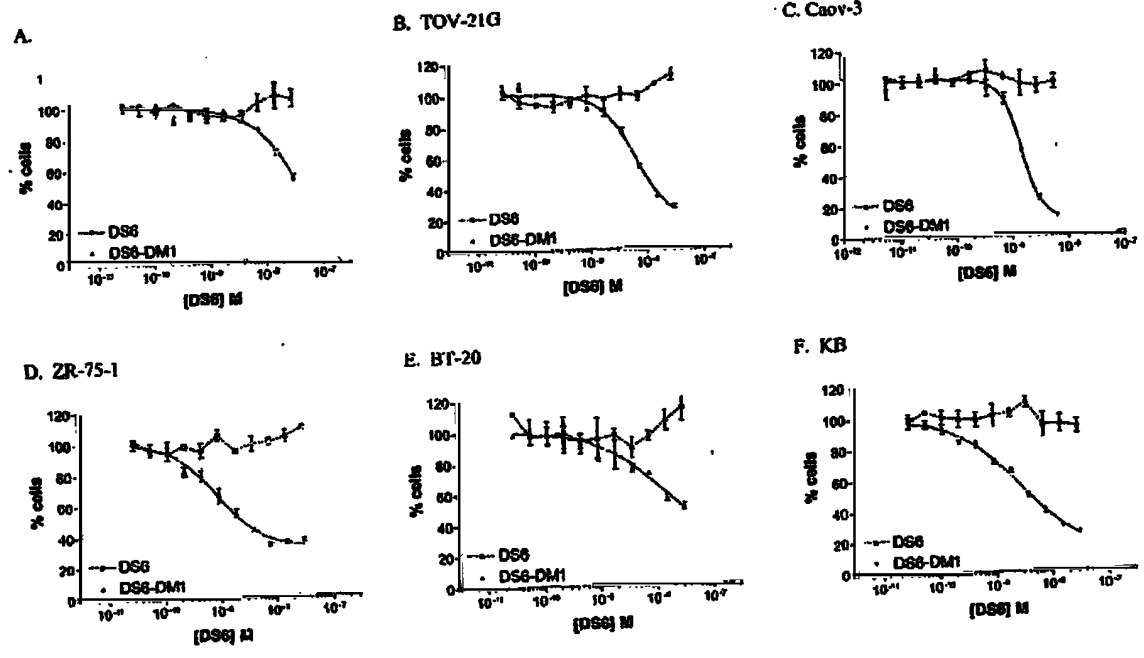


FIGURA 24

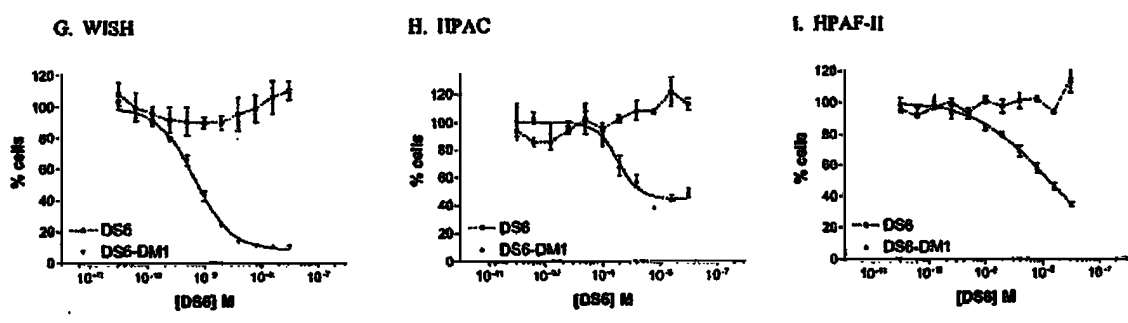
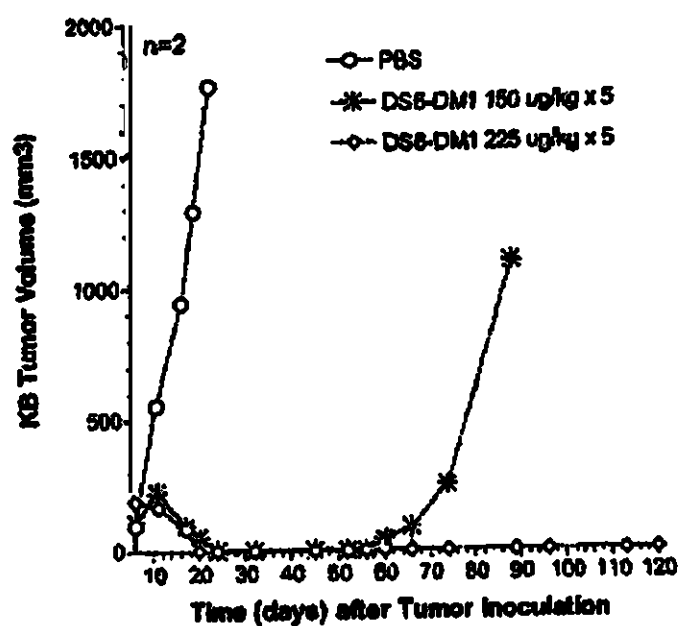


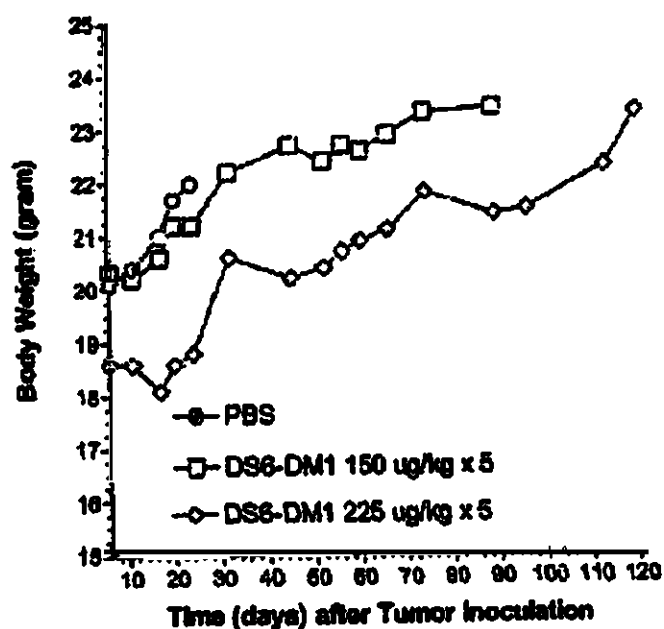
FIGURA 24 - Continuación

FIGURA 25

A.



B.



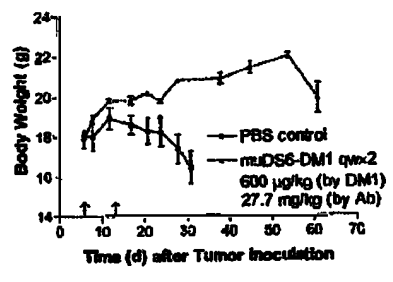
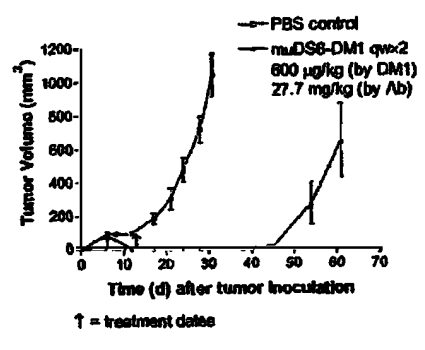


FIGURA 26

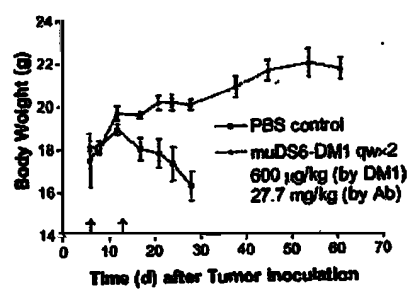
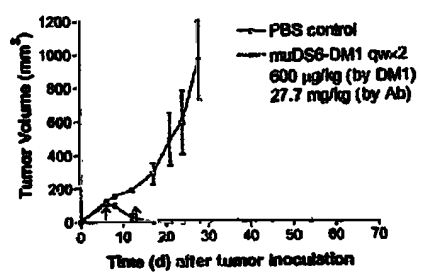
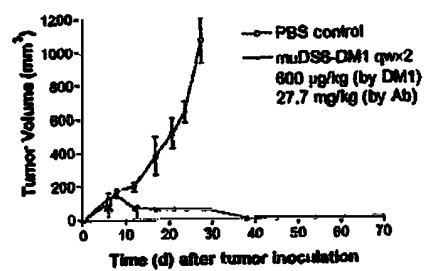


FIGURA 26 - Continuación

D.



F.

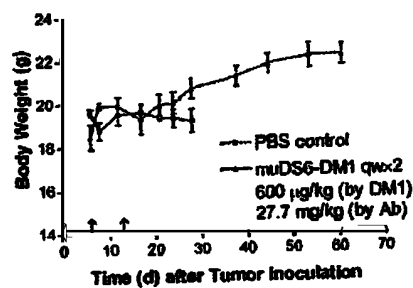
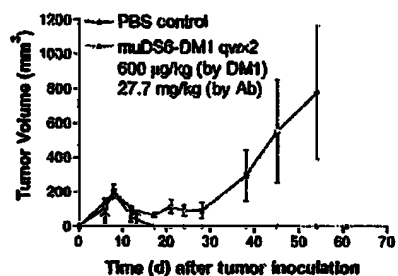


FIGURA 26 - Continuación

46

G.



H.

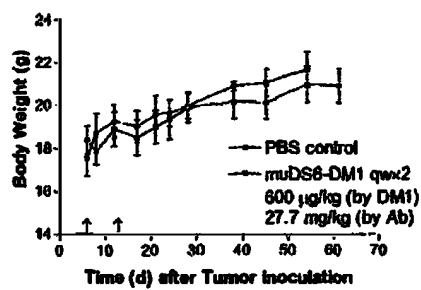


FIGURA 26 - Continuación

FIGURA 27

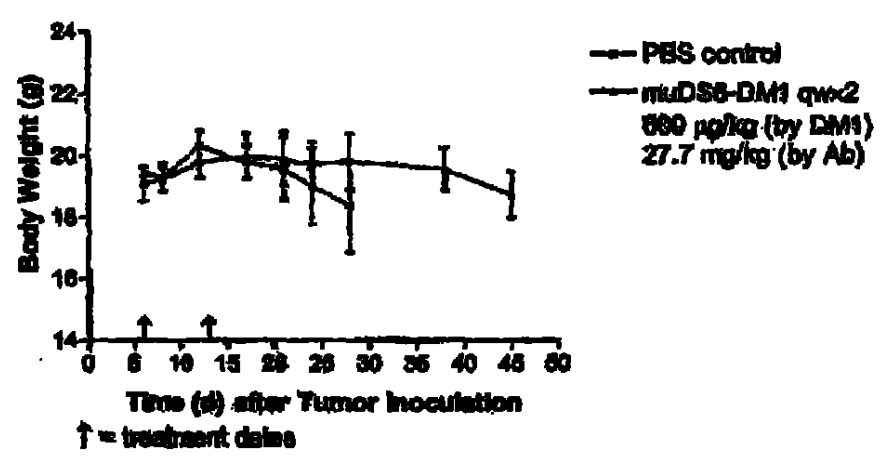
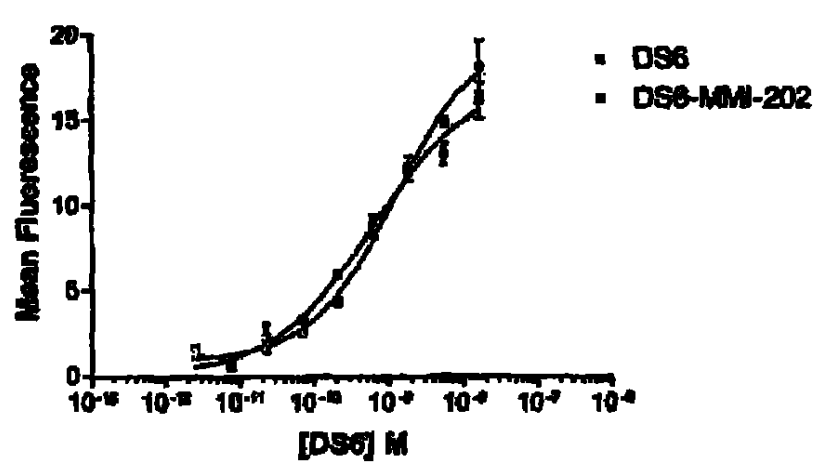
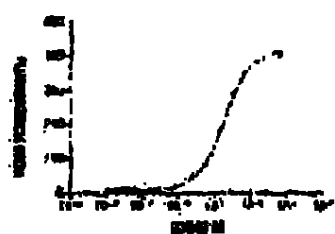


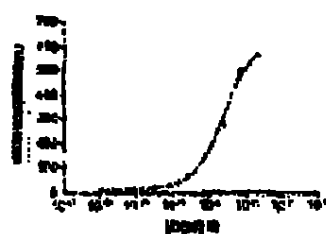
FIGURA 28



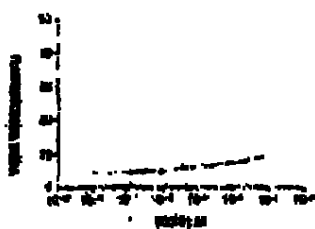
A. C200-3



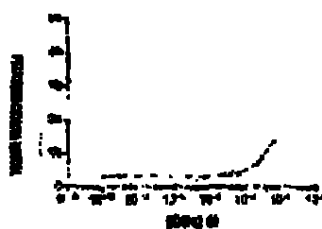
B. T-413



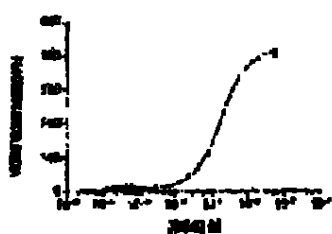
C. REON-3



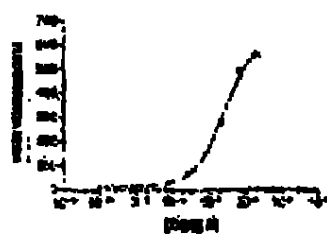
D. C200-6



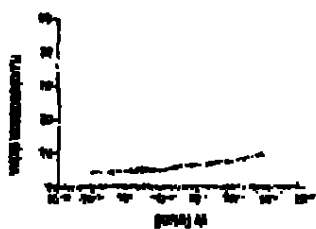
A. C200-3



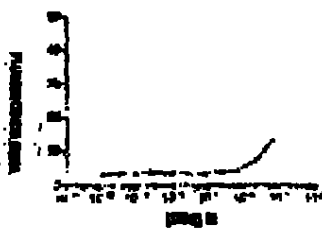
B. T-413



C. REON-3



D. C200-6



45
43

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 epítipo del anticuerpo monoclonal de glicótopo anti-CA6, así como fragmentos de enlace de epítipo 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 epítipo del mismo, que reconoce y enlaza el glicótopo CA6 o una versión humanizada o de doble superficie del mismo.

25

REJERO FOLIOS 44 y 45 PARA TARJETERO

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 reconoce 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 epítipo 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 :

QIVLTQSPA IMSASPGEKVTITCSAHSSVSFMHWFQQIIPGTSPKLWIYST
SSLASGVPARFGGSGSGTSSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFGA
GTKLELKR (ID SEC NO: 7)

EIVLTQSPATMSASPGERVITITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYS
TSSLASGVPARFGGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG
AGTKLELKR (ID SEC NO: 8)

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:

QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE
WIGYIYPGNGATNYNQKFQKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGTTLVTVSA (ID SEC NO: 9)

QAQLQVSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE
WIGYIYPGNGATNYNQKFQKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGTTLVTVSA (ID SEC NO: 10)

QAQLQVSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWI
GYIYPGNGATNYNQKFQKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCAR
GDSVPFAYWGQGTTLVTVSA (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

EIVLTQSPATMSASPGERVITITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLIWYST
SSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFGA
GTKLELKR (ID SEC NO: 8)

En forma similar, se proporcionan anticuerpos DS6 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, respectivamente:

QAQLQVSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWI
GYIYPGNGATNYNQKFQGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCAR
GDSVPFAYWGQGTLVTVSA (ID SEC NO: 10)

QAQLQVSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWI
GYIYPGNGATNYNQKFQGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCAR
GDSVPFAYWGQGTLVTVSA. (ID SEC NO: 11)

Los anticuerpos DS6 humanizados y fragmentos de enlace de epítipo 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.

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	

5 Esto se muestra además en el cuadro 2 en donde los residuos
de de superficie de región variable muDS6 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
10 2.

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

15 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. 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.

5 En una modalidad preferida, el agente de enlace celular es un anticuerpo anti-CA6 o un fragmento de enlace de epítotope del mismo, de manera más preferible un anticuerpo anti-CA6 humanizado o un fragmento de enlace de epítotope del mismo, en donde un agente citotóxico es unido de manera covalente, directamente o por medio de un enlazador divisible o no divisible, al anticuerpo o fragmento de
10 enlace de epítotope del mismo. En modalidades más preferidas, el agente de enlace celular es el anticuerpo DS6 humanizado o un fragmento de enlace de epítotope del mismo, y el agente citotóxico es un taxol, un maitansinoide, CC-1065 o un CC-1065 análogo.

15 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.

De manera más preferible el agente de enlace celular es el anticuerpo anti-CA6 humanizado DS6 y el agente citotóxico es un compuesto de maitansina, tal como DM1 o DM4.

20 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
25 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 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.

5 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.

10 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.

15 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
20 determinado aún en el cual se expresa predominantemente el glicótopo CA6.

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

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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-
5 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.

10 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,
15 neuraminidasa o ácido periódico. Las membranas fueron inmunoteñidas con el anticuerpo DS6 anticuerpo (Figura 2A), el anticuerpo CM1 (Figura 2B), el anticuerpo R24 (Figura 2C), o el anticuerpo C242 (Figura 2D).

20 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).

25 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 inmunotefidos 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 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 m+as 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 (Figura 18A) quiméricos, v1.0, y v1. 2 humanos DS6 ($K_d = 3.15, 3.71, \text{ y } 4.20 \text{ nM}$, 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-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 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

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) 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 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 DS8-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 DS8-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 DS8 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).

5

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 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.

10

15

20

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 epítpe como una proteína 80 kDa que tiene un a carbohidrato N-enlazado que contiene el epítpe CA6 cuando utilizaron un sobrenadante de hibridoma para caracterizarlo. Utilizando el DS6 purificado se ha demostrado que el epítpe CA6 se encuentra en un carbohidrato O-enlazado de una glicoproteína enlazada sin disulfuro mayor de 250 kDa. Además, la glicoproteína

25

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 epítipo de carbohidrato "glicótopo". La susceptibilidad adicional de la inmunoreactividad CA6 al tratamiento con neuraminidasa a partir de *Vibrio cholera* indica que el epítipo 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. Pathol. 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 manea 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 epítope 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 transferrina), 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. Immunol. 131: 2895-2902 (1983); Spring et al. J Immunol. 113: 470-478 (1974); Nisonoff et al. Arch. Biochem. Biophys. 89: 230-244 (1980));

(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. Chem. 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 de 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. 8,596, 503; número de depósito ATCC PTA-4449).

Anticuerpos DS6 Humanizados o de Doble Superficie

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 epítoto 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, WO98/34096, WO98/33735, 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 mimos 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)

74
72

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)

5 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)

10

15 En la misma modalidad, el anticuerpo humanizado o fragmento de enlace de epítoto 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)

20

25 Se proporcionan también anticuerpos humanizados y fragmentos de enlace de epítoto 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:

QIVLTQSPAIMASASPGEKVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLW

IYSTSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFPLT
FGAGTKLELKR. (ID SEC NO: 7)

EIVLTQSPATMSASPGERVITITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKL
WIYSTSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPL
5 TFGAGTKLELKR. (ID SEC NO: 8)

De manera similar, se proporcionun anticuerpos humanizados y
fragmentos de enlace de epítoto 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:

QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQG
15 LEWIGYIYPGNGATNYNQKFQKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA. (ID SEC NO: 9)

QAQLQVSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQG
LEWIGYIYPGNGATNYNQKFQKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA. (ID SEC NO: 10)

QAQLQVSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQG
20 LEWIGYIYPGNGATNYNQKFQKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA. (ID SEC NO: 11)

En otra modalidad, se proporcionun anticuerpos humanizados y
25 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

76
74

EIVLTQSPATMSASPGERVITITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKL
WIYSTSSSLASGVPARFGGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPL
TFGAGTKLELKR. (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:

QAQLQVSGAEWKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQG
LEWIGYIYPGNGATNYNQKFQGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA. (ID SEC NO: 10)

15

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

25

Cuadro 1

7/75

Residuos de estructura muDS6 próximos a CDR (numeración Kabat)	
Cadena Ligera	Cadena Pesada
Q1*	Q1
V3	K84*
T5	P73*
P40	874
G57	
A60	
867	
E81	

5

10

15

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.

20

25

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.

El gen de línea germinal IgV γ 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 doblado 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 polinucleótidos 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 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.

5 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.

25 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 89/09822; 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 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. W092/22853. 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 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.

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.

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.

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).

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., 1998, 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, Immunotechnology, 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 híbridoma, y selección de anticuerpos con características específicas.

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 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 5,848,545.

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

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

10 (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).

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

[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);

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

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

25 (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);

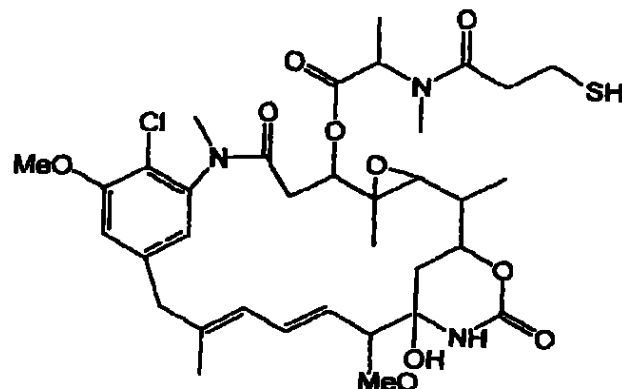
(5) C-15-metoxi (Patentes de los Estados Unidos de

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

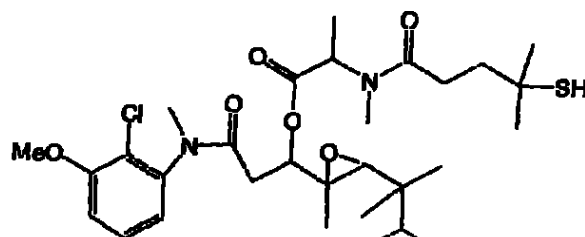
(7) 4,5-deoxi (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4, 371,533) (preparado por la reducción de tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

En una modalidad preferida, los conjugados citotóxicos de la presente invención utilizan el maitansinoide que contiene tior (DM1), anteriormente llamado N²'-deacetil-N²'-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, como el agente citotóxico. DM1 está representado por la fórmula estructural siguiente (I):



(I)

En otra modalidad preferida, los conjugados citotóxicos de la presente invención utilizan el maitansinoide que contiene tior N²'-deacetil-N²'-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina como el agente citotóxico. DM4 está representado por la siguiente fórmula estructural (II):



5

10

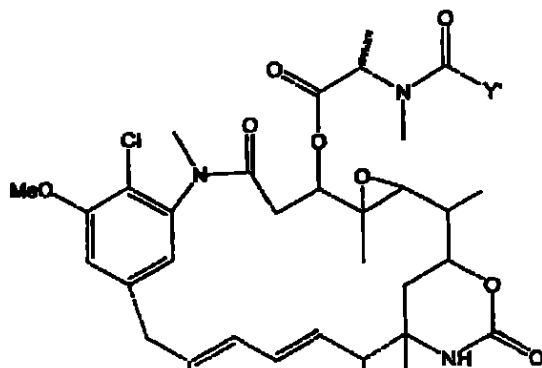
15

20

25

En modalidades adicionales de la invención, se pueden utilizar otras maitansinas, incluyendo maitansinoides que contienen tiol y disulfuro que tienen una sustitución mono o di-alquilo en el átomo de carbono que ostenta el átomo de azufre. Estas incluyen un maitansinoide que tiene, en C-3, 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 alqueno lineal o ramificado que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o radical heterocicloalquilo, 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 entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

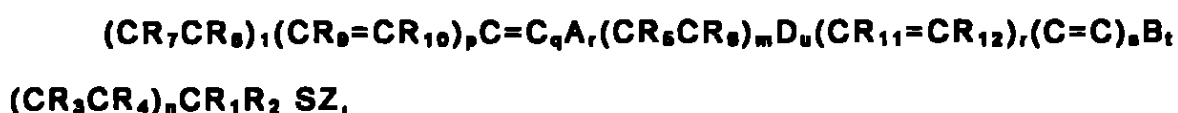
Dichas maitansinas adicionales incluyen compuestos representados por la fórmula (III):



5

en donde:

Y' representa



10

en donde:

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 heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser H;

15

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

20

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, 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 heterocicloalquilo;

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

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 heterocicloalquilo.

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

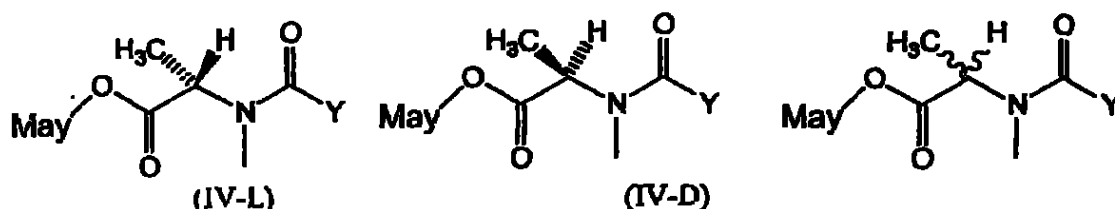
R1 es H, R2 es metilo y Z es H.

R1 y R2 son metilo y Z es H.

R1 es H, R2 es metilo, 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 $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ$, 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 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 heterocicloalquilo;

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 heterocicloalquilo; y

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 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 H.

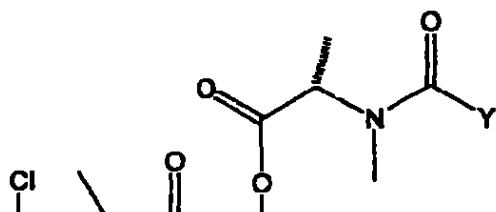
R1 y R2 son metilo, R5, R6, R7, R8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es H.

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

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

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



5

10

en donde:

Y representa $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ$, en donde:

15

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 heterocicloalquilo, y además R2 puede ser H;

20

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 heterocicloalquilo;

25

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

heterocicloalquilo.

Las modalidades preferidas de la fórmula (V) incluyen compuestos de la fórmula (V) en donde:

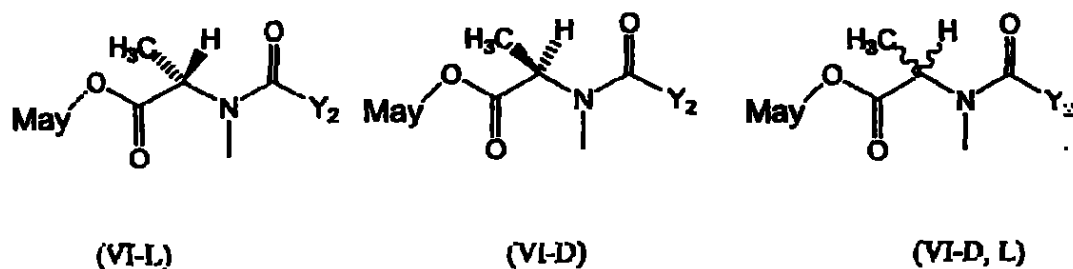
R1 es H, R2 es metilo, R5, R6, R7, y R8 son cada uno H; l y m son cada uno 1; n es 0; y Z es H.

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



en donde:

Y2 representa $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ$

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 heterocicloalquilo, y además R2 puede ser H;

R3, R4, R5, R6, R7 y R8 son cada uno de manera

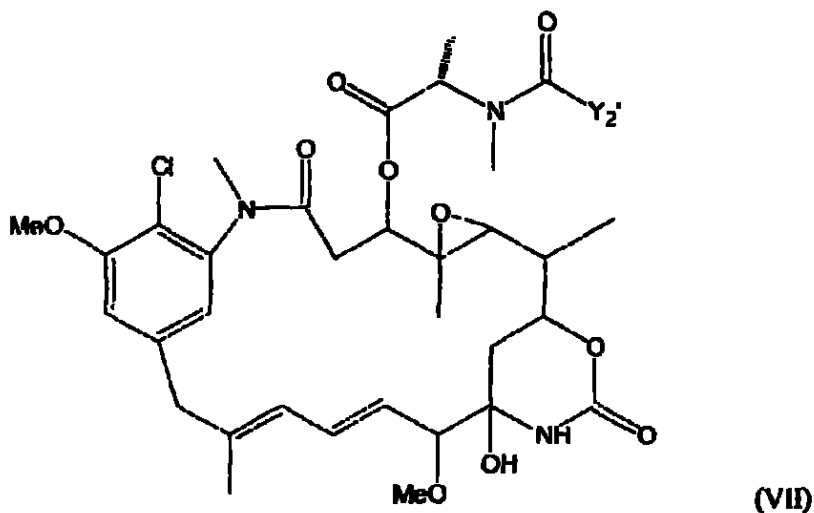
independiente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno cíclico lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

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

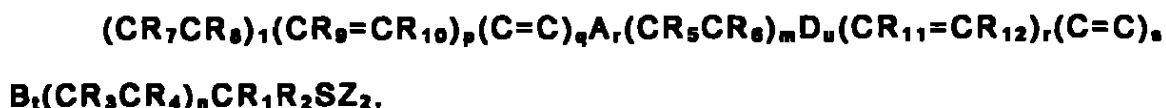
Z₂ es SR o COR, en donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, o simple o arilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo; y

May es un maitansinoide.

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



Y₂' representa



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 heterocicloalquilo, y además R2 puede ser H;

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 heterocicloalquilo;

R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, 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 heterocicloalquilo;

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

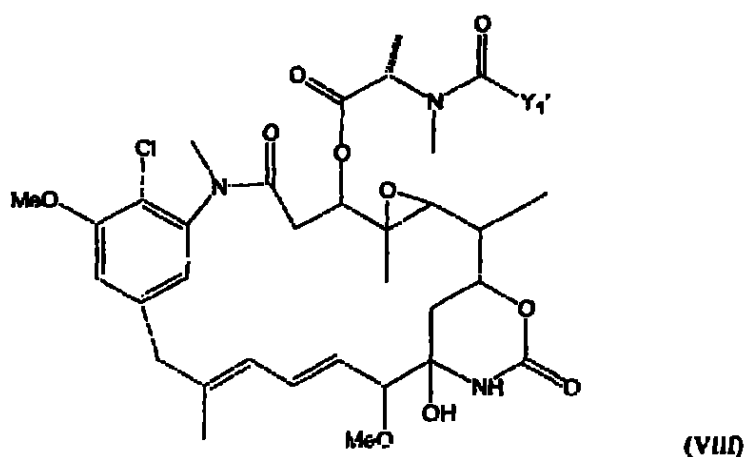
Z2 is SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3-10 átomos de carbono, o simple o arilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo.

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

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 heterocicloalquilo, 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.

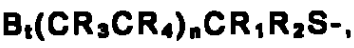
Un conjugado preferido de la presente invención es uno que comprende el anticuerpo DS6 anti-CA6, o un homólogo o fragmento del mismo, conjugado para un maitansinoide de la fórmula (VIII):



en donde:

Y1' representa





en donde:

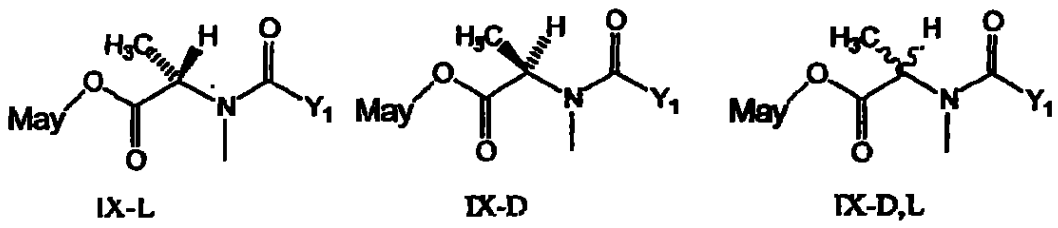
A, B, y D, es cada uno de manera independiente cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3-10 átomos de carbono, simple o arilo sustituido, o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, 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 heterocicloalquilo; 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 momento.

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

Un conjugado aún más 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 (IX-L), (IX-D), o (IX-D,L):



en donde:

Y1 representa $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2S-$,

en donde:

5

10

15

20

25

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 heterocicloalquilo;

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 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:

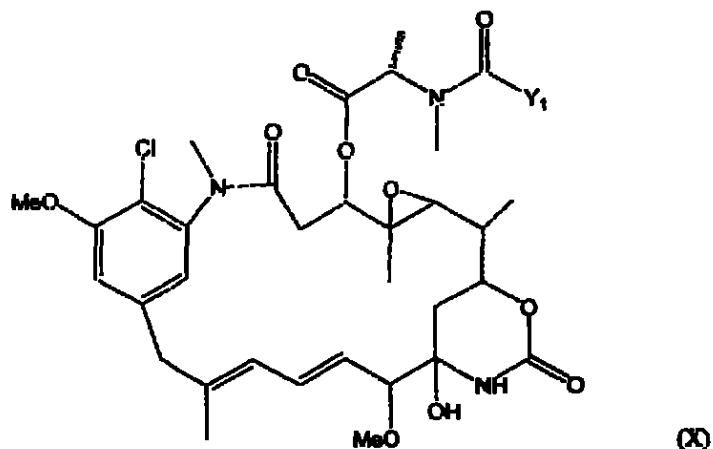
R1 es H y R2 es metilo o R1 y R2 son metilo,

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,

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).

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.

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 de 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

107
105

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 sulfihidrilo 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 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.

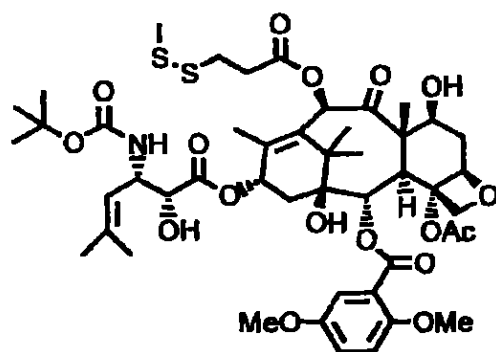
Taxanos

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

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 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 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.

107

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

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 Daunorubicina, 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)

113
111

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 hace más lento el crecimiento de una célula, disminuir la viabilidad celular, ocasionar la muerte de una célula, lizar una célula e inducir la muerte celular, ya sea en un período corto o largo.

Los ejemplos de usos in vitro incluyen tratamientos de médula ósea autóloga antes de su trasplante dentro del mismo paciente a fin de eliminar las células enfermas o malignas; tratamientos médula ósea antes de su trasplante 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 médula ósea antes del trasplante 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 trasplante 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

μM hasta 1 pM, durante aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37°C. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación, es decir, la dosis, son determinadas fácilmente por alguien con experiencia en la técnica. Después de la incubación las células de medula ósea son lavadas 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 μg 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 μg 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 trasplante hepático, rechazo de trasplante de pulmón, rechazo de trasplante cardíaco, y rechazo de trasplante 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 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 epítipo de los mismos que son etiquetados adicionalmente para uso en aplicaciones de investigación y diagnóstico. En modalidades preferidas, la etiqueta es una radioetiqueta, un fluoroforo, 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 epítipo 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.

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

10 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
15 células fueron cultivadas en RPMI 1640 complementado con 4 mM L-glutamina, 50 U/ml penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina (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
20 incubador humidificado a 37°C, 5% CO₂.

25 Las células (1-2 x 10⁵ 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 rellenos con 150 µl de regulador de pH FACS. La etapa de lavado se repitió después. IgG cabra anti-ratón FITC-etiquetado (Jackson

118
116

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 epítope 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	T Tejido	Antígeno	MMF*	Kd Aparente (pM)	Línea Celular	T Tejido	Antígeno	MMF*	Kd Aparente (pM)
HL-60	Berango	-			Caov-3	Ovario	+	488.20	5.478 x 10 ⁻¹⁰
Jurkat	Berango	-			Caov-4	Ovario	+	148.00	4.043 x 10 ⁻¹⁰
Namikan	Berango	-			EB-2	Ovario	-		
U-937	Berango	-			IGROV1	Ovario	-		
T890	Cervix	+	35.94	1.775 x 10 ⁻¹⁰	OV-80	Ovario	-		
BT-20	Seno	+	232.20	8.142 x 10 ⁻¹⁰	OVCAR-3	Ovario	-		
BT-474	Seno	-			OVCAR6	Ovario	+	97.10	1.473 x 10 ⁻¹⁰
BT-483	Seno	+	1011.00	1.388 x 10 ⁻¹⁰	OVCAR8	Ovario	-		
BT-549	Seno	+	71.39	1.048 x 10 ⁻¹⁰	PA-1	Ovario	-		
CAMA-1	Seno	+	12.48	2.330 x 10 ⁻¹⁰	SK-OV-3	Ovario	-		
MCF-7	Seno	+	81.41	2.880 x 10 ⁻¹⁰	SW 620	Ovario	-		
MDA-MB-157	Seno	+	8.685	1.972 x 10 ⁻¹⁰	TOV-112D	Ovario	-		
MDA-MB-231	Seno	+	31.85	1.480 x 10 ⁻¹⁰	TOV-210	Ovario	+	87.79	3.087 x 10 ⁻¹⁰
MDA-MB-468	Seno	+	71.88	8.127 x 10 ⁻¹⁰	AsPC-1	Páncreas	-		
SK-BR-3	Seno	-			BxPC-3	Páncreas	+	79.89	5.283 10 ⁻¹⁰
T-47-D	Seno	+	889.88	3.424 x 10 ⁻¹⁰	HPAC	Páncreas	+	2228.0	2.348 x 10 ⁻¹⁰
ZR-75-1	Seno	+	811.87	4.229 x 10 ⁻¹⁰	HPAF-2	Páncreas	+	288.50	2.811 x 10 ⁻¹⁰
HsLa	Cervix	+	242.50	8.838 x 10 ⁻¹⁰	Hs788T	Páncreas	+	182.80	2.318 x 10 ⁻¹⁰
KB	Cervix	+	118.88	1.110 x 10 ⁻¹⁰	MDAPCa2	Páncreas	-		
WIBH	Cervix	+	1133.88	2.380 x 10 ⁻¹⁰	MPanc28	Páncreas	-		
Colo26	Colon	-			SLX88.68	Páncreas	+	38.88	1.043 x 10 ⁻¹⁰
DLD-1	Colon	-			SW1990	Páncreas	+	38.17	3.879 x 10 ⁻¹⁰
HCT-8	Colon	-			PC-3	Próstata	+	24.81	1.388 x 10 ⁻¹⁰
HT-29	Colon	-			AS75	Piel	-		
Calu-1	Refón	-			SKMEL28	Piel	-		
A549	Pulmón	-			KLE	Útero	-		
SW2	Pulmón	-							

* fluorescencia media relative maxima promedio

Ejemplo 2: Caracterización de Epítope DS6

Las propiedades del antígeno DS8, CA8, fueron analizadas por medio de inmunotinción de las tinciones de punto de lisados de célula CA8-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 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 proteináceo. 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 glicótipo. 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 epítoto de proteína reconocido por CM1.

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 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 inmunotefidos como se describió con 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 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 epítoto CA6 está presente con mayor probabilidad en cadenas de carbohidrato O-enlazado sialiatado.

Eiemplo 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 μ l de regulador de incubación y 2 μ l 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 μ l) y las muestras fueron incubadas con 1 μ l 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 μ l), 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-glicosilado. 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 tandem.

Aunque CM1 y DS6 se enlazan a la misma proteína Muc-1, son epítopos 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 comparasi3n de los resultados de enlace de la citometría de flujo de DS6 y CM1 (Cuadro 4) demuestra que el epít3pe CA6 no existe en cada expresi3n celular Muc1. Es interesante observar que el epít3pe CA6 no es expresado en Colo205 (Cuadro 3), una l3nea celular que se conoce que expresa altos niveles del sialoglic3p3to Muc1 CanAg.

Cuadro 4

	L3nea Celular	DS6 MMF*	Kd Aparente (M)	MMF* CM1	Kd Aparente (M)
DS6 positivo & CM1 positivo	BT20	71.58	1.048×10^{-9}	187.80	8.038×10^{-9}
	CaOV3	488.20	8.478×10^{-9}	1081.00	7.478×10^{-9}
	HaLa	242.80	8.938×10^{-9}	384.80	2.807×10^{-9}
	K5	118.88	1.110×10^{-9}	338.00	6.346×10^{-9}
	MCF7	81.41	2.880×10^{-9}	1023.00	8.884×10^{-9}
DS6 negativo & CM1 positivo	KLE	27.48	-	881.70	8.188×10^{-9}
	OVCAR3	21.19	-	182.80	5.948×10^{-9}
	SKOV3	17.93	-	48.41	8.248×10^{-9}

*MMF = fluorescencia media m3xima relativa

Ejemplo 4: An3lisis Cuantitativo de epít3pe CA6 esparcido

Debido a que el epít3pe CA6 epít3pe reside en Muc1, una mol3cula que se sabe es esparcida dentro del torrente sangu3neo en muchos pacientes de c3ncer, se tomo un enfoque cuantitativo para determinar si dichos niveles ser3an prohibitivos para la terapia de anticuerpo DS6. Se considera que el enlace del anticuerpo circulante al ant3geno conduce a la r3pida separaci3n de los complejos inmunes de la sangre. Si una porci3n significativa de la dosis de anticuerpo administrada es removida r3pidamente desde la circulaci3n es probable que la cantidad que alcanza el tumor est3 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 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 epítopes CanAg por molécula Muc1 incluso en un solo paciente. Además, la relación de epítope 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 epítope 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 epítopes por ml de suero en vez de una concentración molar de Muc1. Por analogía, una situación similar se presenta para la cuantificación de epítopes CA6 esparcidos. En contraste, para trastuzumab solamente hay un epítope por molécula de her2/neu esparcido simplificando en gran medida la cuantificación del antígeno esparcido.

A fin de relacionar los niveles de epítope 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 epítope 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 moles 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

130
129

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 (U/ml)	DS ⁴ (U/ml)
4	72.00	117.72	28.78	52.13	188.94
5	3081.00	98.18	587.02	854.44	>2580.00
6	880.00	87.08	504.15	687.88	2505.00
7	78.00	72.70	138.85	248.94	778.25
8	32.00	18.44	58.88	83.18	238.88
9	551.70	282.38	> 975.81	1512.31	> 2580.00
10	90.00	42.40	48.48	85.18	305.88
11	200.00	80.58	82.22	182.38	828.75
12	283.00	38.87	83.88	138.81	488.08
13	187.80	20.81	38.82	81.08	218.25
14	108.80	8.13	12.38	23.18	88.08
15	34.80	58.18	188.85	288.88	1228.58
17	188.40	58.73	88.83	188.44	488.88
18	18.80	38.45	34.43	88.81	228.88
19	22.00	288.88	118.88	181.88	728.94
22	118.70	21.44	18.48	28.94	111.38

¹ determinado por equipo ELISA comercial
² determinado por estándares CA15-3 comerciales (1 CA15-3 U = 1088 U)
³ curva estándar IgG cabra anti-ratón & biotina-DS6
⁴ curva estándar biotina-DS6

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

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.

20

CanAg ¹ (U/ml)	CanAg ² (pM)	CanAg ³ (pM)
31240	19185.7	34592.8
8687	3535	9819.3
7456	4579	8256.2
3686	2263.7	4081.6
1447	888.7	1602.3
1262	775	1367.4
718	441	795.1
547	335.9	605.7
394	242	436.3
361	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

132
139

18	11.1	19.9
17	10.4	18.8
< 10	8.1	11.3
< 10	8.1	11.3
< 10	8.1	11.3
< 10	8.1	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

5

10

15

20

25

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 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,

(TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC)
(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 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.

5	Cuadro 7		
	Imprimadores Degenerados de Secuencia de Señal DS6		
	Nombre	Secuencia	
10	Cadena Pesada-DS6HClead	ttttgaattcaataaactacaggtgtccact	-ID SEC NO: 30
	Cadena Ligera-KTILClead	ttttgagctccagatttcagcttcctgct	-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 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 promedida 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): 205-8(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 Apal 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.

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

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 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.

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 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

10

15

20

25

[illegible]

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, 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

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 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 μ g/ml estreptomycin, y 10% v/v FBS) y colocadas en un 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 lavadas con 7 ml de PBS pre-calentado (37°C) y rellenadas con 20 ml de medio no-selectivo. El ADN de plásmido (11 μ g) fue diluido en 800 μ l de Hybridoma SFM (Gibco). Después, se agregaron 70 μ l de Polyfect (Qiagen) a la mezcla ADN/SFM. La mezcla Polyfect fue sometida a

remolino suavemente durante varios segundos e 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.

5 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)

10 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

15 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

20 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

25 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 (~ 1 x 10⁶ 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 µm.

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 K₂HPO₄, 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 huIgG 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 la afinidad de enlace.

Ejemplo 14: Preparación del conjugado citotóxico DS6-DM1

5 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 turbida fue filtrada 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
10 conjugado después a 2.5 mg Ab/mL utilizando un exceso molar 1.7-veces de N²'-deacetil-N²'-(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
15 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
20 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 y la producción de etapa de
25

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 estreptomycin). 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^{-8} 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^{-8} 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 inmunconjugado 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 estudio demuestra que el tratamiento DS6-DM1 puede curar a los 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 maltansina in vitro y densidades de epítipo CA8 (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 CA8 de superficie; las células HeLa tienen un nivel intermedio de expresión de CA8 de superficie; las células HPAC tienen una alta densidad CA8 de expresión de superficie. Las células

151
150

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	NRIF ^a	Kd Apéndice (M)	Prueba Clonogénica Maitansina IC ₅₀ (M)	Prueba Clonogénica Conjugado IC ₅₀ (M)	Prueba MTT Conjugado EC ₅₀ (M)
BT-20	232.20	8.14×10^{-4}	3.80×10^{-11}	$> 3.00 \times 10^{-10}$	1.44×10^{-9}
BT-483	1011.00	1.37×10^{-4}	1.30×10^{-10}	1.00×10^{-10}	NA
Caco-3	485.20	6.40×10^{-5}	3.20×10^{-11}	8.00×10^{-10}	1.01×10^{-9}
Caco-4	148.00	4.04×10^{-5}	8.00×10^{-10}	$> 8.00 \times 10^{-10}$	NA
HeLa	> 242.00	6.04×10^{-5}	1.00×10^{-10}	1.00×10^{-10}	NA
HPAC	2228.00	2.38×10^{-5}	5.35×10^{-11}	1.00×10^{-10}	1.04×10^{-9}
HPAF-II	289.00	2.81×10^{-5}	8.00×10^{-10}	$> 3.00 \times 10^{-10}$	1.00×10^{-9}
He788T	182.00	2.32×10^{-5}	$> 3.00 \times 10^{-10}$	$> 3.00 \times 10^{-10}$	$> 3.20 \times 10^{-9}$
KB	118.00	1.11×10^{-5}	3.00×10^{-11}	1.40×10^{-10}	3.01×10^{-9}
OVCAR5	97.10	1.47×10^{-5}	3.20×10^{-10}	$> 3.00 \times 10^{-10}$	8.40×10^{-9}
T-47D	550.50	5.42×10^{-5}	1.20×10^{-10}	$> 3.00 \times 10^{-10}$	NA
TOV-21G	87.70	3.07×10^{-5}	4.80×10^{-11}	2.00×10^{-10}	6.06×10^{-9}
WISH	1133.00	2.38×10^{-5}	8.00×10^{-11}	4.80×10^{-10}	6.00×10^{-9}
ZR-75-1	611.07	4.30×10^{-5}	1.00×10^{-10}	NA	8.40×10^{-9}

^a Fluorescencia media relativa máxima promedio

Las 4 líneas celulares fueron cultivadas in vitro, recolectadas, y 1×10^7 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 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 periodo 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
5 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
10 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
15 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
20 Taxoide DS6-SPP-MM1-202

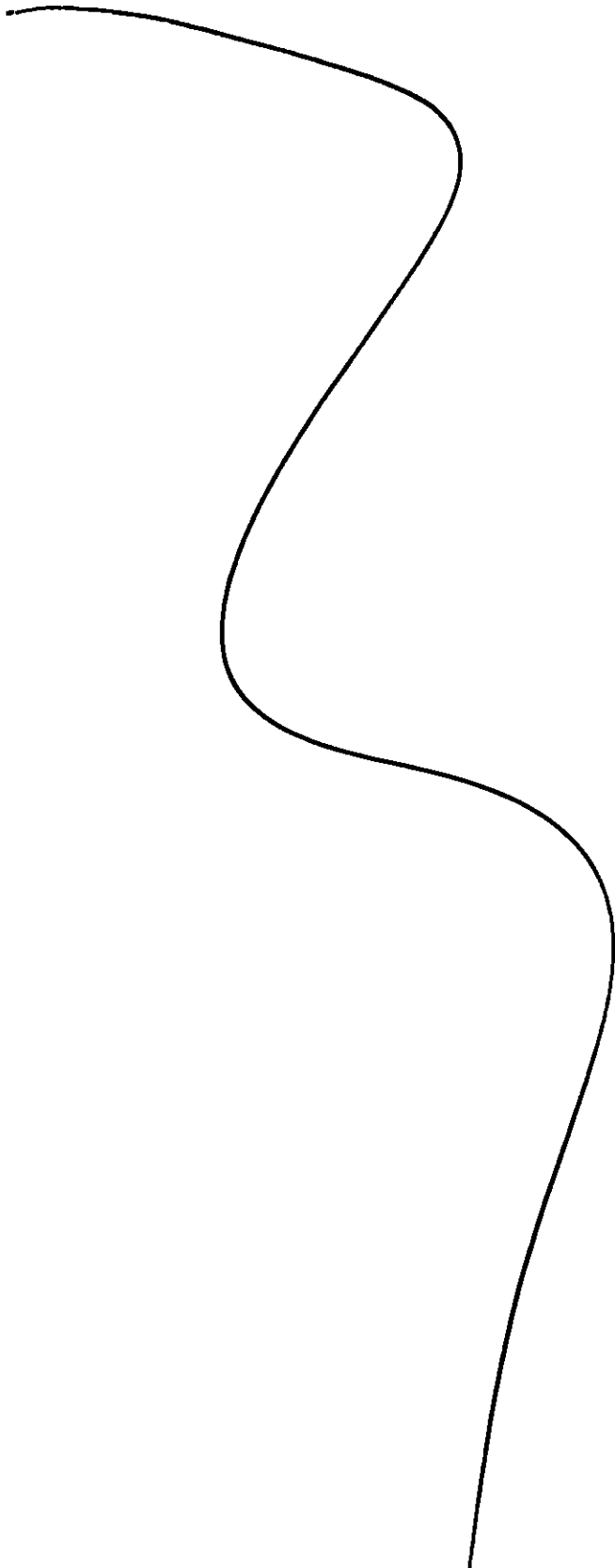
DS6 fue modificado con el enlazador N-sulfosuccinimidil4-nitro-2-piridil-pentanoato (SSNPP). A 50 mg de DS6 Ab en 90% Regulador A, se agregaron 10 equivalentes 10% DMA de SSNPP en DMA. La
25 concentración final de Ab fue 8 mg/ml. La reacción fue agitada durante 4 horas a temperatura ambiente, purificada 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 84% 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 cisteína/enlazador sin reaccionar al conjugado con agitación durante la noche. Un matiz amarillento definido fue notorio a la adición de la cisteína 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.

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.



REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto del mismo que comprende por lo menos una región de determinación complementaria que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada a partir del grupo que consta de ID SEC NOS: 1-6:

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)

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).

2. Un anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto de mismo que comprende por lo menos una región variable de cadena pesada o fragmento de la misma y por lo menos una región variable de cadena ligera o fragmento de la misma, caracterizado porque dicha por lo menos una región variable de cadena pesada o fragmento de la misma comprende tres regiones de determinación complementarias secuenciales que tienen secuencias de amino ácido representadas por ID SEC NOS: 1-3, respectivamente:

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 en donde dicha por lo menos una región variable de cadena ligera o fragmento de la misma comprende tres regiones de determinación complementaria secuenciales que tienen secuencias de amino ácido representadas por ID SEC NOS: 4-6, respectivamente:

158
156

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).

5 3. El anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la región variable de cadena ligera o fragmento de la misma tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia para una secuencia de amino ácido representada por ID SEC NO: 7 o ID SEC NO: 8:

10 QIVLTQSPAIMASASPGEKVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLW
IYSTSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFPLT
FGAGTKLELKR (ID SEC NO: 7)

EIVLTQSPATMSASPGERVITITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKL
WIYSTSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPL
TFGAGTKLELKR (ID SEC NO: 8).

15 4. El anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque la región variable de cadena ligera o fragmento de la misma tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia para la secuencia de amino ácido de ID SEC NO: 7 o ID SEC NO: 8.

20 5. El anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque la región variable de cadena ligera o fragmento de la misma tiene la secuencia de amino ácido de ID SEC NO: 7 o ID SEC NO: 8.

25 6. El anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la región variable de cadena pesada o fragmento de la misma tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia para una secuencia de amino ácido seleccionada a partir de un grupo que comprende ID SEC NO:

159
152

9, ID SEC NO: 10 y ID SEC NO: 11:

QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQG
LEWIGYIYPGNGATNYNQKFQKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGTTLVTVSA (ID SEC NO: 9)

5 QAYLQQSGAEWKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQG
LEWIGYIYPGNGATNYNQKFQKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGTTLVTVSA (ID SEC NO: 10)

10 QAYLQQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQG
LEWIGYIYPGNGATNYNQKFQKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGTTLVTVSA (ID SEC NO: 11).

7. El anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque la región variable de cadena pesada o fragmento de la misma tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia para la secuencia de amino
15 ácido de ID SEC NO: 9, ID SEC NO: 10, o ID SEC NO: 11.

8. El anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque la región variable de cadena o fragmento de la misma tiene la secuencia de amino ácido de ID SEC NO: 9, ID SEC NO: 10, o ID SEC NO: 11.

20 9. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de enlace de epítipo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 o 6.

10. Un polinucleótido que codifica una cadena ligera o pesada de un anticuerpo o un fragmento de enlace de epítipo de
25 conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 o 6.

11. Un vector que comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 9.

12. Un vector que comprende el polinucleótido de conformidad

160
[58

con la reivindicación 10.

13. El vector de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque dicho vector es un vector de expresión que expresa dicho anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo.

5 14. El vector de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque dicho vector es un vector de expresión que expresa dicho anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo.

15. Un anticuerpo de roedor humanizado o un fragmento de enlace de epítipo del mismo que se enlaza a glicótopo CA6, producido por un método de aplicación de doble superficie que comprende:

10 (a) generar alineaciones de posición a partir de distribuciones de accesibilidad relativa de estructuras cristalográficas de rayos-x de un depósito de regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpo de roedor y humano para producir un conjunto de posiciones expuestas de superficie de estructura de región variable de cadena pesada y ligera, en donde las posiciones de alineación para todas las regiones variables de roedor y humano son por lo menos aproximadamente 98% idénticas;

20 (b) definir para un anticuerpo de roedor o fragmento de enlace de epítipo del mismo un conjunto de residuos de amino ácido expuestos de superficie de estructura de región variable de cadena pesada y ligera utilizando dicho conjunto de posiciones expuestas de superficie de estructura de región variable de cadena pesada y ligera generadas en la etapa (a);

25 (c) identificar a partir de las secuencias de amino ácido de anticuerpo un conjunto de residuos de amino ácido expuestos de superficie de 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 definido en la etapa (b);

5 (d) sustituir, en la secuencia de amino ácido de estructura de región variable de dicho anticuerpo de roedor o fragmento de enlace de epítoto del mismo, el conjunto de residuos de amino ácido expuestos de superficie de estructura de región variable de cadena pesada y ligera definidos en la etapa (b) con el conjunto de residuos de amino ácido expuestos de superficie de estructura de región variable de cadena pesada y ligera identificados en la etapa (c);

10 (e) construir modelos tri-dimensionales de la región variable del anticuerpo de roedor o fragmento de enlace de epítoto del mismo y de la región variable de dicho anticuerpo de roedor o fragmento de enlace de epítoto del mismo resultante a partir de la sustitución especificada en la etapa (d);

15 (f) comparar los modelos tri-dimensionales construidos en la etapa (e), e identificar cualesquiera residuos de amino ácido a partir de los conjuntos identificados en las etapas (b) o (c), que están dentro de 5 Å de cualquier átomo de cualquier residuo de las regiones de determinación complementaria del anticuerpo de roedor o fragmento de enlace de epítoto del mismo;

20 (g) cambiar cualesquiera residuos identificados en la etapa (f) a partir del residuo de amino ácido de humano para el de roedor original para definir de esta manera un conjunto de humanización de residuos de amino ácido expuestos de superficie;

25 (h) reemplazar el conjunto de residuos de amino ácido expuestos de superficie de estructura de región variable de anticuerpo de roedor definido en la etapa (b) con el conjunto de humanización de residuos de amino ácido expuestos de superficie de

estructura de región variable definido en la etapa (g); y

(i) producir el anticuerpo de roedor humanizado o fragmento de enlace de epítotope del mismo que enlaza al glicótopo CA6.

16. El anticuerpo de roedor humanizado o fragmento de enlace de epítotope del mismo de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo de roedor humanizado o fragmento de enlace de epítotope del mismo es un fragmento de enlace de epítotope.

17. El anticuerpo de roedor humanizado o fragmento de enlace de epítotope del mismo de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque el fragmento de enlace de epítotope es seleccionado a partir del grupo que comprende un fragmento Fab, a fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fd, un fragmento Fvs(scFv) de cadena individual, un anticuerpo de cadena individual, un fragmento Fvs(sdFv) enlazado a disulfuro y un fragmento que comprende un dominio VL o VH.

18. El anticuerpo de roedor humanizado o fragmento de enlace de epítotope del mismo de conformidad con la reivindicación 15 o 16, caracterizado porque los residuos de amino ácido expuestos de superficie son aquellos cuya accesibilidad de solvente está por encima de 30%.

19. El anticuerpo de roedor humanizado o fragmento de enlace de epítotope del mismo de conformidad con la reivindicación 15, que comprende por lo menos una región de determinación complementaria que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada a partir del grupo que consta de ID SEC NOS: 1-6:

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)

163
161

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

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).

5 20. El anticuerpo de roedor humanizado o fragmento de enlace de epítotope del mismo de conformidad con la reivindicación 15, que comprende por lo menos una región variable de cadena pesada o fragmento de la misma y por lo menos una región variable de cadena ligera o fragmento de la misma, caracterizado porque dicha por lo menos una región variable de cadena pesada o fragmento de la misma comprende tres regiones de determinación complementaria secuenciales que tienen secuencias de amino ácido representadas por ID SEC NOS: 1-3, respectivamente:

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

15 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 en donde dicha por lo menos una región variable de cadena ligera o fragmento de la misma comprende tres regiones de determinación complementaria secuenciales que tienen secuencias de amino ácido representadas por ID SEC NOS: 4-6, respectivamente:

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).

25 21. El anticuerpo de roedor humanizado o fragmento de enlace de epítotope del mismo de conformidad con la reivindicación 15, que comprende una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de amino ácido de ID SEC NO: 7 o ID SEC NO: 8:

164
162

QIVLTQSPA~~IM~~SASPGEKVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYST
SSLASGV~~PAR~~FGGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFGA
GTKLELKR (ID SEC NO: 7)

5 EIVLTQSPATMSASPGERVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYST
SSLASGV~~PAR~~FGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFGA
GTKLELKR (ID SEC NO: 8).

10 22. El anticuerpo de roedor humanizado o fragmento de enlace
de epítoto del mismo de conformidad con la reivindicación 15, que
comprende una región variable de cadena pesada que tiene una
secuencia de amino ácido seleccionada a partir del grupo que
comprende ID SEC NO: 9, ID SEC NO: 10 y ID SEC NO: 11:

QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQG
LEWIGYIYPGNGATNYNQKFQKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGT~~LV~~TVSA (ID SEC NO: 9)

15 QAQLQVSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQG
LEWIGYIYPGNGATNYNQKFQKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGT~~LV~~TVSA (ID SEC NO: 10)

20 QAQLQVSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQG
LEWIGYIYPGNGATNYNQKFQKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGT~~LV~~TVSA (ID SEC NO: 11).

23. Un anticuerpo mejorado o fragmento de enlace de epítoto
del mismo que enlaza a una célula que expresa el glicótopo CA6,
dicho anticuerpo mejorado o fragmento de enlace de epítoto del
mismo producido al:

25 (a) proporcionar un polinucleótido ADN que codifica un
anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto del mismo que
comprende por lo menos una secuencia seleccionada a partir del
grupo que comprende ID SEC NOs: 1 a 11;

105
163

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)

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

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

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

QIVLTQSPAISASPGEKVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLW
IYSTSSLASGVPARFGGSGSGTSSYSLTISRMEADAATYYCQQRSSFPLTF
GAGTKLELKR (ID SEC NO: 7)

10 EIVLTQSPATMSASPGERVITITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKL
WIYSTSSLASGVPARFGGSGSGTSSYSLTISSMEADAATYYCQQRSSFPLT
FGAGTKLELKR (ID SEC NO: 8)

QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQG
LEWIGYIYPGNGATNYNQKFKGKATLTADPSSSTAYMQSSLTSEDSAVYF
15 CARGDSVPFAYWGQGTTLTVSA (ID SEC NO: 9)

QAQLQVSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQG
LEWIGYIYPGNGATNYNQKFKGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGTTLTVSA (ID SEC NO: 10)

QAQLQVSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQG
20 LEWIGYIYPGNGATNYNQKFKGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY
FCARGDSVPFAYWGQGTTLTVSA (ID SEC NO: 11)

(b) introducir por lo menos una mutación, eliminación o
inserción de nucleótido dentro del polinucleótido AND de (a) de
manera que por lo menos un residuo de la secuencia de amino ácido
25 codificada por el polinucleótido ADN es cambiado;

(c) expresar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo
codificado por el polinucleótido ADN de (b); y

(d) tamizar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo expresado

para una mejora en la afinidad de enlace para una célula que expresa el glicótopo CA6, produciendo de esta manera un anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo mejorado.

5 24. El anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo mejorado de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque dicha por lo menos una mutación, eliminación o inserción de nucleótido se hace a través de un método seleccionado a partir del grupo que comprende mutagénesis dirigida de sitio mediada por oligonucleótido, mutagénesis de cartucho, PCR propensa a error, lanzamiento de ADN y el uso de cepas-mutator de E. coli.

25. Un conjugado citotóxico que comprende un agente de enlace celular y un agente citotóxico, en donde el agente de enlace celular enlaza al glicótopo CA6.

15 26. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el agente de enlace celular y el agente citotóxico son enlazados de manera covalente.

20 27. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el agente de enlace celular y el agente citotóxico son enlazados de manera covalente a través de un grupo de enlace PEG.

28. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el agente de enlace celular y el agente citotóxico son enlazados de manera covalente a través de una funcionalidad tiol o disulfuro de dicho agente citotóxico.

25 29. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el agente de enlace celular es un miembro seleccionado a partir del grupo que comprende un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un fragmento de un

anticuerpo, un anticuerpo humanizado o de doble superficie, un equivalente funcional de un anticuerpo, un anticuerpo mejorado, un interferon, una linfoquina, una hormona, un factor de crecimiento, transferina y una vitamina.

5 30. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque dicho fragmento de un anticuerpo es seleccionado a partir de un grupo que comprende un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fd, un fragmento Fvs(scFv) de cadena individual, un anticuerpo de cadena individual, un fragmento Fvs(sdFv) enlazado con disulfuro y un fragmento que comprende un dominio VL o VH.

15 31. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal anti-CA6 o un fragmento de enlace de epítotope del mismo.

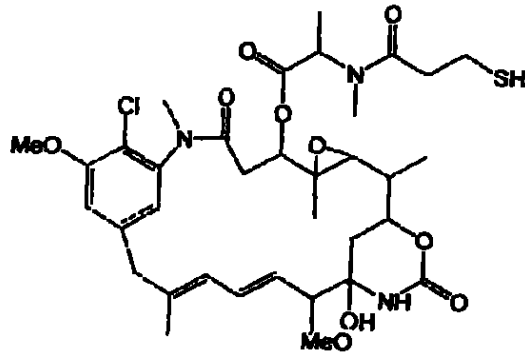
 32. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el agente de enlace celular es el anticuerpo monoclonal DS6 anti-CA6 de murino o un fragmento de enlace de epítotope del mismo.

20 33. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el agente de enlace celular es una versión humanizada del anticuerpo monoclonal DS6 anti-CA6 de murino o un fragmento de enlace de epítotope del mismo.

25 34. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el agente citotóxico es un miembro seleccionado a partir del grupo que comprende un compuesto de maitansinoide, un compuesto de taxoide, un compuesto CC-1065, un compuesto de dolastatina, un compuesto de

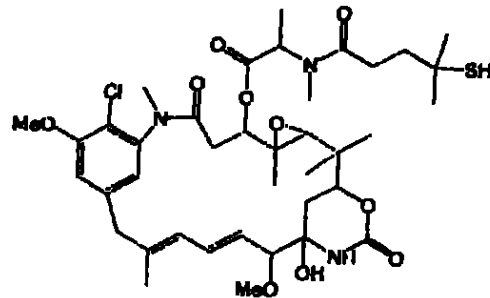
daunorubicina, y un compuesto de doxorubicina.

35. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el agente citotóxico es la maitansina DM1 de la fórmula (I):



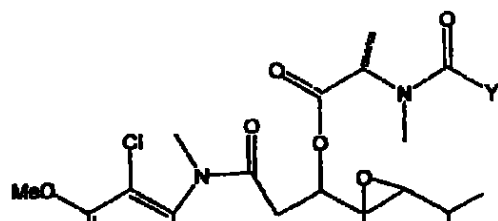
(I)

36. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el agente citotóxico es la maitansina DM4 de la fórmula (II):



(II)

37. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el agente citotóxico es una maitansina de la fórmula (III):



5

en donde:

Y' representa

10

$(CR_7CR_8)_1(CR_9=CR_{10})_pC=C_qA_r(CR_5CR_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C=C)_sB_t$
 $(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ$, en donde:

15

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 heterocicloalquilo, y además R2 puede ser H;

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

20

R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, 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 heterocicloalquilo;

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

Z is H, SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que

170
168

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 heterocicloalquilo.

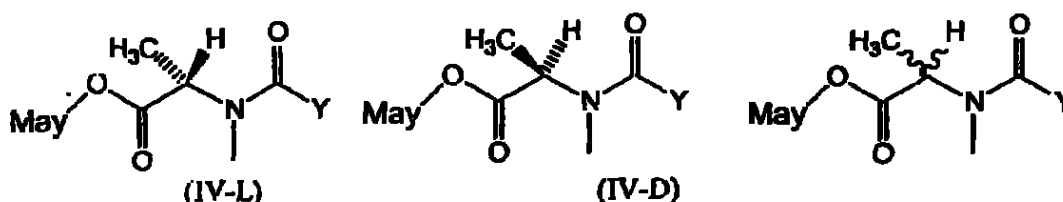
38. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque R1 es H, R2 es metilo y Z es H.

39. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque R1 y R2 son metilo y Z es H.

40. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque R1 es H, R2 es metilo, y Z es -SCH3.

41. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque R1 y R2 son metilo, y Z es -SCH3.

42. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el agente citotóxico es una maitansina seleccionada a partir del grupo que comprende las fórmulas (IV-L), (IV-D), y (IV-D,L):



en donde:

Y representa $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ$,

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 heterocicloalquilo, y además R2 puede ser H;

5 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 heterocicloalquilo;

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

15 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 heterocicloalquilo; y

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

20 43. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque 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 H.

44. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque 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.

25 45. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque 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.

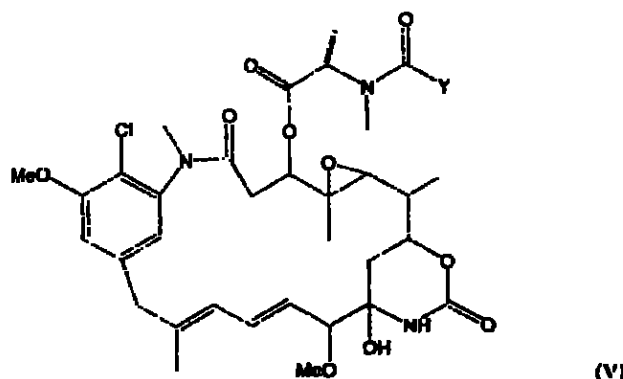
46. El conjugado citotóxico de conformidad con la

175
180

reivindicación 42, caracterizado porque R1 y R2 son metilo, R5, R6, R7, R8 son cada uno H, I y m son 1, n es 0, y Z es -SCH3.

47. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque el agente citotóxico está representado por la fórmula (IV-L).

48. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el agente citotóxico es una maitansina de la fórmula (V):



en donde:

Y representa $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ$,

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 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 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 heterocicloalquilo;

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

5 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 heterocicloalquilo.

10 49. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque R1 es H, R2 es metilo, R5, R6, R7, y R8 son cada uno H; l y m son cada uno 1; n es cero; y Z es H.

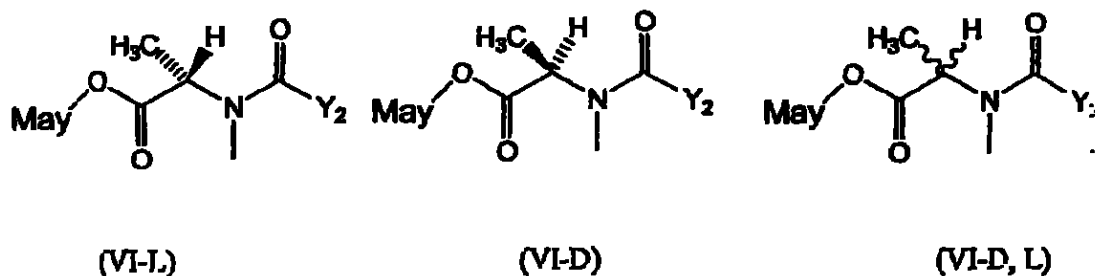
50. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado porque R1 y R2 son metilo, R5, R6, R7, y R8 son cada uno H; l y m son 1; n es cero; y Z es H.

15 51. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado porque R1 es H, R2 es metilo, R5, R6, R7, y R8 son cada uno H; l y m son 1; n es cero; y Z es -SCH3.

20 52. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado porque R1 y R2 son metilo, R5, R6, R7, y R8 son cada uno H; l y m son 1; n es cero; y Z es -SCH3.

53. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el agente citotóxico es una maitansina seleccionada a partir del grupo que comprende las fórmulas (VI-L), (VI-D) y (VI-D,L):

25



174
122

Y_2 representa $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

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 heterocicloalquilo, y además R2 puede ser H;

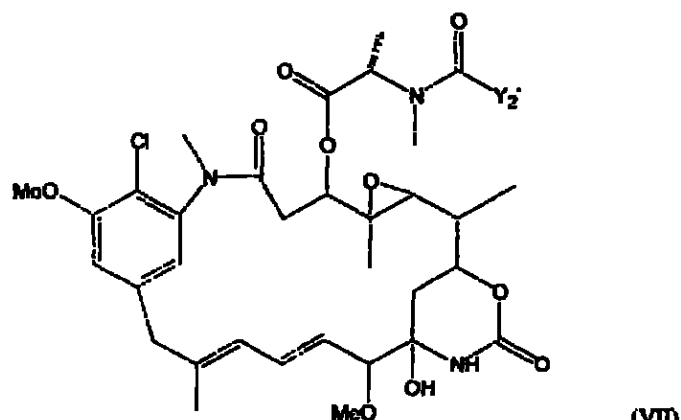
R3, R4, R5, R6, R7 y R8 son cada uno de manera independiente H, CH3, C2H5, alquilo o alquenilo cíclico lineal que tiene 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo;

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 heterocicloalquilo; y

May es un maitansinoide

54. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el agente citotóxico es una maitansina de la fórmula (VII):



125
(73)

5 en donde:

Y_2' representa



en donde:

10

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 heterocicloalquilo, 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 heterocicloalquilo;

20

R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, 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 heterocicloalquilo;

25

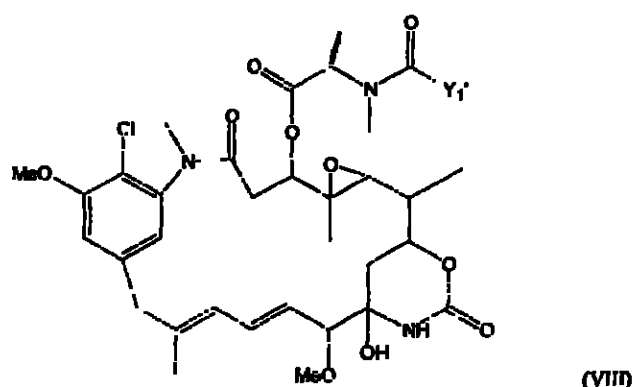
l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno de manera independiente 0 o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero en ningún momento; y

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 3-10 átomos de carbono, o simple o arilo sustituido

o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo.

55. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 54, caracterizado porque R1 es H y R2 es metilo.

56. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el agente citotóxico es una maitansina de la fórmula (VIII):



en donde:

Y1' representa

$(CR_7CR_8)_1(CR_9=CR_{10})_p(C=C)_qA_r(CR_5CR_6)_mD_n(CR_{11}=CR_{12})_t(C=C)_s$

$B_l(CR_3CR_4)_nCR_1R_2S-$

en donde:

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

R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, 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 heterocicloalquilo; 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

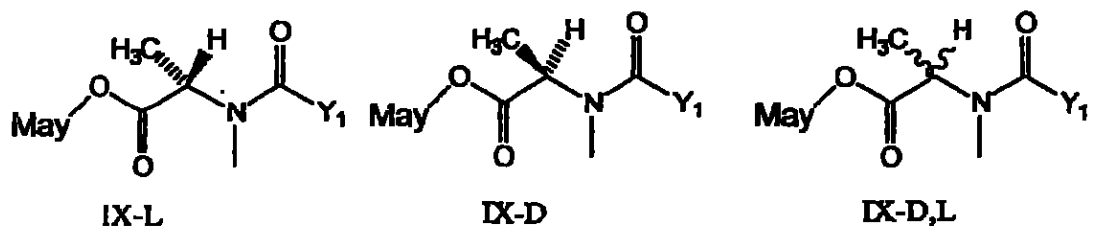
87
125

de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en ningún momento.

57. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 56, caracterizado porque R1 es H y R2 es metilo.

5 58. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 56, caracterizado porque R1 y R2 son metilo.

59. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 54, caracterizado porque el agente citotóxico es una maitansina seleccionada a partir del grupo que comprende las fórmulas (IX-L), (IX-D), y (IX-D,L):



en donde:

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

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 heterocicloalquilo;

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.

5 60. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado porque R1 es H y R2 es metilo o R1 y R2 son metilo.

10 61. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado porque 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.

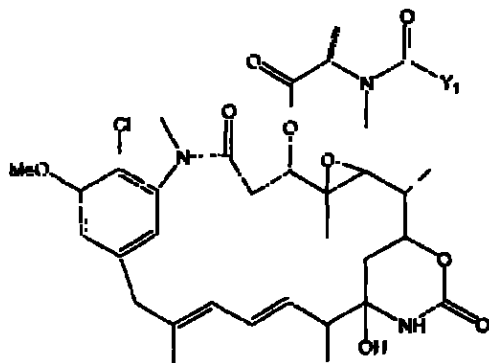
62. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado porque R1 y R2 son metilo; R5, R6, R7 y R8 son cada uno H; l y m son 1; n es 0.

15 63. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque the maitansinoide está representado por la fórmula (IX-L).

64. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 61, caracterizado porque the maitansinoide está representado por la fórmula (IX-L).

20 65. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque the maitansinoide está representado por la fórmula (IX-L).

25 66. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el agente citotóxico es una maitansina de la fórmula (X):



179
178

5 en donde:

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

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 heterocicloalquilo;

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.

67. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque 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.

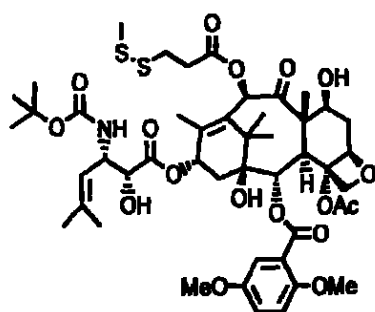
68. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque R1 y R2 son metilo; R5, R6, R7 y R8 son cada uno H; l y m son 1; y n es 0.

69. El conjugado citotóxico de conformidad con la

180
195

reivindicación 25, caracterizado porque el agente de enlace celular es una versión humanizada del anticuerpo monoclonal DS6 anti-CA6 de murino o un fragmento de enlace de epítipo del mismos y en donde el agente citotóxico es DM1 o DM4.

5 70. El conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el agente citotóxico es el taxano de la fórmula (II):



(XI)

15 71. Un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glicótopo CA6, que comprende poner en contacto una célula que expresa glicótopo CA6 con el conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 25.

20 72. El método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glicótopo CA6 de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado porque el conjugado citotóxico comprende un anticuerpo monoclonal anti-CA6 o un fragmento de enlace de epítipo del mismo como el agente de enlace celular y Dom 1 o DM4 como el agente citotóxico.

25 73. El método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glicótopo CA6 de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado porque el conjugado citotóxico comprende un anticuerpo monoclonal anti-CA6 o un fragmento de enlace de epítipo

del mismo como el agente de enlace celular y a taxano como el agente citotóxico.

74. El método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glicótopo CA6 de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado porque el conjugado citotóxico comprende una versión humanizada del anticuerpo DS6 de murino o un fragmento de enlace de epítipo del mismo como el agente de enlace celular y DM1 o DM4 como el agente citotóxico.

75. El método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glicótopo CA6 de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado porque el conjugado citotóxico comprende una versión humanizada del anticuerpo DS6 de murino o un fragmento de enlace de epítipo del mismo como el agente de enlace celular y a taxano como el agente citotóxico.

76. El método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glicótopo CA6 de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado porque la inhibición de crecimiento resulta en la muerte de la célula.

77. El método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa el glicótopo CA6 de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado porque el método es ejecutado in vivo, in vitro o ex vivo.

78. Una composición terapéutica, que comprende un conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 25 y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

79. La composición terapéutica de conformidad con la reivindicación 78, caracterizada porque el conjugado citotóxico comprende una versión humanizada del anticuerpo DS6 de murino o

182
[00

un fragmento de enlace de epítipo del mismo como el agente de enlace celular y DM1 o DM4 como el agente citotóxico.

5 80. La composición terapéutica de conformidad con la reivindicación 78, caracterizada porque el conjugado citotóxico comprende una versión humanizada del anticuerpo DS6 de murino o un fragmento de enlace de epítipo del mismo como el agente de enlace celular y a taxano como el agente citotóxico.

10 81. Un método para tratar a un sujeto que tiene un cáncer, el método que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición terapéutica de conformidad con la reivindicación 78 a un sujeto que tiene un cáncer, tratando de esta manera a un sujeto que tiene un cáncer.

15 82. El método para tratar a un sujeto que tiene un cáncer de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado porque el conjugado citotóxico comprende una versión humanizada del anticuerpo DS6 de murino o un fragmento de enlace de epítipo del mismo como el agente de enlace celular y DM1 o DM4 como el agente citotóxico.

20 83. El método para tratar a un sujeto que tiene un cáncer de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado porque el conjugado citotóxico comprende una versión humanizada del anticuerpo DS6 de murino o un fragmento de enlace de epítipo del mismo como el agente de enlace celular y a taxano como el agente citotóxico.

25 84. El método para tratar a un sujeto que tiene un cáncer de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado porque el cáncer es uno en el cual el glicótopo CA6 es expresado o sobreexpresado.

85. El método para tratar a un sujeto que tiene un cáncer de

conformidad con la reivindicación 81, caracterizado porque el cáncer es seleccionado a partir de un grupo que comprende carcinoma de ovario seroso, carcinoma de ovario endometriode, neoplasma del cervix uterino, neoplasma del endometrio, neoplasma de la vulva, carcinoma de seno, tumor pancreático, y tumor del urotelio.

86. Un equipo que comprende un conjugado citotóxico de conformidad con la reivindicación 25, que comprende además:

- a) un compartimiento que comprende el conjugado citotóxico; y
- b) instrucciones para usar el equipo.

87. El equipo de conformidad con la reivindicación 86, caracterizado porque el conjugado citotóxico comprende una versión humanizada del anticuerpo DS6 de murino o un fragmento de enlace de epítipo del mismo como el agente de enlace celular y DM1 o DM4 como el agente citotóxico.

88. El equipo de conformidad con la reivindicación 86, caracterizado porque el conjugado citotóxico comprende una versión humanizada del anticuerpo DS6 de murino o un fragmento de enlace de epítipo del mismo como el agente de enlace celular y a taxano como el agente citotóxico.

89. El equipo de conformidad con la reivindicación 86, caracterizado porque las instrucciones comprenden instrucciones para tratar a un sujeto que tiene un cáncer.

90. El equipo de conformidad con la reivindicación 89, caracterizado porque el cáncer es uno en el cual el glicótopo CA6 es expresado o sobreexpresado.

91. El equipo de conformidad con la reivindicación 90, caracterizado porque el cáncer es seleccionado a partir del grupo que comprende carcinoma de ovario seroso, carcinoma de ovario

endometriode, neoplasma del cervix uterino, neoplasma del endometrio, neoplasma de la vulva, carcinoma de seno, tumor pancreático, y tumor del urotelio.

92. Un equipo que comprende una composición terapéutica de conformidad con la reivindicación 78, que comprende además:

a) un compartimiento que contiene la composición terapéutica;

y

b) instrucciones para el uso del equipo.

93. El equipo de conformidad con la reivindicación 92, caracterizado porque el conjugado citotóxico de la composición terapéutica comprende una versión humanizada del anticuerpo DS6 de murino o un fragmento de enlace de epítipo del mismo como el agente de enlace celular y DM 1 o DM4 como el agente citotóxico.

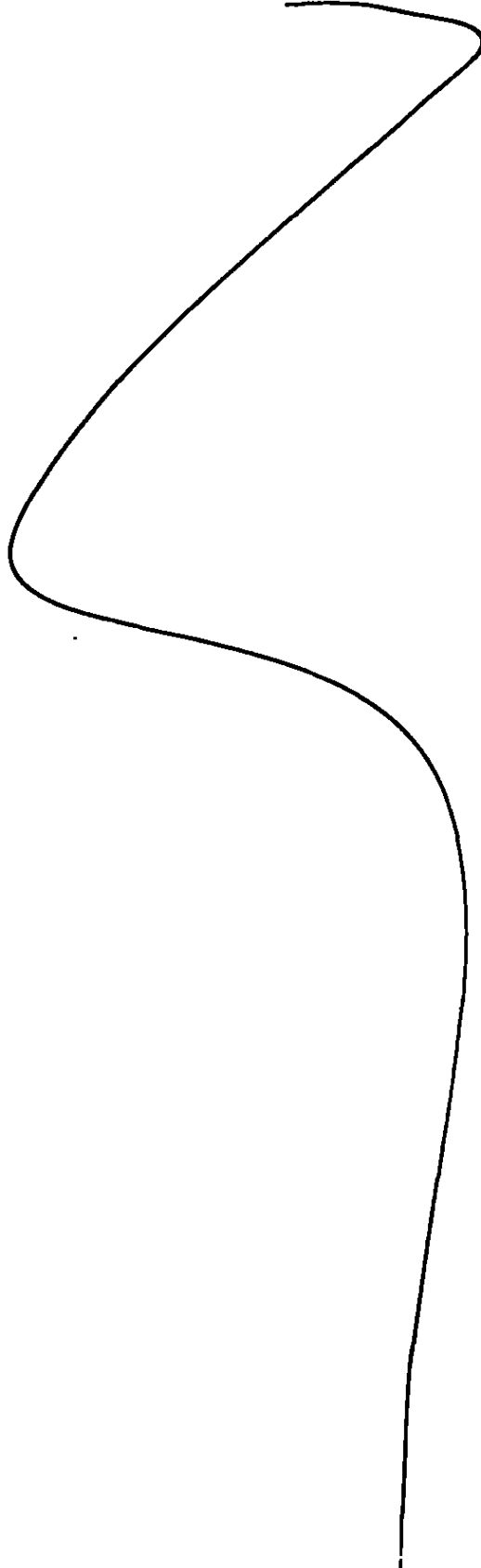
94. El equipo de conformidad con la reivindicación 92, caracterizado porque el conjugado citotóxico de la composición terapéutica comprende una versión humanizada del anticuerpo DS6 de murino o un fragmento de enlace de epítipo del mismo como el agente de enlace celular y un taxano como el agente citotóxico.

95. El equipo de conformidad con la reivindicación 92, caracterizado porque las instrucciones comprenden instrucciones para tratar a un sujeto que tiene un cáncer.

96. El equipo de conformidad con la reivindicación 95, caracterizado porque el cáncer es uno en el cual el glicótopo CA6 es expresado o sobre expresado.

97. El equipo de conformidad con la reivindicación 96, caracterizado porque el cáncer es seleccionado a partir del grupo que comprende carcinoma de ovario seroso, carcinoma de ovario endometriode, neoplasma del cervix uterino, neoplasma del

endometrio, neoplasma de la vulva, carcinoma de seno, tumor pancreático, y tumor del urotelio.



RESUMEN

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 están descritos en todas las modalidades de la invención. En particular, el agente de enlace celular es un anticuerpo monoclonal, y fragmentos de enlace de epítotope del mismo, que reconoce y enlaza el glicótopo CA6. La presente invención también está dirigida a versiones humanizadas o de doble superficie de DS6, un anticuerpo monoclonal de murino anti-CA6, y fragmentos de enlace de epítotope del mismo.

5

10

187
185

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
3 February 2005 (03.02.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/009369 A3

(51) International Patent Classification: C07H 21/04,
C07K 16/00, A61K 39/395

(21) International Application Number:
PCT/US2004/023340

(22) International Filing Date: 21 July 2004 (21.07.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Date:
60488,447 21 July 2003 (21.07.2003) US

(71) Applicant (for all designated States except US): IMM-
MUNOGEN, INC. [US/US]; 128 Sidney Street, Cam-
bridge, MA 02139-4239 (US).

(72) Inventors; and

(73) Inventors/Applicants (for US only): PAYNE, Gillian
[US/US]; 21 Oak Vale Road, Waban, MA 02468 (US).
CHUN, Philip [CA/US]; 181 Pleasant Street #25, Malden,
MA 02148 (US). TAVARES, Daniel, J. [US/US]; 27
Sylvester Rd, Natick, MA 01760 (US).

(74) Agents: HIBSONG, Drew et al.; Sophron Miao, PLLC,
2100 Pennsylvania Ave., N.W., Suite 800, Washington, DC
20037-3213 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GH, GI, GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KR,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR), OAPI (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(88) Date of publication of the international search report:
30 June 2005

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2005/009369 A3

(54) Title: A CA6 ANTIGEN-SPECIFIC CYTOTOXIC CONJUGATE AND METHODS OF USING THE SAME

(57) Abstract: Cytotoxic conjugates comprising a cell binding agent and a cytotoxic agent, therapeutic compositions comprising the conjugates, methods for using the conjugates in the inhibition of cell growth and the treatment of disease, and a kit comprising the cytotoxic conjugates are disclosed are all embodiments of the invention. In particular, the cell binding agent is a monoclonal antibody, and epitope-binding fragments thereof, that recognizes and binds the CA6 glycoprotein. The present invention is also directed to humanized or murinized versions of DS6, an anti-CA6 murine monoclonal antibody, and epitope-binding fragments thereof.

188
186

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB04/23340

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07H 21/04; C07K 16/00; A61K 39/385 US CL : 330/300, 330, 387.3, 388.85, 391.1; 336/23.33; 424/130.1, 178.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 330/300, 330, 387.3, 388.85, 391.1; 336/23.33; 424/130.1, 178.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,776,436 A (ANDERSON ET AL) 07 July 1998 (07/07/98), see entire document, especially Figure 3, SEQ ID NO:6, residues 31-35.	1, 9-14
X	WO 02/16401 (EAST CAROLINA UNIVERSITY) 28 February 2003 (28/02/03), see entire document, especially abstract.	1-14
Y		15-97
Y	STUDNICKA et al. Human-engineered recombinant antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues. Protein Engineering 1994, Vol.7, pages 803-14, especially pages 803-14.	15-97
Y	BOGUNKA et al. A comparison of two murine monoclonal antibodies generated by CDR-grafting and variable domain reengineering. Protein Engineering 1994, Vol.9, pages 893-904, especially abstract.	15-97
Y	WO 91/08967 (CELLTECH LIMITED) 11 July 1991 (11/07/91), see entire document, especially abstract.	15-97
Y	US 5,416,064 A (CHAM ET AL) 16 May 1995 (16/05/95), see entire document, especially examples and claims.	25-97
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier applications or patents published on or after the international filing date "L" documents which may have claims on priority claims or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "Y" late documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to substantiate the principle or theory underlying the invention "X" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report 26 APR 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Comptroller for Patents P.O. Box 1420 Alexandria, Virginia 22315-1420 Facsimile No. (703) 305-3238		Authorized officer Larry R. Wilson Telephone No. 703-308-0196 <i>Marc J. White</i>

189
187

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/23340

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,340,761 B1 (CHARI ET AL) 23 January 2002 (22/01/02), see entire document, especially abstract and examples and claims.	25-97
Y	US 6,333,410 B1 (CHARI ET AL) 25 December 2001 (29/12/01), see entire document, especially abstract, examples and claims	25-97

190
188

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/23340

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
CAPLUS, MIDLINE, HOMES, PIR, SWENPROT, WEST
Search terms: inventer name, SEQ ID NOs, monoclonal, polyclonal, antibody, immunization, CDR grafted, CAG glycoprotein, myeloma, cancer, treatment.

39L
189

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



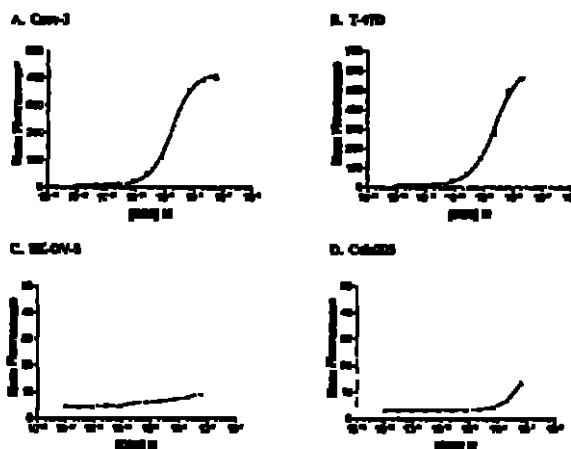
(43) International Publication Date
3 February 2005 (03.02.2005)

PCT

(18) International Publication Number
WO 2005/009369 A2

- (51) International Patent Classification: A61K
- (21) International Application Number: PCT/US2004/023340
- (22) International Filing Date: 21 July 2004 (21.07.2004)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/488,447 21 July 2003 (21.07.2003) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): TM-MUNOGEN, INC. (US/US); 128 Sidney Street, Cambridge, MA 02139-4239 (US).
- (72) Inventors and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): PAYNE, Gillian (US/US); 21 Oak Vale Road, Woburn, MA 02468 (US). CHUN, Philip (CA/US); 181 Pleasant Street #25, Malden, MA 02148 (US). TAVARES, Daniel, J. (US/US); 27 Sylvester Rd, Natick, MA 01760 (US).
- (74) Agents: HERRONG, Drew et al.; Soghra Mion, F.I.C., 2100 Pennsylvania Ave., N.W., Suite 800, Washington, DC 20037-3213 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AH, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GR, HU, IL, IN, JP, KR, KZ, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, T7, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, CH, GM, KH, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LI, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: A CA6 ANTIGEN-SPECIFIC CYTOTOXIC CONJUGATE AND METHODS OF USING THE SAME



(57) Abstract: Cytotoxic conjugates comprising a cell binding agent and a cytotoxic agent, therapeutic compositions comprising the conjugates, methods for using the conjugates in the inhibition of cell growth and the treatment of disease, and a kit comprising the cytotoxic conjugates are disclosed as all embodiments of the invention. In particular, the cell binding agent is a monoclonal antibody, and epitope-binding fragments thereof, that recognizes and binds the CA6 glycoprotein. The present invention is also directed to humanized or resurfaced versions of DS6, an anti-CA6 murine monoclonal antibody, and epitope-binding fragments thereof.

WO 2005/009369 A2

192 128

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radiciacion : 06002367 00000000 Folios: 191
Fecha (GND): 2006-01-13 14:10:10
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NUCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES DOR

PATENTE DE INVENCION

PCT

MODELO DE UTILIDAD

()

()

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente. ()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud. ()
- Descripción de la invención. ()
- Dibujos de ser estos pertinentes. ()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas. ()

(X)
(X)
(X)
(X)

COMPLETA

(X)

INCOMPLETA ()

()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. ()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño. ()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas ()

()

()

()

()

()

()

()

()

COMPLETA

()

INCOMPLETA

()

()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado. ()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud. ()
- Representación gráfica del esquema de trazado ()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. ()

()

()

()

()

()

()

()

()

COMPLETA

()

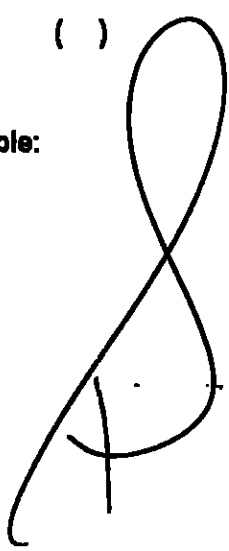
INCOMPLETA

()

()

Firma Responsable:

Fecha:



183
121

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RUBIO CAMACHO HUMBERTO
Apoderado(a) y/o Representante de
IMMUNOGEN, INC

REFERENCIA	Radicación No.	06 2587
	Solicitud internacional	US/2004/023340
	Fecha inicio fase nacional	21/02/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	5659

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. Las figuras 12, 13 y las contenidas en el folio 42 no son legibles, además, las estructuras químicas contenidas en los folios 91, 92 y 95 de la descripción, y folios 168, 174 y 178 del capítulo reivindicatorio no están completas, lo que incide, para comprensión y posterior trámite de publicación y escaneo de la solicitud.
3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

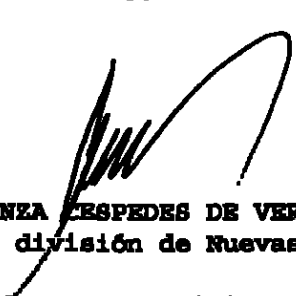
Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

194
192

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 6 2587



ALIX CARMONA ESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 03 MAR. 2006
jramos