



34904 // 5

005

Organización y
Digitalización CSA Ltda



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

PCT // 5

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

09-34904

21. EXPEDIENTE No.

64. TITULO : ANTICUERPOS E INMUNOCONJUGADOS Y SUS
USOS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL C07K 16/30

71. SOLICITANTE GENENTECH, INC

DOMICILIO: SOUTH SAN FRANCISCO, ESTADO DE
CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA.

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

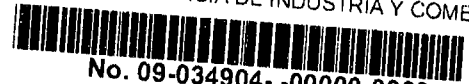
22. BOGOTÁ, D.C. - 3 ABR. 2009

(FORMA P 10)

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-034904- -00000-0000

Fecha: 2009-04-03 16:47:51

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACION

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 378

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **GENENTECH, INC.**

Dirección: 1 Dna Way, South San Francisco, California 94080, Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: South San Francisco, Estado de California, Estados Unidos de América.

Lugar de Constitución: Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5°, Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: DENNIS, Mark S.; RUBINFELD, Bonnee; POLAKIS, Paul y JAKOBOVITS, Aya.

Dirección: 120 Plymouth, San Carlos, CA 94070; 4186 Quail Run Drive, Danville, CA 94506; 265 West Blithedale Avenue, Mill Valley, CA 94941; 3135 Hutton Drive, Beverly Hills, CA 90210.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

⑤ PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/082726

Fecha: 26/10/07

Publicación Internacional No. WO 2008/052187 A3

Fecha: 02/05/08

⑥

Título (54) "ANTICUERPOS E INMUNOCONJUGADOS Y SUS USOS"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 16/30

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

27/10/06

60/863,295

US

05/12/06

60/868,707

US

30/03/07

60/921,300

US

29/06/07

60/937,857

⑨

Comprobante de Pago No. 09-25,791

Fecha: Abril 1 de 2009

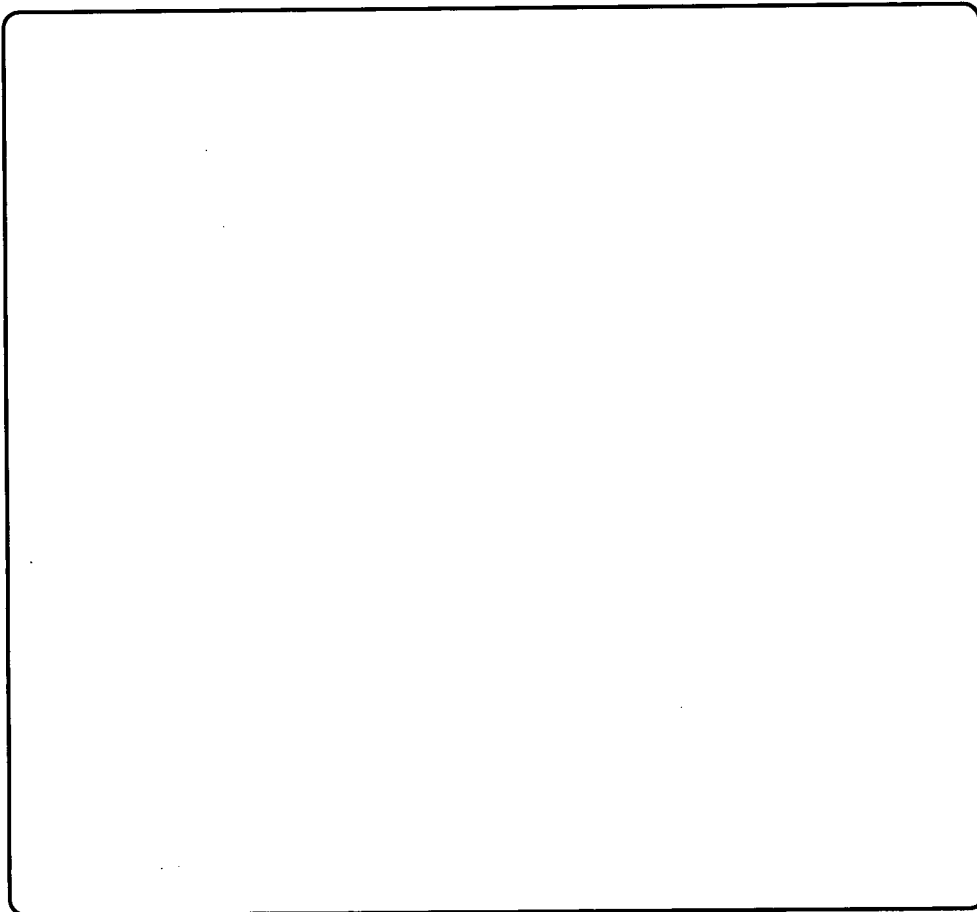
10

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.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ 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.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional, Publicación, Opinión Escrita y Listado de Secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 25,791
FECHA : ABRIL 1 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-034904- -00000-0000

Fecha: 2009-04-03 16:47:51 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 378

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	79464066	01/04/2009	36,635,000.00

***** CONCEPTO *****

CONT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
	TOTAL :	\$ 540,000.00

N: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDADA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se esta presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDADA RICAURTE

T.P. No. 53.215

Traducción Oficial N° 10-31-191

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: TERI LEE
3. actuando en calidad de: Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello y estampilla de TERI LEE, Notario Público

CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
 6. el día tres (3) de Octubre, año 2005
 7. por el Secretario Adjunto de Estado, Estado de California
 8. Número: **258054**
 9. Sello/Estampilla
 10. Firma: (Ilegible)
- Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "The Great Seal of the State of California"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



CALIFORNIA RECONOCIMIENTO PARA TODO FIN

Estado de California)
) ss.
Condado de San Mateo)

El día 13 de Septiembre, año 2005, ante mi, TERI LEE, Notario Público, compareció personalmente TIMOTHY R. SCHWARTZ, a quien personalmente conozco cómo la persona cuyo nombre suscribe el documento, y quien reconoció en mi presencia haber formalizado el mismo dentro de su investidura, y que mediante su firma en el documento, la persona o entidad en cuyo nombre actuó, formalizó el documento.

En TESTIMONIO firmo y sello

Firma (ilegible)

N. del T: hay un sello: TERI LEE, Comisión Nº 1514234, Notario Público, California, Condado de San Mateo.

OPCIONAL

Descripción del documento adjunto

Título o Clase de Documento: Colombia Power

Fecha: 9/13/2005

Número de páginas: 1

Firma diferente de la mencionada anteriormente: *Ninguna*

PODER DE REPRESENTACION LEGAL

Documento escrito en idioma Inglés y Español, suscrito por Genentech, Inc., con domicilio en 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, EEUU.

DADO Y FIRMADO EL DIA TRECE (13) DE Septiembre año 2005

Firma (ilegible)

N. del T.: Hay un sello de tinta: Timothy R. Schwartz, Ph. D.- Asesor Sección de Patentes – Genentech, Inc. –

Signatario Corporativo Autorizado.

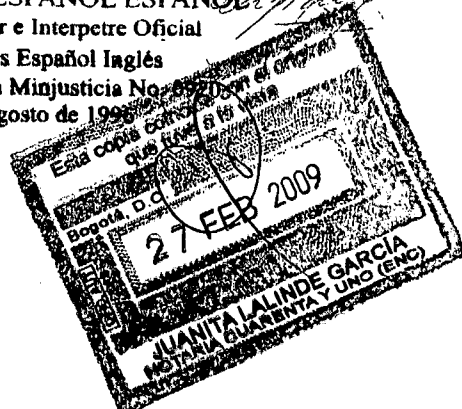
ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL

Traductor e Interprete Oficial

Inglés Español Inglés

Resolución Minjusticia No. 002009
Agosto de 1998

Esta copia como fiel del original
que está a la vista



Traducción Oficial N° 10-31-192

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

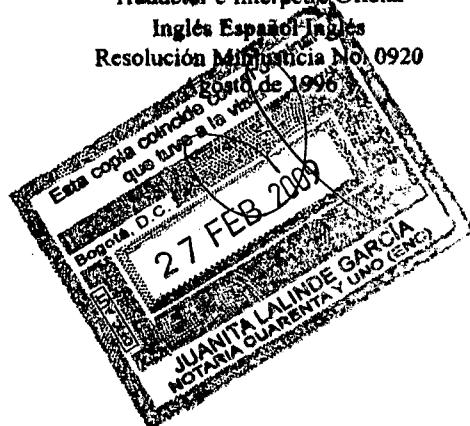
CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265282**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español-Inglés
Resolución Ministerio No. 0920



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE "GENENTECH, INC." ESTA DEBIDAMENTE INCORPORADO BAJO LAS LEYES DEL ESTADO DE DELAWARE Y GOZA DE BUENA REPUTACION Y TIENE EXISTENCIA CORPORATIVA LEGAL, TAL COMO LO MUESTRAN LOS REGISTROS DE ESTE DESPACHO, EN LA FECHA DEL SIETE (7) DE OCTUBRE, AÑO 2005.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE DICHO "GENENTECH, INC." FUE INCORPORADO EL DIA VEINTITRES (23) DE DICIEMBRE DEL AÑO 1986.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE LOS REPORTES ANUALES HAN SIDO RADICADOS HASTA LA FECHA.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE LOS IMPUESTOS DE FRANQUICIA HAN SIDO PAGADOS HASTA LA FECHA.

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACIÓN: 4212779

FECHA 10-07-05

N. del T.: Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office – Delaware"



Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: 0265283
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO .

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO REFORMULADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA VEINTIDOS DE JULIO DEL AÑO 1999, A LAS 9:00 A.M.

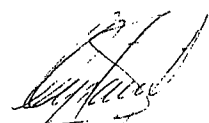
Firma (ilegible)

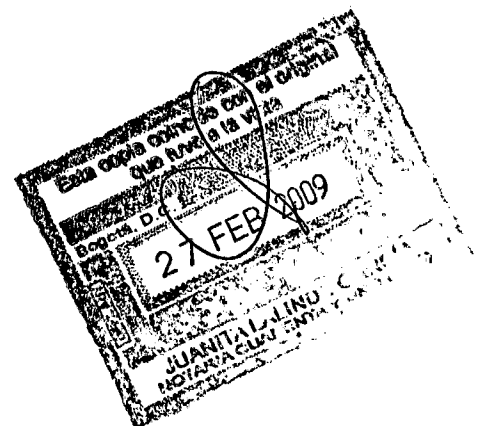
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212780

FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office – Delaware"


ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



**CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
MODIFICADO Y REFORMULADO
DE GENENTECH, INC.**

Genentech, Inc. (la "**Corporación**"), una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, por el presente modifica el Certificado de Incorporación de la Corporación, qué fue registrada originalmente el 23 de diciembre, 1986 bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y posteriormente modificado.

El Certificado de Incorporación de la Corporación es por el presente reformulado y adicionalmente modificado, para leerlo en su integridad como sigue:

ARTÍCULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech Inc.

ARTÍCULO 2

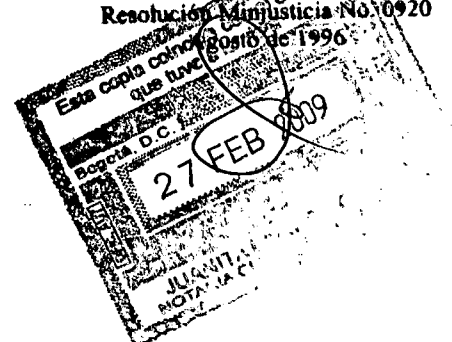
La dirección del domicilio social de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, Condado de New Castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTÍCULO 3

El objetivo social de la Corporación es llevar a cabo cualquier acto o actividad lícita para la cual puedan organizarse las corporaciones bajo la Ley Corporativa General del Estado de Delaware como la misma existe o cómo pueda modificarse de ahora en adelante ("Ley de Delaware").

[Firma]

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpreté Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 10920
Esta copia convalidada de 1996



ARTICULO 4

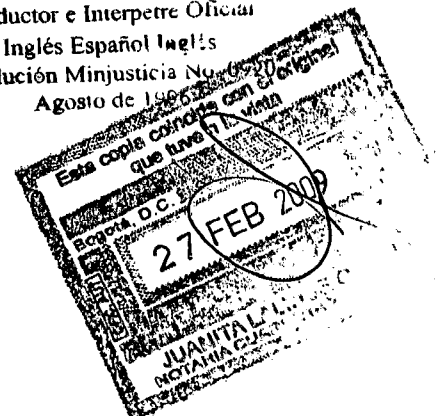
SECCION 4.01. *Capital Accionario.* (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas respectivamente, acción preferencial y

acción ordinaria. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de cuatrocientos millones (400.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, valor nominal \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Trescientos millones (300.000.000) se denominarán acciones ordinarias, valor nominal \$0.02 por acción ("**Acción Ordinaria**") La Acción Ordinaria de la Corporación, será toda de una clase.

(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones se puede aumentar o disminuir (pero no por debajo del número de acciones de las mismas, entonces circulación) mediante el voto afirmativo de una mayoría con poder de voto de la acciones en circulación de la Corporación tituladas para votar sobre ello, independiente de las disposiciones de la Sección 242(b)(2) de Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción ordinaria.* (a) *Emisión y Consideración.* Cualquiera Acción Ordinaria de tesorería o no emitida, puede emitirse para tal consideración según puede fijarse de acuerdo con la ley aplicable periódicamente por la Junta Directiva.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 05-20
Agosto de 1996

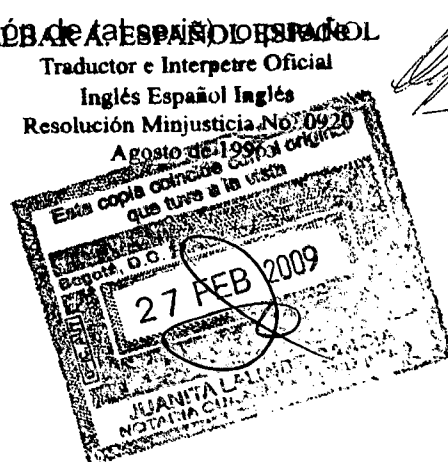


(b) *Dividendos*. Sujeto a los derechos de los titulares de las Acciones Preferenciales, los titulares de las Acciones Ordinarias tendrán derecho a recibir, cuando y cómo lo declare la Junta Directiva, de los recursos de la Corporación que por ley están disponibles para éllo, dividendos pagables o en dinero en efectivo, o en propiedades, o en acciones y los titulares de Acciones Preferenciales no tendrán derecho a participar de tales dividendos (a menos que la Junta Directiva lo disponga de otra manera mediante una resolución, estipulando la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCION 4.03. *Acciones Preferenciales*

(a) Series y Límites de Variaciones entre las Series. Cualquier acción de tesorería o no emitida de Acciones Preferenciales puede emitirse periódicamente en una o más series para tal consideración, según puede fijarse periódicamente por la Junta Directiva. Antes de la emisión de alguna serie particular de Acciones Preferenciales, se debe registrar un certificado ante la Secretaría de Estado de Delaware manifestando la designación, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones a ser adjuntas a las Acciones Preferenciales de tal serie y cualesquiera otros asuntos que sean requeridos, y la Junta Directiva fijará y determinará; y por la presente está expresamente facultada para fijar y determinar, en la manera prevista por la ley, los pormenores de las acciones de tal serie (en tanto que no sean inconsistentes con las disposiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluido, pero no limitado a lo siguiente:

(i) la designación característica de tal serie y el número de acciones que constituirán la misma, cuya cantidad puede aumentarse (excepto cuando la Junta Directiva lo disponga de otra manera en la creación de la serie).



disminuirse (pero no por debajo del número de acciones de las mismas entonces circulantes) periódicamente mediante acción similar de la Junta Directiva.

(ii) la tasa anual de dividendos pagables sobre acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales tales dividendos serán pagables y la fecha desde cuando los dividendos serán acumulativos; en tal evento la Junta Directiva determinará qué dividendos serán acumulativos;

(iii) si tal serie tendrá derecho a voto, además de los derechos de votación proporcionados por la ley, y si es así, las condiciones de tales derechos a voto;

(iv) si tal serie tendrá privilegios de conversión y, en ese caso, los términos y condiciones de tal conversión, incluido, pero no limitado a, disposiciones para el ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y en tal manera cómo lo determinará la Junta directiva;

(v) si o no, las acciones de tal serie serán redimibles y, en ese caso, los términos y condiciones de tal redención, incluso la fecha o fechas en o después de que ellas sean redimibles, y la cantidad pagable por acción en caso de redención, cuya cantidad puede variar bajo condiciones diferentes y en fechas diferentes de redención;

(vi) si tal serie tendrá un fondo de amortización para la redención o compra de acciones de esa serie y, en ese caso, las condiciones y cantidad de tal fondo de amortización;

(vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de liquidación voluntaria o involuntaria, disolución o liquidación de la Corporación, y los derechos de prioridad relativos, si los hay, de pago de acciones de esa serie; y



(viii) cualesquiera otros derechos relacionados preferencias y limitaciones de tal serie.

ARTÍCULO 5

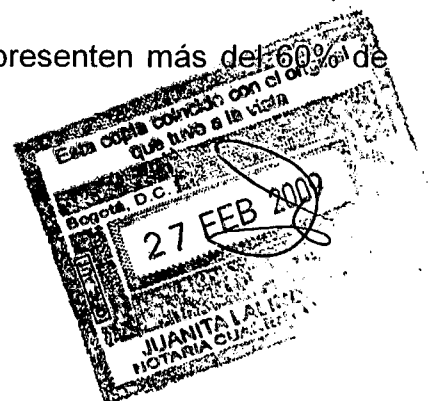
SECCIÓN 5.01. *Modificación de los Estatutos por los Directores.* (a.) En apoyo y no en limitación a los poderes conferidos por el estatuto, la Junta Directiva está autorizada expresamente para formular, modificar, corregir, derogar, y rescindir los estatutos de la Corporación, sujeto a las Secciones 5.01(b) y 5.01(c) del presente.

(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, y 5.06, de los estatutos sólo pueden ser modificados, corregidos, derogados, o rescindidos mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultados para votar sobre ello y que representen más del 60% de las acciones tituladas para votación sobre las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos sólo pueden modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse, mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario titulados para votar sobre ello, y que representen más del 90% de las acciones tituladas para votación sobre las mismas.

SECCIÓN 5.02. *Modificación del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01

(b) de este Certificado de Incorporación sólo puede modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse, mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultado para Votar sobre ella, que representen más del 60% de



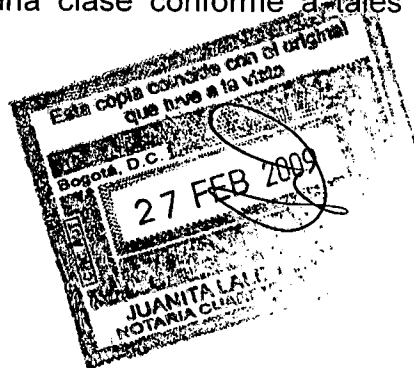
ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

las acciones tituladas para ser votado sobre ello. La sección 5.01 (c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación sólo pueden modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultado para votar sobre ello, que representen más del 90% de las acciones tituladas para ser votado sobre ello.

ARTÍCULO 6

SECCIÓN 6.01 - *Elección de Directores por los Titulares de Acciones Preferenciales.*

Durante cualquier período cuando los titulares de alguna Acción Preferencial o una o más series de las mismas, votando como una clase, sean titulados para elegir un número específico de directores, por razón de dividendos vencidos u otras disposiciones otorgándoles el derecho para hacerlo, entonces y durante ese periodo de tiempo mientras continúe el derecho (i) el entonces autorizado número de directores se aumentará por tal número especificado de directores, y los titulares de tales Acciones Preferenciales o tal serie de las mismas, votando como una clase, se facultarán para elegir a los directores adicionales previstos, de conformidad con las disposiciones de tal Acción Preferencial o serie; (ii) cada director adicional desempeñará el cargo durante tal término y tendrá tales poderes de votación como sea expresado en las disposiciones relacionadas con las Acciones Preferenciales o serie; y (iii) cuando los titulares de alguna Acción Preferencial o serie de las mismas son despojados de tales derechos para elegir un número específico de directores, votando como una clase, conforme a las disposiciones de tal Acción Preferencial o serie, los periodos del cargo de todos los directores elegidos por los titulares de Acciones Preferenciales o serie, votando como una clase conforme a tales



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

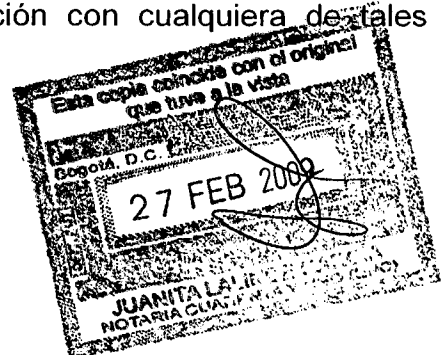
disposiciones, o eligieron llenar alguna vacante resultante de la muerte, dimisión o remoción de directores elegidos por los titulares de Acciones Preferenciales o serie, terminará inmediatamente y el número autorizado de directores por consiguiente, se reducirá.

SECCIÓN 6.02. *Papeletas de votación.* Las elecciones de directores en una asamblea anual o especial no necesitan ser mediante papeletas escritas, a menos que los estatutos de la Corporación lo dispongan de otra manera.

SECCIÓN 6.03. *Eliminación de Cierta obligación Personal de los Directores.* (a.)

Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o ante sus accionistas por los daños y perjuicios por contravención de deberes fiduciarios monetarios como director, hasta el punto máximo permitido por la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y los herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quién era o es una parte o es amenazada ser hecha una parte a, o está involucrada en alguna amenaza, pendiente o a cumplirse, de acción, demanda o procedimiento, sea civil, penal, administrativo o investigativo, por causa del hecho que tal persona es o fue un director de la Corporación, o es o estuvo desempeñando un cargo a petición de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, empresa conjunta, fideicomiso u otra empresa, será indemnizada y será exonerada de responsabilidad por la Corporación, hasta el punto máximo permitido por la Ley de Delaware - El derecho a indemnización conferida en esta Sección 6.03 también incluirá el derecho a ser pagado por la Corporación por los gastos incurridos en relación con cualquiera de tales



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

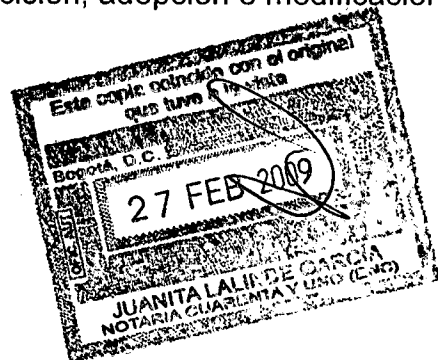
procedimientos, anticipadamente a la disposición final, hasta el máximo punto autorizado por la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferida en esta Sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, mediante la acción de su Junta Directiva, proporcionar la indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta el alcance y hasta tal efecto como lo determine la Junta Directiva que sea apropiado y autorizado por la Ley de Delaware.

(d) La Corporación tendrá la facultad para adquirir y mantener seguros en nombre de cualquier persona que es o fue director, funcionario, empleado o agente, de la Corporación o es o estuvo desempeñando un cargo a petición de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente, de otra corporación, sociedad, empresa conjunta, fiduciaria u otra empresa; contra cualquier gasto, obligación o pérdida, incurrida por tal persona en cualquier capacidad o surgida de su status como tal, la Corporación tuviera o no la facultad para indemnizarlo contra tal obligación bajo la Ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán excluyentes de cualquier otro derecho el cual cualquier persona de otra manera pudiera tener o adquirir de ahora en adelante.

(f) Ni la modificación, corrección, derogación o rescisión, de esta Sección 6.03, ni la adopción de cualquier provisión de este Certificado de Incorporación o los Estatutos de la Corporación, tampoco, al alcance máximo permitido por la Ley de Delaware, cualquier modificación legal, eliminará o reducirá el efecto de esta Sección 6.03 con respecto de cualesquier actos u omisiones que ocurran antes de tal modificación, corrección, derogación, rescisión, adopción o modificación.



ILBARA. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español/ Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
A gosto de 1996

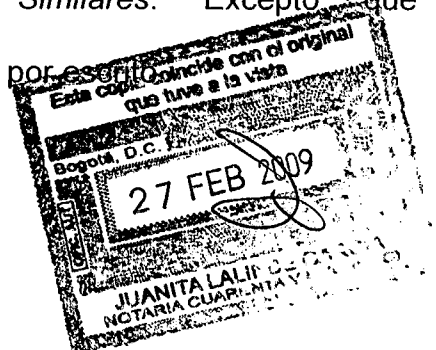
ARTÍCULO 7

SECCION 7.01. *Sección 203 de Ley de Delaware.* La Corporación por el presente, elige no ser regida por la Sección 203 de Ley de Delaware.

ARTÍCULO 8

SECCIÓN 8.01. *Relación con Roche.* En anticipación a que la Corporación deje de ser una subsidiaria totalmente propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se definió en la Sección 8.05) siga siendo accionista de la Corporación, y en anticipación a que la Corporación (como se definió en la sección 8.05) y Roche puedan involucrarse en similares o en las mismas actividades o líneas comerciales y tengan interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus continuas relaciones contractuales, corporativas y comerciales con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades inherentes a cualquier director quien desea y se esfuerza plenamente para satisfacer tales obligaciones fiduciarias del director, en la determinar el alcance total de tales obligaciones en una situación particular, las disposiciones de este Artículo 8 son expresadas para regular, definir y guiar la conducta de ciertos negocios de la Corporación por cuanto ellos pueden involucrar a Roche y a sus funcionarios y directores, y las facultades, derechos obligaciones y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con las mismas.

SECCIÓN 8.02. *Actividades Comerciales Similares.* Excepto, que Roche Holdings, Inc - pueda de otro modo aceptar por escrito,



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

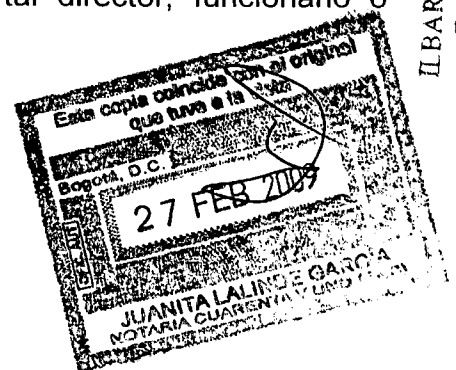
(a) Roche no tendrá una obligación de abstenerse, de comprometerse directa o indirectamente, en las mismas o similares actividades comerciales o líneas comerciales como la Corporación, y

(b) ni Roche ni ningún funcionario o director del mismo serán responsables ante la Corporación o ante sus accionistas por la trasgresión de cualquier deber fiduciario por causa de cualquiera de tales actividad de Roche o de la participación en ello de tal persona.

En caso que Roche tenga conocimiento de una transacción potencial o materia que pueda ser una oportunidad corporativa para Roche y la Corporación;

Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o ante sus accionistas por la trasgresión de cualquier deber fiduciario como accionista de la Corporación o persona controladora de un accionista por el hecho que Roche prosiga o adquiera tal oportunidad corporativa para sí misma, dirija tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad o no comunique la información referente, o no ofrezca tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCIÓN 8.03. *Oportunidades Corporativas*. En caso que un director, funcionario o empleado de la Corporación que también es director, funcionario o empleado de Roche, tenga conocimiento de una transacción potencial o material que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (si tal transacción potencial o material es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación), tal director, funcionario o empleado tendrá el privilegio de ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o a Roche, según tal director, funcionario o



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL

Traductor e Interpretre Oficial

Inglés Español Inglés

Resolución Minjusticia No. 0920

Agosto de 1996

empleado, lo juzgue apropiado bajo las circunstancias y a su entera discreción; y ningún director, funcionario o empleado, será responsable ante la Corporación o ante sus Accionistas por la infracción de cualquier deber fiduciario o deber de lealtad o falta de actuar en (o no opuesto a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de cualquier beneficio personal impropio por causa del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado, ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de la Corporación) o no comunicó la información referente a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para sí mismo o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica la información referente a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCIÓN 8.04. *Consentimiento Implícito de los Accionistas.* Cualquier persona o entidad comprando o adquiriendo algún interés en cualquier acción del capital accionario de la Corporación será considerada que ha tenido aviso de y ha consentido a las disposiciones de este Artículo 8.

SECCIÓN 8.05. *Definiciones.* Para los propósitos de este Artículo 8 y Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" significará la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, empresas conjuntas, asociaciones y otras entidades en las cuales la Corporación posea beneficiosamente (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones votantes en circulación, poder de voto o intereses de votación similares, y (ii) el término "**Roche**" significará Roche Holdings, Inc. y todas las corporaciones, sociedades, empresas conjuntas, asociaciones y otras entidades (diferentes de la



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta Sección 8.05) que son las "**afiliadas**" (como se definió en la Norma 12b-2 bajo las Leyes de la Bolsa de Valores (Securities Exchange) de 1934, (según enmienda) de Roche Holdings. Inc.

SECCIÓN 8.06. *Terminación: Efecto Vinculante.* No obstante algo al contrario en este Certificado de Incorporación, las disposiciones anteriores de este Artículo 8 expirarán en la fecha cuando Roche deje de poseer Acciones Ordinarias que representen por lo menos el 5% del número de acciones circulantes de Acciones Ordinarias de la Corporación y ninguna persona que siendo director o funcionario de la Corporación, sea también director o funcionario de Roche. Tampoco tal expiración, ni la modificación, corrección, cambio o derogación, de cualquier provisión de este Artículo 8, tampoco la adopción de cualquier provisión de este Certificado de Incorporación Enmendado y Reformulado, inconsistente con cualquier provisión de este Artículo 8, eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 con respecto de cualquier asunto que ocurra o cualquier causa de acción, demanda o reivindicación que, pero para este Artículo 8, se acumulara o surgiera, antes de tal expiración, modificación, corrección, revocación o adopción.

SECCIÓN 8.07. *Artículo 9.* Las disposiciones de este Artículo 8 son adiciones a las disposiciones del Artículo 9.

ARTÍCULO 9

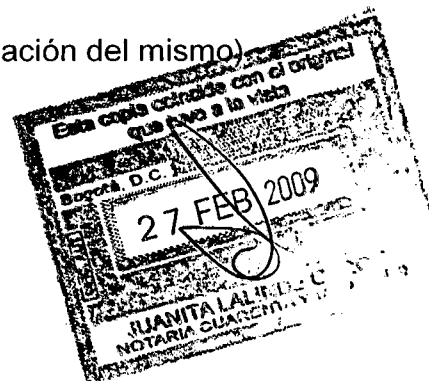
SECCIÓN 9.01. *Acuerdos no Invalidados.* Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier corrección, modificación o terminación de ellos) entre



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretador Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920

la Corporación y Roche será inválido, nulo o anulable, solamente por la razón que Roche es una de las partes de ellos o solamente porque algunos directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados con Roche, están presentes en o participan en la asamblea de la Junta Directiva o comité de los mismos, lo cual autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, corrección, modificación o terminación, o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito; pero tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier corrección, modificación o terminación de los mismos) se registrará por las disposiciones de estos Estatutos de la Corporación Modificados y Reformulados, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y alguna otra ley aplicable. Para los propósitos de este Artículo 9, las expresiones la "Corporación" y "Roche" tienen los significados manifestados en la Sección 8.05.

SECCIÓN 9.02. *Quórum*. Los Directores de la Corporación que también son directores o funcionarios de Roche pueden ser contabilizados en la determinación de la presencia de un quórum en una asamblea de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba algún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o corrección, modificación o terminación del mismo). Las Acciones Circulantes Ordinarias poseídas por Roche pueden contabilizarse para la determinación de la presencia de un quórum en una asamblea de accionistas que autoriza o aprueba cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o corrección, modificación o terminación del mismo).

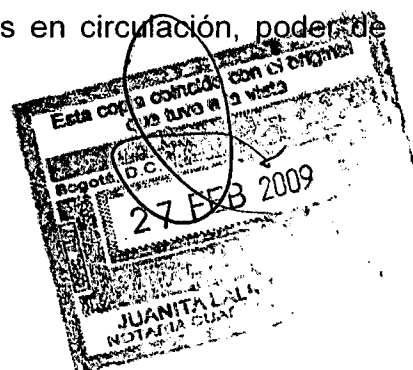


ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretador Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Ministerial No. 0920
Agosto de 1996

SECCIÓN 9.03 - *Ninguna Responsabilidad Por Actividades de Buena Fe.* Roche ni cualquier funcionario o director será responsable ante la Corporación o ante los accionistas para la infracción de cualquier deber fiduciario o deber de lealtad o falta para actuar en (o no opuesto a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de cualquier beneficio personal impropio por el hecho de que Roche o algún funcionario o director del mismo, emprende cualquier acción o ejerce algunos derechos o entrega o retiene de buena fe cualquier aprobación en relación con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto sufragado u otra acción tomada por alguna persona que es director, funcionario u otro representante de Roche, cuyo voto es sufragado o tal persona emprende una acción en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho por o un consentimiento de Roche para los efectos de algún acuerdo o contrato.

SECCIÓN 9.04. *Consentimiento Implícito de los Accionistas.* Cualquier persona o entidad comprando o adquiriendo algún interés en cualquier acción del capital accionario de la Corporación será considerada que ha tenido aviso de y ha consentido a las disposiciones de este Artículo 9.

SECCIÓN 9.05 - *Contratos Protegidos.* Para los propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o con cualquier corporación, sociedad, empresa conjunta, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posea beneficios (directa o indirectamente) del cincuenta por ciento o más de la acciones votantes en circulación, poder de



ELBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Ministerial No. 0920
Agosto de 1996

voto o intereses de votación similares, se juzgará ser un contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación.

SECCIÓN 9.06. *Efecto Vinculante*. Ni la modificación, corrección, cambio o derogación de cualquier provisión de este Artículo 9, tampoco la adopción de cualquier provisión inconsistente con cualquier provisión de este Artículo 9, eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 con respecto de cualquier asunto que ocurra o cualquier causa de acción, demanda o reivindicación que, pero para este Artículo 9, se acumulara o surgiera, antes de tal alteración, modificación, cambio, revocación o adopción.

SECCIÓN 9.07. *Artículo 8*. Las disposiciones de este Artículo 9 son en adición a las disposiciones del Artículo 8.

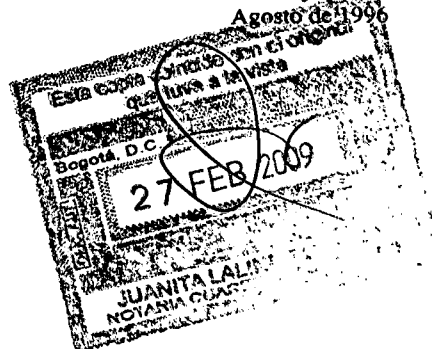
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado, habiendo sido debidamente adoptado de acuerdo con las Secciones 242 y 245 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware y por el consentimiento escrito del único accionista de la Corporación de acuerdo con la Sección 228 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, ha sido otorgado este día veintidós (22) de Julio, 1999.

GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente Senior.
Asesor General y Secretario.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920

Agosto de 1996



Traducción Oficial N° 10-31-194

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: 0265284
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial

Inglés Español Inglés
Resolución Ministerio No. 0920
1996



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO DE MODIFICACION DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA QUINCE (15) DE MAYO DEL AÑO 2000, A LAS 5:00 P.M.

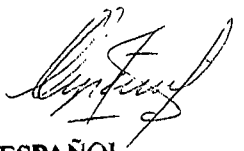
Firma (ilegible)

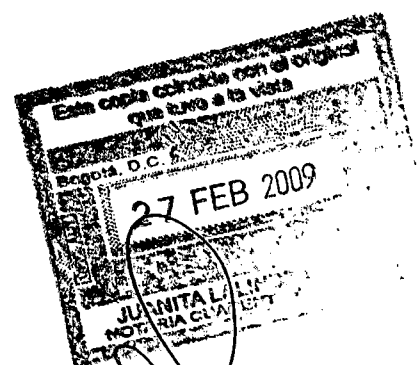
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212781

FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office, Delaware"


ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



**CERTIFICADO DE MODIFICACION
DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO**

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

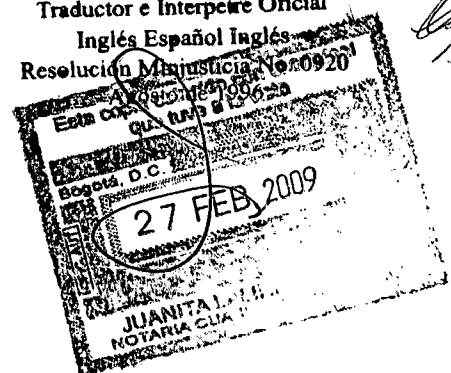
POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario*. (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de setecientos millones

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Min. Justicia No. 0920
Esta copia es válida por 60 días
que termina el 13-06-2009



(700.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Seiscientos millones (600.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de \$0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día quince (15) de Mayo, año 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

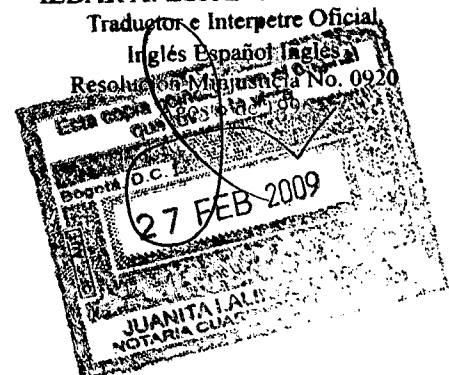
ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL

Traductor e Interpretre Oficial

Inglés Español Inglés

Resolución Magistrada No. 0920

Esta copia por el Notario



Traducción Oficial N° 10-31-195

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

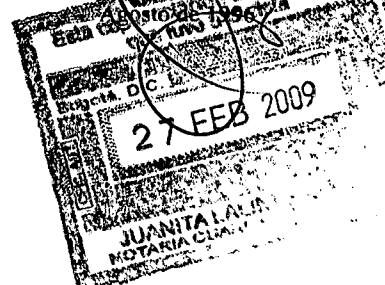
5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265285**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial

Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia N° 0920
del 28 de Agosto de 1996



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO MODIFICADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA DIEZ (10) DE MAYO DEL AÑO 2001, A LAS 2:05 P.M.

Firma: Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212782

FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office – Delaware"


ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



**CERTIFICADO DE MODIFICACION
DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO**

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario*. (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de mil trescientos millones



(1.300.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Un mil doscientos millones (1.200.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de \$0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción Ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día diez (10) de Mayo, año 2001.

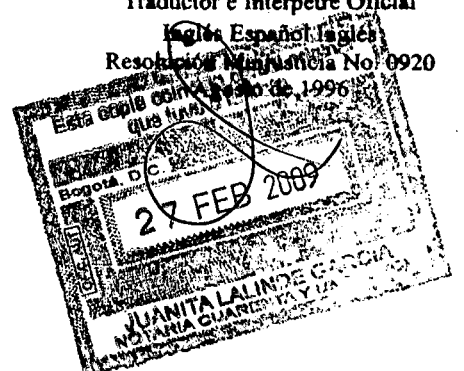
GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial



Traducción Oficial N° 10-31-196

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

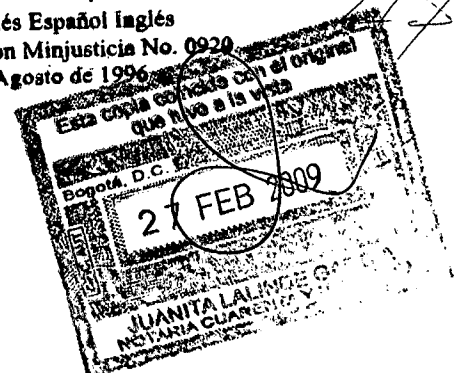
CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: 0265286
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agoato de 1996



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO MODIFICADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA DIEZ Y SEIS (16) DE ABRIL DEL AÑO 2004, A LAS 7:39 P.M.

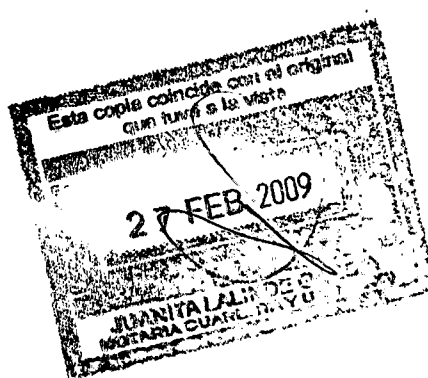
Firma: Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212783

FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office – Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



**CERTIFICADO DE TERCERA MODIFICACION
DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO**

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario*. (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de tres mil cien millones

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL

Traductor e Interprete Oficial

Inglés Español Inglés

Resolución Minjusticia No. 0920 de la vta
Agosto de 1996 que tun

Agosto de 1996 que tun

Bogotá, D.C.

27 FEB 2000

JUANITA L
NOTARIA C

(3.100.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3.000.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de \$0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción Ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día diez y seis (16) de Abril, año 2004.

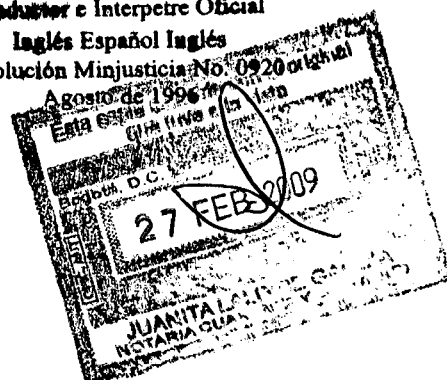
GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

ILBARA. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 092001



State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*
This public document
2. *has been signed by TERI LEE*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of TERI LEE, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

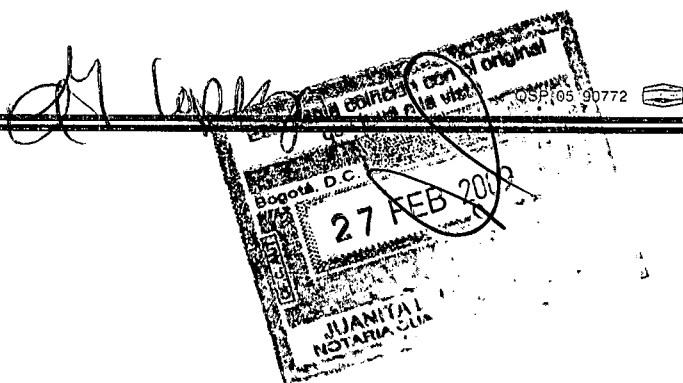
5. *At Sacramento, California*
6. *the 3rd day of October 2005*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 258054*
9. *Seal/Stamp:*

10. Signature



Bruce McPherson

Secretary of State



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of

San Mateo

} ss.

On 9/13/2005

Date

before me,

Teri Lee, Notary Public

Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")

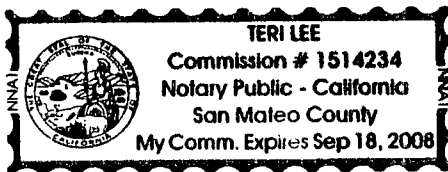
personally appeared

Timothy R. Schwartz

Name(s) of Signer(s)

☒ personally known to me

☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence



to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

Teri Lee
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document:

Colombia Power

Document Date:

9/13/2005

Number of Pages:

1

Signer(s) Other Than Named Above:

None

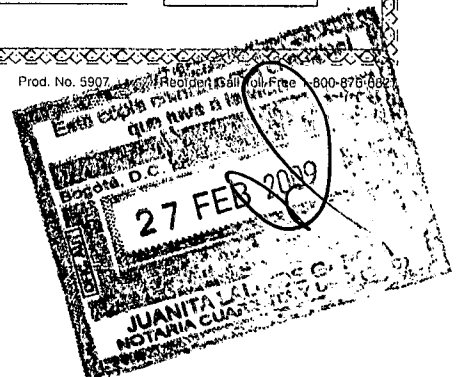
Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

- ☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER
Top of thumb here



Los abajo firmados,

GENENTECH, INC.

Una sociedad organizada y existente
bajo las leyes del Estado de Delaware
Estados Unidos de America.

con domicilio en

1 DNA way

South San Francisco, CA 94080, USA

The undersigned,

Genentech, Inc

A Corporate organized and existing under the
domiciled at laws of State of Delaware, E.U.A

1 DNA Way

South San Francisco, CA 94080, USA

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o
GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA
y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá,
Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No.
5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y
verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir
notificaciones y nombrar apoderados judiciales o
extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al
parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de
1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO
TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE
ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos
designa, quedan especialmente facultados para
representarnos ante las autoridades colombianas,
administrativas, judiciales o de policía, en todos los
trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo
efecto les facultamos para dar ante dichas
autoridades todos los pasos necesarios al objeto
indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos,
recursos y presentar desistimientos; formular
descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las
solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones;
instaurar cancelaciones, renunciar total o
parcialmente a los registros, abonar todos los
impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago
determinado por la ley; recibir todos los documentos
y valores, dando el descargo respectivo; llenar
cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas
las medidas que creyeran conducentes al resguardo
de nuestros intereses; y en caso de producirse
oposición, pasando los antecedentes a los
tribunales, quedan facultados para tomar
intervención como demandantes o demandados ante
los jueces que sean competentes, pudiendo transar,
someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con
todas las demás facultades que resulten necesarias,
y por el presente declaramos desde ahora válido y
bueno cuanto dichos representantes y/o los
apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren
en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA
LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO
SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para
solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la
protocolización de este documento y de cualquier
poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre
nuestro.

Dado y firmado a los 13 días de Sep. 2005

Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Section Patent Counsel
Genentech, Inc.
Authorized Corporate Signatory

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or
GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO
SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of
Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72
No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal
representatives in Bogotá, with power to receive
notifications and to appoint judicial or extrajudicial
agents, so as to comply with paragraph 1o. of article
543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO
TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or
ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of
them appointed, are especially empowered to
represent us before the administrative, judicial or
police authorities of Colombia, in all proceedings
pertaining to industrial property, for which purpose
we authorize them to take before the said authorities
all the necessary steps for the said end; to file
petitions, declarations, claims, recourses and
withdrawals, to draw up specifications; to file
amendments, to limit the scope of applications, file
oppositions; file cancellations total or partially waive
registrations, to pay all installments and effect all
other payments prescribed by law; to receive proper
receipts, to comply with all other requirements and, in
short, to take all those measures which they may
deem fit for the protection of our interests; and in
case of opposition, where the proceedings be passed
over to the courts, we authorize said agents to act on
our behalf, as complainants as well as defendants,
before the competent judges, with full powers to
make arrangements, to submit to arbitrators, to
desist, to collect, to appeal and, in short, with all such
further powers as may be required, and we hereby
declare from now on as valid and good all that said
representatives and/or the agents by any one of them
appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA
and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO
SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply
for protocolization of this document and of any power
of attorney by any one of them conferred in our
name, before the Office of Industrial Property.

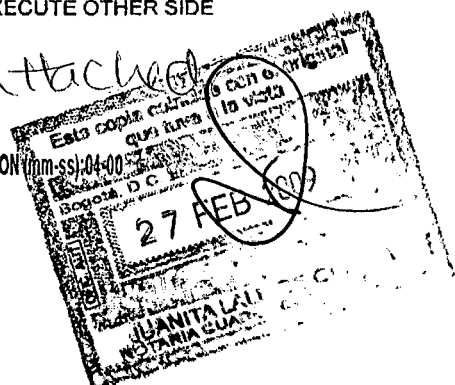
Given and signed this

13 Sept 2005

Timothy R. Schwartz

NOTA RY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

See Attached



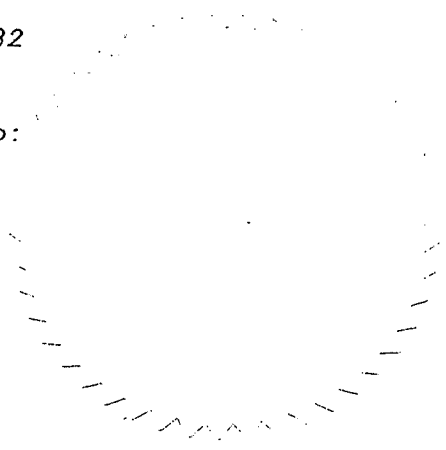
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

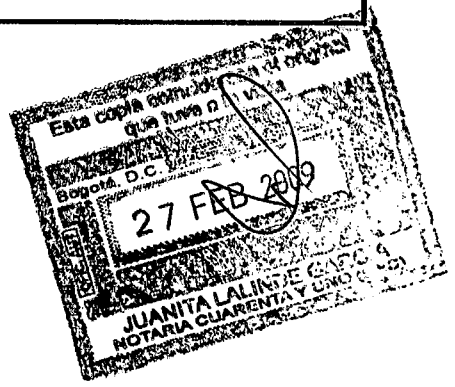
- 1. Country: United States of America
- 2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
- 3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
- 4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

- 5. at Dover, Delaware
- 6. the seventh day of October, A.D. 2005
- 7. by Secretary of State, Delaware Department of State
- 8. No. 0265282
- 9. Seal/Stamp:
- 10. Signature:



Harriet Smith Windsor
Secretary of State



Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY "GENENTECH, INC." IS DULY INCORPORATED UNDER THE LAWS OF THE STATE OF DELAWARE AND IS IN GOOD STANDING AND HAS A LEGAL CORPORATE EXISTENCE SO FAR AS THE RECORDS OF THIS OFFICE SHOW, AS OF THE SEVENTH DAY OF OCTOBER, A.D. 2005.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE SAID "GENENTECH, INC." WAS INCORPORATED ON THE TWENTY-THIRD DAY OF DECEMBER, A.D. 1986.

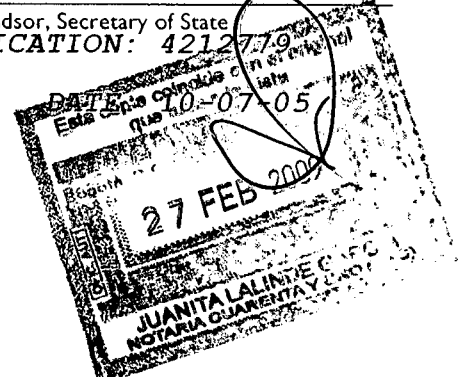
AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE ANNUAL REPORTS HAVE BEEN FILED TO DATE.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE FRANCHISE TAXES HAVE BEEN PAID TO DATE.

2112549

050823723

Harriet Smith Windsor
Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 4212779



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

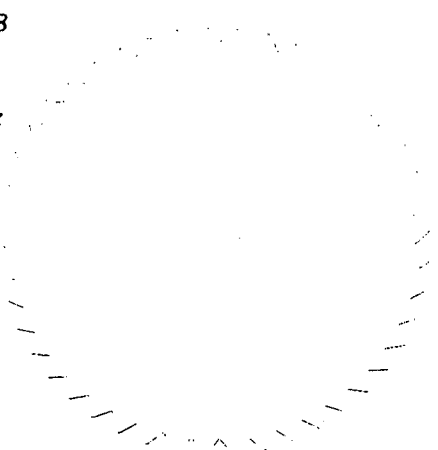
6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

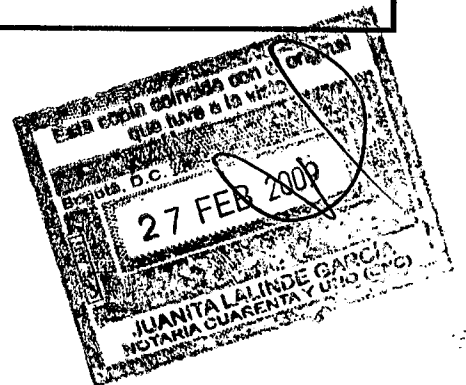
8. No. 0265283

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Harriet Smith Windsor
Secretary of State



Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.

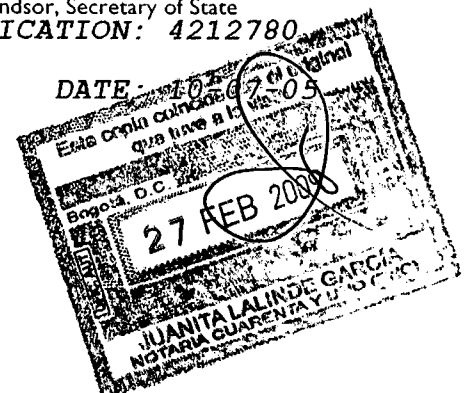
2112549

050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 4212780



AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "Corporation"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

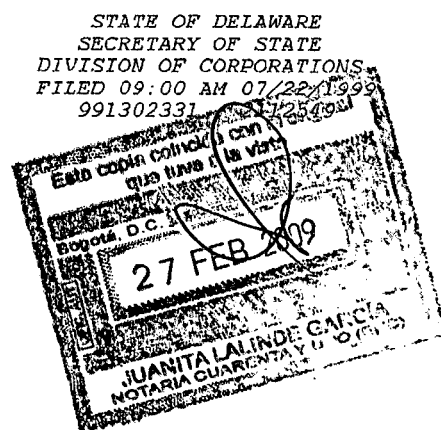
The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("Delaware Law").



ARTICLE 4

SECTION 4.01. Capital Stock. (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. Common Stock. (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

SECTION 4.03. Preferred Stock.

(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of



the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

(i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;

(ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;

(iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;

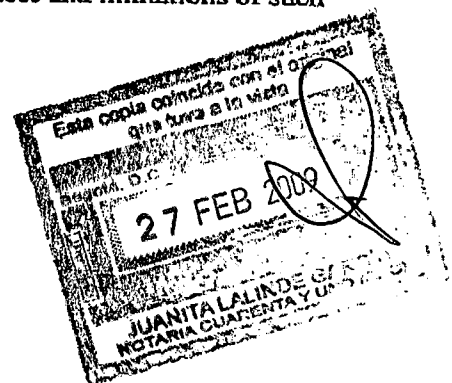
(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;

(vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;

(vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and

(viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.



ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

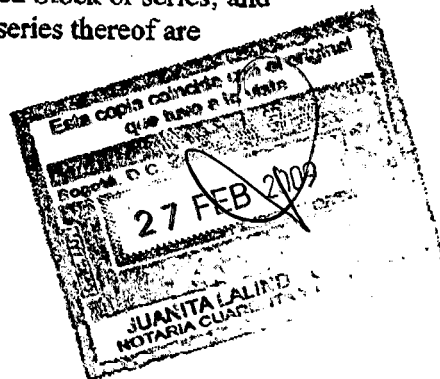
(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are



divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

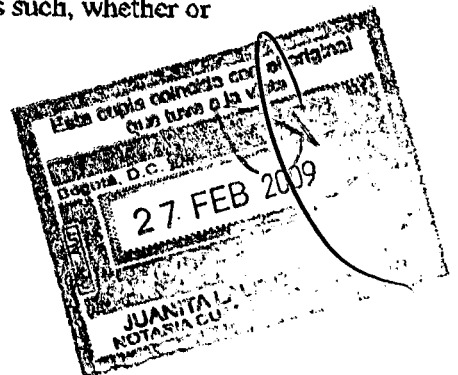
SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors.* (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or



not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

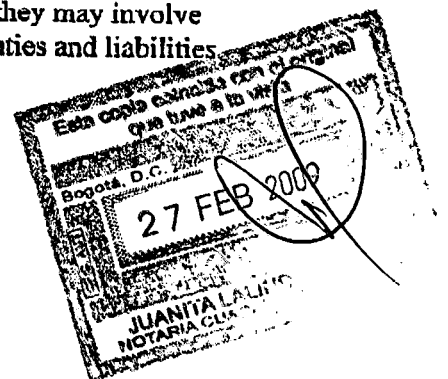
(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, rescission, adoption or modification.

ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities



of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

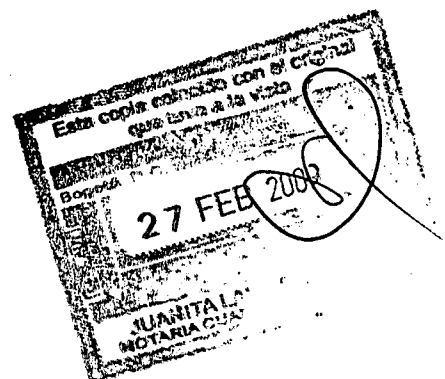
SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities.* In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.



SECTION 8.04. *Deemed Consent of Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

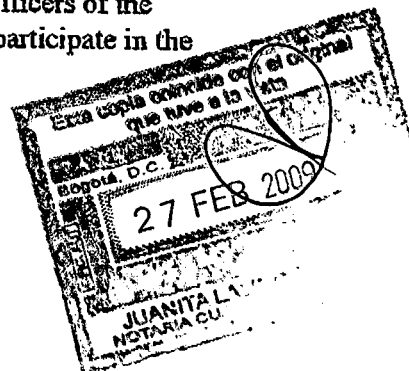
SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term "Roche" shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are "affiliates" (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

SECTION 8.06. *Termination: Binding Effect.* Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. *Article 9.* The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. *Contracts Not Void.* No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the



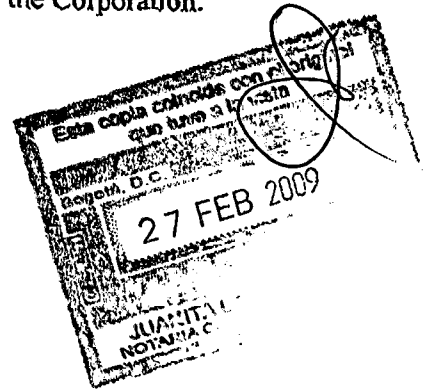
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "Corporation" and "Roche" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. Quorum. Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. No Liability For Good Faith Actions. Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer or director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

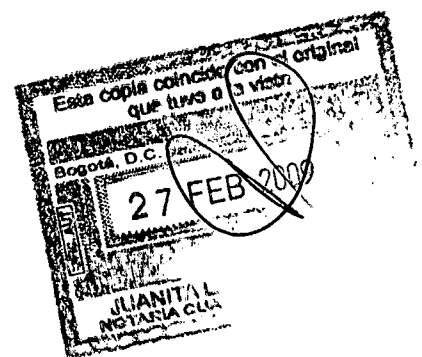
SECTION 9.04. Deemed Consent by Stockholders. Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

SECTION 9.05. Contracts Covered. For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.



SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

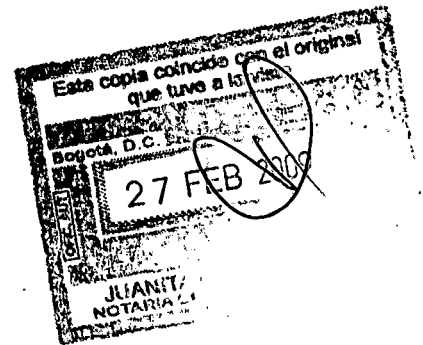
SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.



IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

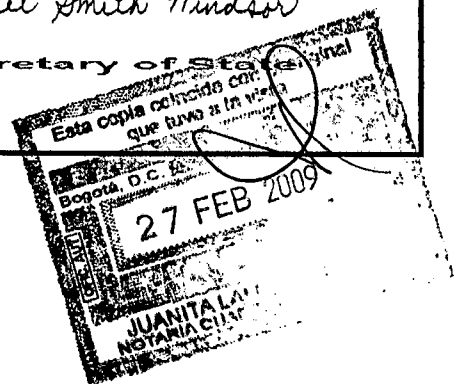
8. No. 0265284

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

PAGE 1

The First State

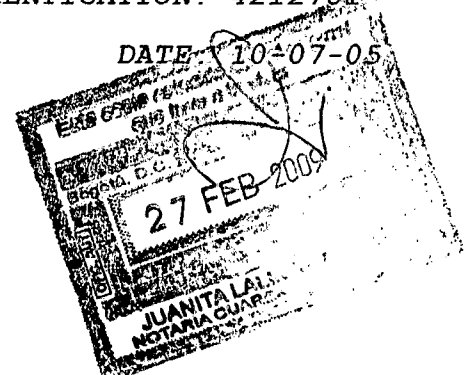
I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.

2112549

050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 4212781



CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

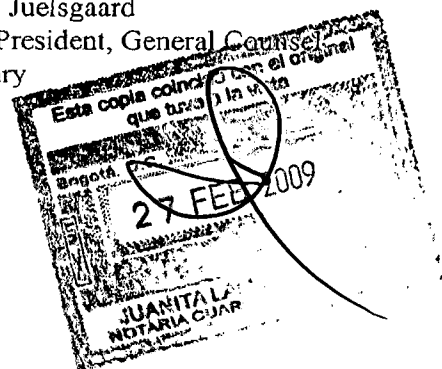
GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

75841



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

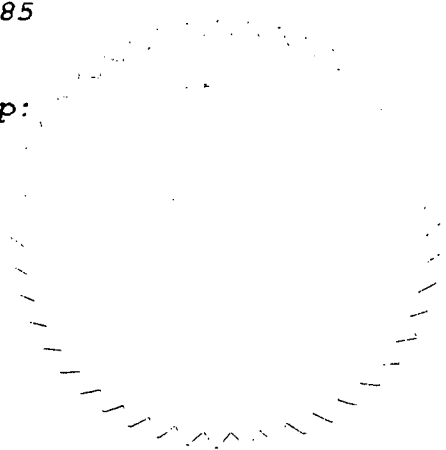
- 1. Country: United States of America
- This public document:
- 2. has been signed by Harriet Smith Windsor
- 3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
- 4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

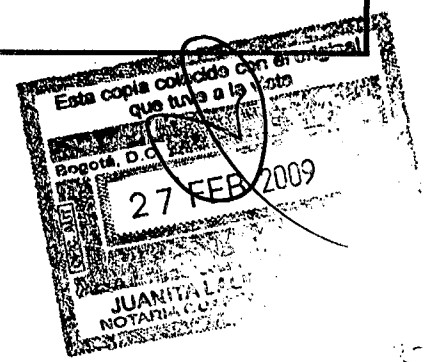
- 5. at Dover, Delaware
- 6. the seventh day of October, A.D. 2005
- 7. by Secretary of State, Delaware Department of State
- 8. No. 0265285

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Harriet Smith Windsor
Secretary of State



Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.

2112549

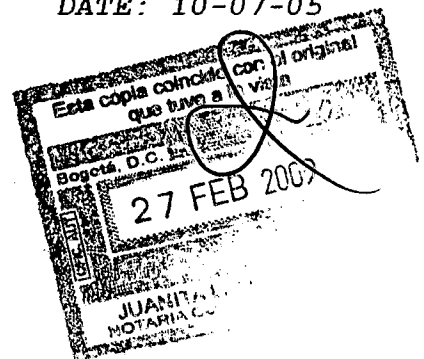
050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 4212782

DATE: 10-07-05



CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

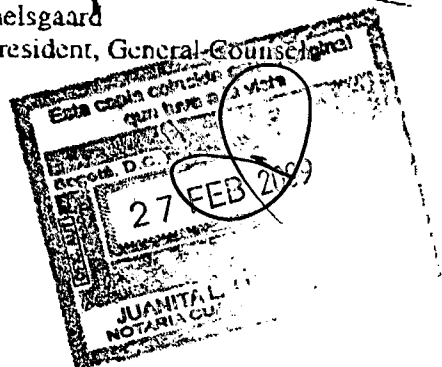
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel and Secretary

80747



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

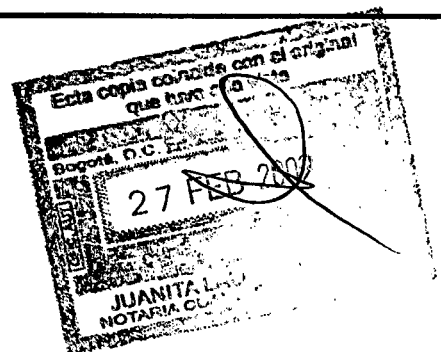
8. No. 0265286

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.

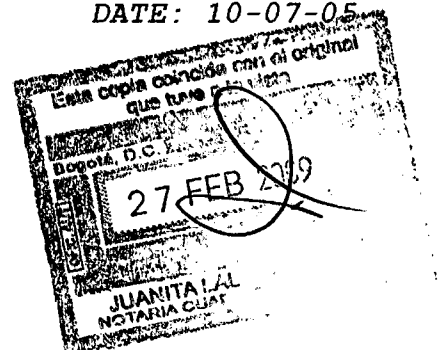
2112549

050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 4212783

DATE: 10-07-05



CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

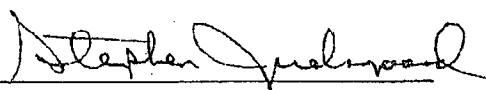
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

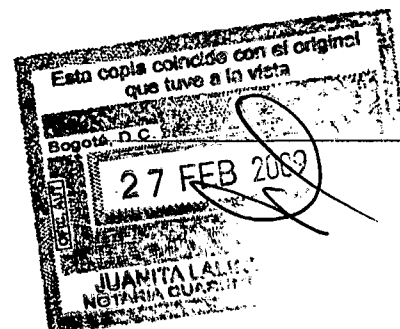
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

GENENTECH, INC.

By: 
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Executive Vice President, General Counsel
and Secretary

#153087



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 16/30	
(22) Fecha de solicitud: 03-04-09		(71) Solicitante(s) GENENTECH, INC.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/863,295	27-10-06	US
	60/868,707	05-12-06	US
	60/921,300	30-03-07	US
	60/937,857	29-06-07	US
		(72) Inventor(es) DENNOS, Mark, S.; RUBINFELD, Bonnee; POLAKIS, Paul y JAKOBOVITS, Aya.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 27-05-09		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 02/05/08	
Fecha de presentación de la solicitud: 26/10/07		N° publicación: WO 2008/052187 A3	
No. de solicitud PCT/US2007/082726			
(54) Titulo: "ANTICUERPOS E INMUNOCONJUGADOS Y SUS USOS"			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1:

Un anticuerpo que se une a STEAP-1, donde el anticuerpo comprende al menos una, dos o tres regiones hipervariables (HVR) de la cadena pesada (HC) seleccionadas entre:

- (1) una HVR-H1 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 14;
- (2) una HVR-H2 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 15; y
- (3) una HVR-H3 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 16.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 03-04-09

(51) Clasificación Internacional : C07K 16/30

(71) Solicitante(s) **GENENTECH, INC.**

(72) Inventor(es) DENNIS, Mark S.; RUBINFELD, Bonnee; POLAKIS, Paul y JAKOBOVITS, Aya

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/863,295	27-10-06	US
	60/868,707	05-12-06	US
	60/921,300	30-03-07	US
	60/937,857	29-06-07	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 27-05-09

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: 26-10-07

No. De solicitud **PCT/US2007/082726**

(87) Publicación internacional

Fecha: 02-05-08

N° publicación: **WO 2008/052187 A3**

(54) Título: : "ANTICUERPOS E INMUNOCONJUGADOS Y SUS USOS"

SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCION

PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD

DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 03-04-09

(51) Clasificación Internacional: C07K 16/30

(71) Solicitante(s) **GENENTECH, INC.**

(72) Inventor(es) DENNIS, Mark S.; RUBINFELD, Bonnee; POLAKIS, Paul y JAKOBOVITS, Aya

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad

(31) *No. Prioridad*

(32) *Fecha*

(33) *País*

60/863,295

27-10-06

US

60/868,707

05-12-06

US

60/921,300

30-03-07

US

60/937,857

29-06-07

US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 27-05-09

(87) Publicación internacional:

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT

Fecha: 02-05-08

Fecha de presentación de la solicitud: 26-10-07

No. Publicación: **WO 2008/052187 A3**

No. de solicitud **PCT/US2007/082726**

(54) Título: **"ANTICUERPOS E INMUNOCONJUGADOS Y SUS USOS"**

(57) Resumen:

Reivindicación número 1:

Un anticuerpo que se une a STEAP-1, donde el anticuerpo comprende al menos una, dos o tres regiones hipervariables (HVR) de la cadena pesada (HC) seleccionadas entre:

(1) una HVR-H1 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 14;

(2) una HVR-H2 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 15; y

(3) una HVR-H3 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 16.

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

HELLER EHRMAN LLP
Attn: Ginger R. Dreger
275 Middlefield Road
Menlo Park, California 94025-3506
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference 39766-0160-R4PCT	Date of mailing (day/month/year) 02/06/2008
International application No. PCT/US2007/082726	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International filing date (day/month/year) 26/10/2007	
Applicant GENENTECH, INC.	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:
The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Reminders**

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Katharina Leineweber
--	--

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 39766-0160-R4 PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2007/082726	International filing date (day/month/year) 26/10/2007	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 27/10/2006
Applicant GENENTECH, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:



the international application in the language in which it was filed



a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐

This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒

With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒

Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐

Unity of invention is lacking (see Box No III)

4. With regard to the **title**,



the text is approved as submitted by the applicant



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,



the text is approved as submitted by the applicant



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this International search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant



as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure



as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☒

none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/082726

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K16/30 A61K47/48	A61K39/395 A61K51/10	A61P35/00 C12N15/13 C12N5/10
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) C07K A61K C12N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/113601 A (AGENSYS INC [US]; JAKOBOVITS AYA [US]; ETESSAMI SOUDABEH [US]; CHALLIT) 1 December 2005 (2005-12-01)	151-203
Y	sequence 56	1-150, 204-224
Y	WO 2006/034488 A (GENENTECH INC [US]; EIGENBROT CHARLES W [US]; JUNUTULA JAGATH REDDY [U] 30 March 2006 (2006-03-30) the whole document	1-150, 204-224
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
E earlier document but published on or after the international filing date		
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
X document 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 document 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, such combination being obvious to a person skilled in the art.		
G document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 March 2008		Date of mailing of the international search report 02/06/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vadot, Pierre

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2007/082726

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☒ filed together with the international application in electronic form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/082726

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: —
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 67-70,136,137,140-142,187,189-191 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/082726

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005113601 A	01-12-2005	AU 2004319915 A1	01-12-2005
		BR PI0418766 A	09-10-2007
		CA 2563735 A1	01-12-2005
		EP 1742966 A2	17-01-2007
WO 2006034488 A	30-03-2006	AU 2005286607 A1	30-03-2006
		CA 2580141 A1	30-03-2006
		EP 1791565 A2	06-06-2007
		KR 20070054682 A	29-05-2007

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
2 May 2008 (02.05.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/052187 A3

(51) International Patent Classification:

C07K 16/30 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61K 51/10* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2007/082726

(22) International Filing Date: 26 October 2007 (26.10.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/863,295	27 October 2006 (27.10.2006)	US
60/868,707	5 December 2006 (05.12.2006)	US
60/921,300	30 March 2007 (30.03.2007)	US
60/937,857	29 June 2007 (29.06.2007)	US

(71) Applicant (*for US only*): **GENENTECH, INC.** [US/US];
1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **DENNIS, Mark**,
S. [US/US]; 120 Plymouth, San Carlos, CA 94070 (US).
RUBINFELD, Bonnee [US/US]; 4186 Quail Run Drive,
Danville, CA 94506 (US). **POLAKIS, Paul** [US/US];
265 West Blithedale Avenue, Mill Valley, CA 94941
(US). **JAKOBOVITS, Aya** [US/US]; 3135 Hutton Drive,
Beverly Hills, CA 90210 (US).

(74) Agents: **DREGER, Ginger, R.** et al.; Goodwin Procter
LLP, 135 Commonwealth Drive, Menlo Park, CA 94025
(US).

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, SI, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, 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:

- 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
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(88) Date of publication of the international search report:
17 July 2008

WO 2008/052187 A3

(54) Title: ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND USES THEREFOR

(57) Abstract: Anti-STLAP-1 antibodies and immunoconjugates thereof are provided. Methods of using anti-STLAP-1 antibodies and immunoconjugates thereof are provided.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2007/082726

International filing date (day/month/year)
26.10.2007

Priority date (day/month/year)
27.10.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

INV. C07K16/30 A61K39/395 A61P35/00 C12N15/13 C12N5/10 A61K47/48 A61K51/10

Applicant
GENENTECH, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Vadot, Pierre

Telephone No. +31 70 340-3968



WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2007/082726

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2007/082726

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application
- ☒ claims Nos. 67-70, 136, 137, 140-142, 187, 189-191

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 67-70, 136, 137, 140-142, 187, 189-191 relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
 - ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See Supplemental Box for further details

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2007/082726

Box No. V Reasoned statement under Rule 43b/s.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-150,204-224</u>
	No: Claims	<u>151-203</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-224</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-66,71-135,138-140,143-186,188,192-224</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. Claims 67-70,136,137,140-142,187,189-191 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1 (iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

2. No International Preliminary Examination will be carried out in respect of subject-matter which is not covered by the search report (Rule 66.1(e) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 2005/113601 A (AGENSYS INC [US]; JAKOBOVITS AYA [US]; ETESSAMI SOUDABEH [US]; CHALLIT) 1 December 2005 (2005-12-01)
- D2: WO 2006/034488 A (GENENTECH INC [US]; EIGENBROT CHARLES W [US]; JUNUTULA JAGATH REDDY [U]) 30 March 2006 (2006-03-30)

5.1 Novelty (Art. 33(2) PCT)

Independent claim 1 is novel since all the sequences are novel. Consequently, all the claims depending on claim 1 are also considered as novel.

Independent claim 12 is also novel for the same reason as for claim 1 (same sequences).

Independent claim 93 : in order to evaluate novelty of claim 93, a clarity problem must be first overcome since HVR-L3 has the same sequence as HVR-L1 : SEQ ID NO 11. But Fig. 2A shows that the sequence is different and consequently, HVR-L3 is defined by SEQ ID NO 13 : the search has been done with HVR-L3 being defined by sequences ID NO 13. Claim 93 is acknowledged as novel since even if SEQ ID NO 11

is already known (see SEQ ID NO 56 of WO2005113601), this sequence is not known in a cysteine engineered anti STEAP-1 antibody.

Independent claim 151 is not novel since SEQ ID NO 11 is not novel (see SEQ ID NO 56 of WO2005113601 which discloses an anti STEAP-1 antibody). All the claims 152-203 dependent on claim 151 are also considered as not novel.

Independent claims 204 and 206 dealing with SEQ ID NO: 90-101 are considered as novel.

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 151-203 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

5.2 Inventive step (Art. 33(3) PCT)

Document D1 (WO2005113601) is considered as the closest prior art document.

The difference between D1 and the present application is that another antibody against STEAP-1 is claimed.

The effect of this difference is not known.

The problem can therefore be formulated as the provision of further alternative antibodies against STEAP-1.

The solution is found in claim 93 ie both of CDRs of the HC and LC are claimed in the same claim.

This solution cannot be acknowledged as inventive under art 33(3) PCT since a mere alternative of an antibody against a known antigen does not comprise the use of inventive skills.

The cysteine engineered anti-STEAP-1 antibody is a mere alternative form of antibody which is already well known in the antibody field (see document D2).

Unless the Applicant is able to show unexpected properties linked to the claimed antibody, the present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-224 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

5.3 Claims 67-70,136,137,140-142,187,189-191 relate to a subject-matter considered

by this Authority to be covered by the provision of Rule 39.1(iv)/67.1(iv) PCT.
The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims 67-70, 136, 137, 140-142, 187, 189-191 to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for in a first or further medical treatment.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

Clarity, conciseness and support (Art. 6 EPC)

8.1 Claim 1 defines an antibody by its specificity and one, two or three HC of the HVRs. but it is clear through the examples that it is only an entire antibody (ie the 3 CDRs of the light chain AND the 3 CDRs of the heavy chain) which is responsible of the effect ie binding to STEAP-1. Therefore, claim 1 lacks of support and must be only defined by the association of both the three CDRs of the light and heavy chains. The same reasoning is kept to independent claims 151, 204, 206.

8.2 Claims 5 and 6 define the HC with at least 90% of identity to SEQ ID Nos: 9 or 10. It is well known in the antibody field that the change of only 1 amino acid in a sequence of an antibody can have detrimental effects such as the loss of the specificity. Therefore, the HC cannot be defined by a % of identity but only by the SEQ ID Nos 9 or 10.

8.3 Claim 15 refers back to claim 12 but should refer back to claim 14 dealing with a vector.

8.4 Dependent claims 15, 208 relate to the use of "host", therefore encompassing the use of cells originating from human embryos as well as human or animal body for industrial and/or commercial purposes.

Applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the regional phase, patentability of claims relating to human embryos as well as human or animal body may underlie restrictions based on moral grounds. The EPO, for example, does not recognize as patentable the subject-matter of claims to the cloning of human beings, the modification of the germ line identity of human beings and the use of human embryos as well as the use of human or animal body for industrial or commercial purposes (Article 53(a) and Rule 23d EPC).

8.5 Claim 18 refers to a method of making an anti STEAP-1 antibody using the host cell of claim 15 which finally refers to claim 12 defining the HC-HVRs. For the same reasoning as in present objection 8.1, the method of making an antibody of claim 18 lacks of support : claim 18 only refers to one, or two or three HC HVRs instead of referring to three HC and HL HVRs. The same applies for claims 211.

8.6 Claim 19 refers to claim 1, thus further defining the antibody of claim 1. But as it stands, claim 19 says that STEAP-1 is expressed on the surface of a cell. This technical feature is useless for the definition of the antibody of claim 1 and on contrary, it brings unclarity : it seems that the antibody would be rather defined by its production process. Claims 19 and claims dependent thereon are not clear under Art. 6 PCT. The same objection applies for claim 212.

8.7 Claims 26 and 27 refer to claim 60; such clerical error must be corrected.

8.8 Claim 28 lacks of support since the method of detecting the present of STEAP-1 encompasses every kind of biological sample (ie urine) but it is clear that only sample from tissues is suitable since the antigen is a membrane antigen; it seems that no soluble antigen exists. A restriction to tissue sample is requested under Art. 6 PCT. The same objection is valid for claim 109,162,220.

8.9 Claim 67 generalises the use of the immunoconjugate to all cell proliferative disorders, but the examples are clearly limited to prostate cancer. The limitation must be accordingly done. The same objection applies to claims 136-137, 140-144, claims 189-193.

8.10 Claims 73 and 74 are defined with the help of unclear terms : " ... a thiol reactivity value..." and "... the cysteine engineered antibody is more reactive...". Indeed, the terms can be understood in many different ways since "reactive" is not linked to specific features, neither " a thiol reactivity value" (Art. 6 PCT). In the same way, claim 73 encompasses a process which seems to be needed to define the antibody of claim 1. Claim 75 further details the determination of the "thiol reactivity of the cysteine engineered antibody" whereas claim 73 already gives this value. This is not coherent : giving first the value and then way to determine this value (Art. 6 PCT).

8.11 Claim 87 : the term "antibody" is miswritten.

8.12 Claim 93 is not allowable since the antibody can be defined only by at least one HVR which is contrary to the reasoning given in objection 8.1. Further on, claim 93 is defined as a desiderata claim and is not allowable : indeed, only certain positions have been engineered to cysteins and it is well known that not every positions are available for such mutations as for instance all the positions of the CDRs (which allow the antibody to be defined). Therefore, a limitation to the mutations permitting the specificity of the antibody to be kept must be introduced (LC-V205C or HC-A118C or Fc-S400C) (Art. 6 PCT). The same reasoning applies for claims 96 and 98 (which depends on claim 1), and claim 152.

8.13 Claim 143 defines an article of manufacture. Surprisingly, it encompasses a compound that can be used to treat cancer characterized by the overexpression of a STEAP-1 polypeptide. The term "overexpression" seems to be essential since if STEAP-1 is not overexpressed, then the immunoconjugate is not active. Since this feature depends only on the antibody, the term "overexpression" must be present in each independent claims defining the antibody (Art. 6 PCT). the same applies to claim 192.

8.14 Claim 145 refers to claim 1 as being a cysteine engineered anti-STEAP-1 antibody, but claim 1 does not define a cysteine engineered anti STEAP-1 antibody. Claim 145 must be accordingly corrected.

8.15 Claim 164 lacks of support since the examples only rely on prostate cancer cell and are silent over B cell. The same applies to claims 186,187,189-191.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

RESUMEN, OBJTO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

ANTICUERPOS E INMUNOCONJUGADOS Y SUS USOS

- 5 Se proporcionan anticuerpos anti-STEAP-1 y sus inmunoconjugados. Se proporcionan métodos de uso de los anticuerpos anti-STEAP-1 y de sus inmunoconjugados.

ANTICUERPOS E INMUNOCONJUGADOS Y SUS USOS

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se relaciona con los anticuerpos anti-STEAP-1 y sus inmuoconjugados. La invención se refiere además, a los métodos de utilización de los anticuerpos anti-STEAP-1 y de sus inmuoconjugados.

ANTECEDENTES

[0002] En los seres humanos, el cáncer de próstata es uno de los tumores malignos de diagnóstico más común en los hombres; ocupa el segundo lugar entre las principales causas de muerte por cáncer en los hombres. Según las estimaciones de la American Cancer Society, durante el año 2000 se diagnosticaron 180.400 casos nuevos de cáncer de próstata con el resultado de 31.900 muertes a causa de la enfermedad. En las fases avanzadas, el cáncer de próstata provoca metástasis óseas. Aunque se han logrado avances en el diagnóstico precoz y el tratamiento de los tumores localmente limitados, el cáncer de próstata es incurable una vez que ha hecho metástasis. Los pacientes con cáncer de próstata metastásico sometidos a terapia hormonal terminarán por desarrollar un estado refractario al andrógeno (andrógeno independiente) que conducirá a la progresión de la enfermedad y a la muerte. En la actualidad, el antígeno específico de la próstata (PSA) es el marcador tumoral de uso más generalizado para la exploración, el diagnóstico y el control del cáncer de próstata. No obstante, el uso generalizado del PSA como una herramienta para la exploración es controvertido puesto que el PSA no logra discriminar exactamente entre tumor prostático benigno y maligno.

[0003] Según la fase del cáncer, el tratamiento contra el cáncer de próstata y de vejiga implica una de las siguientes terapias o una combinación de las mismas: cirugía para extirpar el tejido canceroso, radioterapia, quimioterapia, privación de andrógeno (p.ej., terapia hormonal) en el caso del cáncer de próstata. Aunque la cirugía y la radioterapia mejoran significativamente la supervivencia en los pacientes que se hallan en las primeras fases de la enfermedad, las opciones terapéuticas son muy limitadas cuando se trata de casos avanzados, en particular en la recurrencia de tumores después de la supresión hormonal. La mayoría de los pacientes sometidos a terapia hormonal evolucionan hacia el desarrollo de un tumor andrógeno independiente. En la actualidad no existe ningún tratamiento eficaz para el 20-40% de los pacientes con cáncer de próstata que desarrollan un tumor recurrente después de la cirugía o la radioterapia, o para quienes presentaban un cáncer con metástasis en el momento del diagnóstico. La quimioterapia tiene efectos secundarios tóxicos, especialmente en los pacientes de mayor edad. El desarrollo de nuevas formas de terapia, especialmente para los tumores refractarios a la privación de andrógeno, es una necesidad urgente para el tratamiento del carcinoma prostático.

[0004] Ha sido descrita (véase Patente de EE.UU. Nº 6.329.503) la identificación un nuevo antígeno de superficie celular, STEAP-1. STEAP-1 forma parte de los antígenos de superficie celular de dominio transmembrana que configuran una serpentina. Se expresa predominantemente en el cáncer de próstata y por ese motivo los miembros de esa familia reciben la denominación de "STEAP" (Six Transmembrane Epithelial Antigens of the Prostate – Seis antígenos epiteliales transmembranos de la próstata). Las proteínas STEAP humanas presentan un elevado grado de conservación estructural dentro de la familia, pero no muestran ninguna homología estructural significativa con ninguna proteína conocida. La STEAP-1 parece ser un tipo de proteína IIIa de membrana que se expresa predominantemente en las células prostáticas en tejidos humanos normales. Estructuralmente, la STEAP-1 es una proteína aminoácida 339 caracterizada por una topología molecular de seis dominios de transmembrana y terminales intracelulares N- y C-, lo cual indica que se enrolla en forma de "serpentina" en tres bucles extracelulares y dos intracelulares. La expresión de la proteína STEAP-1 se mantiene a niveles elevados a través de los distintos estados del cáncer de próstata. La STEAP-1 tiene una sobreexpresión elevada en otros cánceres humanos, como el de pulmón y el de colon. Se cultivaron anticuerpos murinos para los fragmentos de STEAP-1 humanos y los anticuerpos mostraron unirse a la STEAP-1 sobre la superficie celular (véase Solicitud de Patente de EE.UU. Nº 20040253232A1).

[0005] La terapia basada en anticuerpos se ha revelado muy eficaz en el tratamiento de distintos tipos de cáncer. Por ejemplo, HERCEPTIN® y RITUXAN® (ambos de Genentech Inc., South San Francisco, California) son anticuerpos que se han utilizado con éxito para el tratamiento del cáncer de mama y del linfoma no Hodgkin, respectivamente. HERCEPTIN® es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente al dominio extracelular del protooncogén del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). En el 25-30% de los cánceres primarios de mama se observa una sobreexpresión de la proteína del HER2. RITUXAN® es un anticuerpo monoclonal quimérico humano/murino creado mediante ingeniería genética y dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de linfocitos B malignos y normales. Estos dos anticuerpos se producen en células CHO.

[0006] El uso de anticuerpos conjugados con fármacos para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, los fármacos que se utilizan para matar o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26: 151-172; patente de EE. UU. n.º 4975278), permite la administración de la fracción de fármacos a tumores y una acumulación intracelular en éstos, donde la administración sistemática de estos agentes farmacológicos no conjugados puede resultar en niveles inaceptables de toxicidad tanto para las células normales como para las células tumorales que se intentan eliminar (Baldwin y col., (1986) *Lancet* págs. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers

Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera y col. (eds), págs. 475-506). Se busca entonces la máxima eficacia con la mínima toxicidad. Tanto los anticuerpos monoclonales como los policlonales se han descrito como útiles en estas estrategias (Rowland y col., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Los fármacos empleados en estos métodos incluyen a la daunomicina, la doxorubicina, el metotrexato y la vindesina (Rowland y col., *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-87 (1986)). Entra las toxinas empleadas en anticuerpos conjugados con toxinas se encuentran las toxinas bacterianas como la toxina de la difteria, toxinas vegetales como la ricina, toxinas de pequeñas moléculas como la geldanamicina (Kerr y col., (1997) *Bioconjugate Chem.* 8(6):781-784; Mandler y col., (2000) *Journal of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler y col., (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler y col., (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (patente europea n.º EP 1391213; Liu y col., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) y caliqueamicina (Lode y col. (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman y col., (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Las toxinas pueden producir sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen la unión de tubulina, la unión de ADN o la inhibición de la topoisomerasa (Meyer, D.L. y Senter, P.D. "Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy" en *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Vol 38 (2003) Capítulo 23, 229-237). Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con grandes anticuerpos o ligandos receptores de proteínas.

[0007] ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un anticuerpo conjugado con un radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 murino dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de los linfocitos B cancerígenos y normales, y contra el radioisótopo ¹¹¹In o ⁹⁰Y unido por un quelante enlazador de tiourea (Wiseman y col., (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman y col., (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig y col., (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig y col., (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). A pesar de que el ZEVALIN presenta actividad contra las células B del linfoma no Hodgkin (LNH), su administración provoca citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (Gentuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpos y fármacos compuesto de un anticuerpo huCD33 enlazado a caliqueamicina, se aprobó en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda por inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25(7): 686; Patentes de EE.UU. N.º 4.970.198; 5.079.233; 5.585.089; 5.606.040; 5.693.762; 5.739.116; 5.767.285; 5.773.001). Cantuzumab mertansina (Inmugen, Inc.), un anticuerpo conjugado con un fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 enlazado a la fracción de fármacos de los maitansinoides por medio de un enlazado de disulfuro SPP, DM1, está desarrollado para el tratamiento de cánceres que expresan el antígeno CanAg, tales como los de colon, páncreas, gástricos y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un anticuerpo conjugado con un fármaco, compuesto por el anticuerpo monoclonal del antígeno de membrana antiprostático (PSMA) enlazado al

grupo de los maitansinoides, DM1, está en fase de desarrollo para el tratamiento potencial de los tumores de próstata. La misma fracción de fármacos de los maitansinoides, DM1, se unió mediante un enlazador no disulfuro, SMCC, a un anticuerpo monoclonal murino, TA.1 (Chari y col., (1992) *Cancer Research* 52:127-131). Se informó que dicho conjugado es 200 veces menos potente que el correspondiente conjugado del enlazador de disulfuro. En la presente memoria descriptiva, el enlazado SMCC se consideró "no escindible".

[0008] Se aislaron varios compuestos peptídicos cortos del molusco marino, *Dolabella auricularia*, y se descubrió que tenían actividad biológica (Pettit y col., (1993) *Tetrahedron* 49:9151; Nakamura y col., (1995) *Tetrahedron Letters* 36:5059-5062; Sone y col., (1995) *Journal Org Chem* 60:4474). También se prepararon análogos de estos compuestos y se descubrió que algunos tenían actividad biológica (para su reseña, véase Pettit y col., (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277). Por ejemplo, la auristatina E (patente de EE.UU. N.º 5635483) es un análogo sintético del producto natural marino dolastatina 10, un agente que inhibe la polimerización de la tubulina al unirse al mismo punto en la tubulina que en la vincristina con acción antineoplásica (G. R. Pettit, (1997) *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 70:1-79). La dolastatina 10, auristatina PE y auristatina E son péptidos lineales que tienen cuatro aminoácidos, tres de los cuales son únicos de la clase de compuestos de la dolastatina, y una amida C-terminal.

[0009] Los péptidos auristatina, la auristatina E (AE) y la monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, se conjugaron a: (i) anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas); (ii) cAC10 que es específico para CD30 en tumores hematológicos (Klussman, y col., (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4):765-773; Doronina y col., (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"; Francisco y col., (2003) *Blood* 102(4):1458-1465; patente de EE.UU. N.º 2004/0018194; (iii) anticuerpos anti-CD20 tal como Rituxan® (rituximab) (documento WO 04/032828) para el tratamiento de células tumorales que expresan CD20 y trastornos inmunitarios; (iv) anticuerpos 2H9 anti-EphB2 y anti-IL-8 para el tratamiento del cáncer colorrectal (Mao, y col., (2004) *Cancer Research* 64(3):781-788); (v) anticuerpo E-selectina (Bhaskar y col., (2003) *Cancer Res.* 63:6387-6394) y (vi) otros anticuerpos anti-CD30 (documento WO 03/043583). La monometilauristatina (MMAE) también se conjugó con 2H9, un anticuerpo contra EphB2R que es un receptor de tirosina quinasa TM tipo 1 con una homología cercana entre el ratón y el humano, y se sobreexpresa en las células cancerígenas colorrectales (Mao y col., (2004) *Cancer Res.* 64:781-788).

[0010] Se informó que la monometilauristatina MMAF, una variante de la auristatina E (MMAE) con una fenilalanina en C-terminal (patente de EE.UU. N.º 5767237; patente de EE.UU. N.º 6124431), es menos potente que la MMAE, sin embargo, es más potente cuando se conjugó con anticuerpos monoclonales (Senter y col., *Proceedings for the American Association for Cancer Research*, Volumen 45,

Abstract Number 623, presentado el 28 de marzo de 2004). El fenileno diamina auristatina F (AFP), una variante fenilalanina de MMAE que se unió al anti-CD70 mAb, 1F6, a través del C-terminal de 1F6 mediante un separador de fenileno diamina (Law y col., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volumen 45, Abstract Number 625, presentado el 28 de marzo de 2004).

5 [0011] En la materia existe la necesidad de otros fármacos para tratar diversos cánceres, como por ejemplo cánceres y metástasis de cánceres en la próstata, pulmón y colon. Los fármacos especialmente útiles para este fin incluyen los conjugados de anticuerpos anti-STEAP-1 con fármacos que actúan sobre las células de próstata, pulmón o colon y que tienen una toxicidad considerablemente baja pero con una eficacia terapéutica útil. Estas y otras limitaciones y problemas del pasado se tratan en la presente
10 invención.

[0012] El recitado de las referencias en la presente solicitud no representa una admisión de que la referencia es un conocimiento en la materia anterior a esta solicitud. Todas las referencias citadas en la presente memoria descriptiva, incluyendo las patentes, las solicitudes de patentes y publicaciones, quedan incorporadas únicamente a modo de referencia.

15 RESUMEN

[0013] La invención proporciona anticuerpos anti-STEAP-1 y sus métodos de utilización.

20 [0014] En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a STEAP-1, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprenda la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2A (identificador de secuencia n.º: 6 - ID. SEC. N.º6) o un dominio variable de cadena pesada que comprenda la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2B (identificador de secuencia n.º: 9 - ID. SEC. N.º9). En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a STEAP-1, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprenda la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2A (identificador de secuencia n.º: 6) y un dominio variable de cadena pesada que comprenda la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 2B (identificador de secuencia n.º: 9)

30 [0015] En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a STEAP-1, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada con al menos un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identificador de la secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 9 ó 10. En una forma de realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada de identificador de secuencia n.º 9 ó 10. En una realización, el anticuerpo comprende una región estructural de dominio variable de cadena pesada 1 de ID. SEC. N.º 25 o una región estructural de dominio variable de cadena pesada 2 de ID. SEC. N.º 75 ó 76 ó 77 o una región estructural de dominio variable de cadena pesada 3 de ID. SEC. N.º 78 ó 79.

[0016] En un aspecto, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identificador de la secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 6. En una forma de realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera de identificador de secuencia n.º 6.

- 5 [0017] En un aspecto, se ofrece un anticuerpo que se une a STEAP-1, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de la identidad de secuencia de una secuencia de aminoácido de ID. SEC. N° 9 ó 10. En una realización el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada de ID. SEC. N° 9 ó 10. En una realización, el anticuerpo comprende una región estructural de dominio variable de cadena pesada 1 de ID. SEC. N° 25 o una región estructural de dominio variable de cadena pesada 2 de ID. SEC. N° 75 ó 76 ó 77 o una región estructural de dominio variable de cadena pesada 3 de ID. SEC. N° 78 ó 79. En una forma de realización, el anticuerpo también comprende un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identificador de la secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 6. En una forma de realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera de identificador de secuencia n.º 6.

- [0018] En ciertas formas de realización, se proporciona un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos anteriores. En una forma de realización, se proporciona un vector que comprende el polinucleótido. En una forma de realización, se proporciona un anfitrión celular que comprende el vector. En una forma de realización, el anfitrión celular es una célula eucariótica. En una forma de realización, el anfitrión celular es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En una forma de realización, se proporciona un método de fabricación de un anticuerpo anti-STEAP-1, en la que el método comprende el cultivo del anfitrión celular en condiciones aptas para la expresión del polinucleótido que codifica el anticuerpo y el aislamiento del anticuerpo.

- 25 [0019] En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a STEAP-1 expresado en la superficie de una célula. En una forma de realización, el anticuerpo se une a un epítipo en la región del STEAP-1 humano o de ratón. En una forma de realización, la célula es una célula mamífera. En una forma de realización, la célula es una célula humana. En una forma de realización, la célula es una célula cancerosa. En una forma de realización, la célula es una célula de próstata, pulmón o colon. En una forma de realización, la célula cancerosa es una célula de cáncer de próstata. En otra realización, la célula procede de una metástasis de un cáncer primario de próstata, pulmón o colon.

[0020] En ciertas formas de realización, cualquiera de los anticuerpos anteriores es un anticuerpo monoclonal. En una forma de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre

el fragmento Fab, Fab' -SH, Fv, scFv o (Fab')₂. En una forma de realización, el anticuerpo es humanizado. En una forma de realización, el anticuerpo es humano.

[0021] En un aspecto, se proporciona un método de detección de la presencia de STEAP-1 en una muestra biológica y dicho método comprende establecer el contacto de la muestra biológica con cualquiera de los anticuerpos anteriores en condiciones que faciliten la unión del anticuerpo a STEAP-1 y detectar si un complejo está formado por el anticuerpo y STEAP-1. En una forma de realización, la muestra biológica comprende las células de próstata. En una forma de realización, la muestra biológica se obtiene de un mamífero que experimenta o se cree que experimenta un trastorno de células de próstata o un trastorno proliferativo de células o tejidos, o ambos, incluyendo, entre otros, cáncer de próstata, pulmón, colon, vejiga y ovario y sarcoma de Ewing, así como, metástasis cánceres primarios de próstata, pulmón, colon, vejiga y ovario y sarcoma de Ewing. Véase, por ejemplo, (véase la patente de EE.UU. nº 6.329.503; y Rodeberg, D.A. y col., Clin. Cancer Res. 11(12):4545-4552 (2005)).

[0022] En un aspecto, se proporciona un método de diagnóstico de un trastorno de proliferación celular asociado a un aumento de la expresión de STEAP-1. Este método comprende establecer un contacto entre una célula de prueba y cualquiera de los anticuerpos anteriores, determinar el nivel de expresión de STEAP-1 mediante la detección de la unión del anticuerpo a STEAP-1 y comparar el nivel de expresión de STEAP-1 mediante la célula de prueba con el nivel de expresión de STEAP-1 mediante una célula de control, donde un nivel más elevado de expresión de STEAP-1 mediante la célula de prueba frente a la célula de control indica la presencia de un trastorno de proliferación celular asociado a un aumento de la expresión de STEAP-1. En una forma de realización, la célula de prueba es una célula de un paciente que se cree que padece un trastorno de proliferación celular tal como el trastorno proliferativo de próstata. En una forma de realización, el trastorno proliferativo se selecciona a partir de los trastornos de células de próstata que incluyen, entre otros, cáncer de próstata. En una forma de realización, el método comprende la determinación del nivel de expresión de STEAP-1 en la superficie de la célula de prueba (como, por ejemplo, una célula de cancer de próstata) y la comparación del nivel de expresión de STEAP-1 en la superficie de la célula de prueba con el nivel de expresión de STEAP-1 en la superficie de la célula de control (como, por ejemplo, una célula de próstata normal distinta de una célula de próstata anormalmente proliferativa).

[0023] En un aspecto, se proporciona un método de diagnóstico de un trastorno de proliferación celular asociado a un aumento de células, tales como las células próstata, que expresan STEAP-1. Este método comprende establecer un contacto entre células de prueba en una muestra biológica y cualquiera de los anticuerpos anteriores, determinar el nivel de unión del anticuerpo a células de prueba en la muestra mediante la detección de la unión del anticuerpo a STEAP-1 y comparar el nivel de unión del anticuerpo a las células en una muestra de células de control, donde el nivel de unión del anticuerpo se normaliza a la

cantidad de células que expresan STEAP-1 en las muestras de células de prueba y de control, y en donde el nivel más elevado de unión del anticuerpo en la muestra de células de prueba comparado con la muestra de células de control indica la presencia de un trastorno de proliferación celular asociado a células que expresan STEAP-1.

- 5 **[0024]** En un aspecto, se proporciona un método de detección de STEAP-1 soluble en la sangre o el suero. Este método comprende establecer el contacto entre una muestra de prueba de sangre o suero de un mamífero que se cree que experimenta un trastorno proliferativo de células próstata con un anticuerpo anti-STEAP-1 de la invención, y detectar un aumento en el STEAP-1 soluble en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control de sangre o suero de un mamífero normal. En una forma de realización, el
- 10 método de detección es útil como método de diagnóstico de trastornos proliferativos de células próstata asociados a un aumento de STEAP-1 soluble en la sangre o el suero de un mamífero.

- [0025]** En un aspecto, los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos diseñados con cisteína en donde se reemplazan uno o más aminoácidos de un anticuerpo parental con un aminoácido de cisterna libre, tal como se describe en el documento WO2006/034488 (íntegramente incorporado en la presente memoria descriptiva a modo de referencia). Un anticuerpo diseñado con cisteína comprende uno o más
- 15 aminoácidos de cisteína libre con un valor de reactividad del tiol en un rango de entre 0,6 y 1,0. Un aminoácido de cisteína libre es un residuo de cisteína que se ha diseñado en anticuerpo parental y no forma parte de un enlace disulfuro. Los anticuerpos diseñados con cisteína son útiles para la unión de compuestos citotóxicos o de imágenes, o ambos, en una posición de la cisteína diseñada mediante, por ejemplo, una
- 20 maleimida o un haloacetil. La reactividad nucleofílica de la funcionalidad tiol de un residuo cis con un grupo maleimido es aproximadamente 1000 veces mayor en comparación con cualquier otra funcionalidad aminoácida en una proteína, como por ejemplo, el grupo amino de residuos de lisina o el grupo amino N terminal. La funcionalidad tiol específica en los reactivos iodoacétilos y maleimidos puede reaccionar con grupos aminos, sin embargo, se requieren tiempos de reacción mayores a pH (>9,0) y más prolongados
- 25 (Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London).

- [0026]** Los anticuerpos diseñados con cisteína pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer e incluir anticuerpos específicos para la superficie celular y los receptores transmembranales, y antígenos asociados al tumor (AAT). Estos anticuerpos pueden utilizarse como anticuerpos desnudos (no conjugados con una fracción de fármacos o marcas) o como anticuerpos conjugados con fármacos (ADC). Los
- 30 anticuerpos de la invención diseñados con cisteína pueden ubicarse específicamente o acoplarse eficazmente con un reactivo del tiol. El reactivo del tiol puede ser un reactivo enlazador multifuncional, un reactivo de captura marcado, un reactivo fluoróforo o un enlazador a fármacos intermedio. El anticuerpo diseñado con cisteína puede marcarse con una marca detectable, inmovilizarse en un soporte de fase sólida o conjugarse con una fracción de fármacos, o todas las anteriores. La reactividad del tiol puede

generalizarse en cualquier anticuerpo, donde la sustitución de aminoácidos por aminoácidos de cisteínas reactivas puede realizarse dentro de los rangos en la cadena ligera seleccionados a partir de los rangos de aminoácidos: de L-10 a L-20, de L-38 a L-48, de L-105 a L-115, de L-139 a L-149, de L-163 a L-173; y dentro de los rangos en la cadena pesada seleccionados a partir de los rangos de aminoácidos: de H-35 a H-45, de H-83 a H-93, de H-114 a H-127 y de H-170 a H-184; y en la región Fc, dentro de los rangos seleccionados de H-268 a H-291, de H-319 a H-344, de H-370 a H-380 y de H-395 a H-405, en el que la numeración de las posiciones de los aminoácidos comienza a partir de la posición 1 del sistema de numeración de Kabat (Kabat y col., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) y continúa secuencialmente a partir de entonces, tal como se describe en el documento WO 2006/034488. La reactividad del tiol también puede generalizarse en determinados dominios de un anticuerpo, como por ejemplo, el dominio constante de la cadena ligera (CL) y los dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Las sustituciones de cisteínas que producen como resultado los valores de reactividad del tiol de 0,6 y mayores pueden realizarse en los dominios constantes de la cadena pesada α , δ , ϵ , γ y μ de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluyendo las subclases IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Estos anticuerpos y sus usos se describen en el documento WO 2006/034488.

[0027] Los anticuerpos de la invención diseñados con cisteína conservan preferentemente la capacidad de unión al antígeno de los homólogos anticuerpos parentales de tipo natural. Por lo tanto, los anticuerpos diseñados con cisteína son capaces de unirse específica y preferentemente con antígenos. Dichos antígenos incluyen, por ejemplo, antígenos asociados al tumor (AAT), proteínas de los receptores de la superficie celular y otras moléculas de la superficie celular, proteínas transmembranas, proteínas de señalización, factores reguladores de la supervivencia celular, factores reguladores de la proliferación celular, moléculas asociadas al (por ejemplo, que se sabe o se cree que contribuyen de manera funcional al) desarrollo o diferenciación del tejido, linfoquinas, citoquinas, moléculas implicadas en la regulación del ciclo celular o en la vasculogénesis y moléculas asociadas a (por ejemplo, que se sabe o se cree que contribuyen de manera funcional a) la angiogénesis.

[0028] Un anticuerpo de la invención puede conjugarse a otros agentes reactivos del tiol en los que el grupo reactivo es, por ejemplo, un maleimido, una iodoacetamida, un piridil disulfuro u otra molécula de conjugación de los reactivos del tiol (Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Hermanson, G. en *Bioconjugate Techniques* (1996) Academic Press, San Diego, págs. 40-55, 643-671). La molécula puede ser un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina tal como la doxorrubicina o toxina pertussis), un fluoróforo tal como un tinte fluorescente como la fluoresceína o rodamina, un agente

quelante de metales para la radioterapia o en diagnóstico por imágenes, una marca peptídil o no peptídil o una marca de detección, o un agente modificador de la eliminación como por ejemplo muchos isómeros del polietilenglicol, un péptido que se une a un tercer componente u otro carbohidrato o agente lipofílico.

[0029] En un aspecto, los anticuerpos de la invención pueden conjugarse con cualquier grupo de marcas que pueda unirse covalentemente al anticuerpo a través de un grupo reactivo, un grupo activo o un grupo tiol de cisteína reactivo (Singh y col., (2002) *Anal. Biochem.* 304:147-15; Harlow E. y Lane, D. (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) *Chemical Reagents for Protein Modification*, 2.^a ed. CRC Press, Boca Raton, FL). La marca unida puede: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con una segunda marca para modificar la señal detectable que proporcionó la primera o la segunda marca, por ejemplo, para brindar FRET (transferencia resonante de energía de fluorescencia); (iii) estabilizar las interacciones o aumentar la afinidad de unión con un antígeno o ligando; (iv) afectar la movilidad, como por ejemplo, la movilidad electroforética o la permeabilidad celular mediante la carga, hidrofobicidad, forma u otros parámetros físicos; o (v) proporcionar el grupo de captura para modular la afinidad del ligando, la unión antígeno-anticuerpo o la formación de complejos iónicos.

[0030] Los anticuerpos diseñados con cisteína y marcados pueden ser útiles en los ensayos de diagnóstico, por ejemplo, para detectar la expresión de un antígeno de interés en células, tejidos o sueros específicos. Para las aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo generalmente se marcará con un grupo detectable. Se dispone de numerosas marcas que pueden agruparse, por lo general, en las siguientes categorías:

[0031] Radioisótopos (radionucleidos) tales como ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At o ^{213}Bi . Los anticuerpos marcados con radioisótopos son útiles en los experimentos de diagnóstico por imágenes que actúan sobre el receptor. El anticuerpo puede marcarse con reactivos ligandos que unen agentes quelantes de metales u otros complejos para el radioisótopo, donde el agente es reactivo con el tiol diseñado con cisteína del anticuerpo, mediante las técnicas que se describen en *Current Protocols in Immunology*, Volúmenes 1 y 2, Coligen y col., Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991). Los ligandos quelantes que pueden combinar un metal ion incluyen DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA (Macrocyclics, Dallas, TX). Los radionucleidos pueden indicarse a través de la formación de complejos con anticuerpos de la invención conjugados con fármacos (Wu y col., (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146).

[0032] Los reactivos enlazadores tales como el maleimido-DOTA (4-maleimidobutiramidobenzilo-DOTA) pueden prepararse mediante la reacción del aminobenzilo-DOTA con el ácido 4-maleimidobutírico (Fluka) activado con formatocloroisopropil (Aldrich), siguiendo el procedimiento de Axworthy y col., (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(4):1802-1807). Los agentes

reactivos maleimido-DOTA reaccionan con los aminoácidos de cisteína libre de los anticuerpos diseñados con cisteína y proporcionan un ligando de formación de complejos de metal en el anticuerpo (Lewis y col., (1998) *Bioconj. Chem.* 9:72-86) Los reactivos de marcación con enlazadores quelantes tales como DOTA-NHS (1, 4, 7, 10-tetraazaciclododecano- 1, 4, 7, 10-monoácido tetraacético (éster de N-hidroxisuccinimida) se encuentran comercialmente disponibles (Macrocyclics, Dallas, TX). La imagen que actúa sobre el receptor con los anticuerpos marcados con radionucleidos puede proporcionar un marcador de una vía de activación mediante la detección y cuantificación de la acumulación progresiva de anticuerpos en el tejido tumoral (Albert y col., (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:1207-1210). Los radiometales conjugados pueden permanecer intracelulares después de la degradación lisosomal.

[0033] Los complejos quelantes de metales que sirven como marcas de anticuerpos para los experimentos de diagnóstico por imágenes se describen en: patente de EE.UU. N.º 5.342.606; patente de EE.UU. N.º 5.428.155; patente de EE.UU. N.º 5.316.757; patente de EE.UU. N.º 5.480.990; patente de EE.UU. N.º 5.462.725; patente de EE.UU. N.º 5.428.139; patente de EE.UU. N.º 5.385.893; patente de EE.UU. N.º 5.739.294; patente de EE.UU. N.º 5.750.660; patente de EE.UU. N.º 5.834.456; Hnatowich y col., (1983) *J. Immunol. Methods* 65:147-157; Meares y col., (1984) *Anal. Biochem.* 142:68-78; Mirzadeh y col., (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:59-65; Meares y col., (1990) *J. Cancer* 1990, Suppl. 10:21-26; Izard y col., (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:346-350; Nikula y col., (1995) *Nucl. Med. Biol.* 22:387-90; Camera y col., (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:955-62; Kukis y col., (1998) *J. Nucl. Med.* 39:2105-2110; Verel y col., (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Camera y col., (1994) *J. Nucl. Med.* 21:640-646; Ruegg y col., (1990) *Cancer Res.* 50:4221-4226; Verel y col., (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Lee y col., (2001) *Cancer Res.* 61:4474-4482; Mitchell y col., (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1105-1112; Kobayashi y col., (1999) *Bioconjugate Chem.* 10:103-111; Miederer y col., (2004) *J. Nucl. Med.* 45:129-137; DeNardo y col., (1998) *Clinical Cancer Research* 4:2483-90; Blend y col., (2003) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 18:355-363; Nikula y col., (1999) *J. Nucl. Med.* 40:166-76; Kobayashi y col., (1998) *J. Nucl. Med.* 39:829-36; Mardirossian y col., (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:65-74; Roselli y col., (1999) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 14:209-20.

(b) Las marcas fluorescentes tales como los quelantes térreos (quelantes europios) poco frecuentes, los tipos fluoresceína, incluyendo FITC, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína; los tipos rodamina, que incluyen TAMRA; dansil; lisamina; cianinas; ficoeritrina; Rojo Texas y los análogos de los mismos. Las marcas fluorescentes pueden conjugarse a anticuerpos mediante las técnicas que se describen en, por ejemplo, *Protocols in Immunology*, mencionado anteriormente. Los reactivos de tintes y marcas fluorescentes incluyen aquellos que se encuentran comercialmente disponibles de *Invitrogen/Molecular Probes* (Eugene, OR) y *Pierce Biotechnology, Inc.* (Rockford, IL).

(c) Se encuentran disponibles o se detallan diversas marcas de sustratos de enzimas (patente de EE.UU. N.º 4275149). Por lo general, la enzima cataliza una alteración química de un sustrato cromogénico que puede medirse mediante diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato que puede medirse espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia de un sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en fluorescencia se describen anteriormente. El sustrato quimioluminescente se excita electrónicamente mediante una reacción química y entonces puede emitir luz que puede medirse (mediante un quimioluminómetro, por ejemplo) o puede donar energía al aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcas enzimáticas incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de la luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente de EE.UU. N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas sacáridas (como por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tal como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Las técnicas para la conjugación de enzimas con anticuerpos se describen en O'Sullivan y col., (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", en *Methods in Enzym.* (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166.

[0034] Los ejemplos de combinaciones de sustratos de enzimas incluyen:

(i) Peroxidasa de rábano picante (HRP) con peroxidasa de hidrógeno como un sustrato, donde la peroxidasa de hidrógeno oxida un precursor de tinte (como por ejemplo, el ortofenileno diamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con paranitrofenilfosfato como un sustrato cromogénico; y

(iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o un sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa.

[0035] Se encuentran disponibles muchas otras combinaciones de sustratos de enzimas para aquellos expertos en la materia. Para obtener una revisión general, véase las patentes de EE.UU. 4275149 y 4318980.

[0036] Una marca puede conjugarse de manera indirecta con una cadena lateral de aminoácidos, una cadena lateral de aminoácidos activada, un anticuerpo diseñado con cisteína, y similares. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las tres categorías amplias de marcas mencionadas anteriormente puede conjugarse con avidina o estreptavidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a la estreptavidina y, por ende, la marca puede conjugarse con el anticuerpo de esta manera indirecta. Alternativamente, para lograr la conjugación indirecta de la marca con la variante polipeptídica,

esta última se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcas mencionadas anteriormente se conjuga con la variante polipeptídica anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). Por lo tanto, se puede lograr la conjugación indirecta de la marca con la variante polipeptídica (Hermanson, G. (1996) en *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego)

5 [0037] El anticuerpo de la presente invención puede emplearse en cualquier método de ensayo conocido tales como ELISA, ensayos de unión competitiva, ensayos tipo "sandwich" directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, págs. 147-158, CRC Press, Inc.).

10 [0038] Una marca de detección puede ser útil para localizar, visualizar y cuantificar una unión o un evento de reconocimiento. Los anticuerpos marcados de la invención pueden detectar receptores en la superficie celular. Otro uso de los anticuerpos marcados de forma detectable es un método de inmunocaptura basado en partículas que comprende la conjugación de una partícula con un anticuerpo fluorescente marcado y la detección de una señal fluorescente sobre la unión de un ligando. Metodologías similares de detección de uniones utilizan el efecto de la resonancia de plasmón superficial (RPS) para
15 medir y detectar las interacciones entre anticuerpos y antígenos.

 [0039] Las marcas de detección, como por ejemplo, los tintes fluorescentes y quimioluminescentes (Briggs y col., (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," *J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1*:1051-1058), proporcionan una señal detectable y por lo general, se aplican en los anticuerpos marcados, preferentemente en aquellos que tienen las siguientes
20 propiedades: (i) el anticuerpo marcado debe producir una señal muy alta con un entorno bajo para que las pequeñas cantidades de anticuerpos puedan detectarse sensiblemente tanto en los ensayos con células como en aquellos sin células; y (ii) el anticuerpo marcado debe ser fotoestable para que la señal fluorescente pueda observarse, controlarse y registrarse sin un fotoblanqueamiento significativo. Para las aplicaciones que implican una unión en la superficie celular del anticuerpo marcado a las membranas o superficies
25 celulares, especialmente células vivas, las marcas preferentemente (iii) deben tener una buena solubilidad en agua para lograr una concentración de conjugado y una sensibilidad de detección eficaces y (iv) no deben ser tóxicas para las células vivas para no alterar los procesos metabólicos normales de las células ni causar la muerte prematura de éstas.

30 [0040] La cuantificación directa de la intensidad de la fluorescencia celular y la enumeración de los eventos marcados fluorescentemente, como por ejemplo, la unión en la superficie celular de los conjugados de tinte peptídica, pueden realizarse en un sistema (Sistema FMAT® 8100 HTS, Applied Biosystems, Foster City, Calif.) que automatiza la mezcla y lectura de los ensayos no radiactivos con células vivas o partículas (Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *J. of Biomolecular Screening* 4:193-

204). Los usos de los anticuerpos marcados también incluyen los ensayos de unión del receptor de superficie celular, los ensayos de inmunocaptura, los ensayos de inmunoabsorción ligado a fluorescencia (FLISA), la escisión de la caspasa (Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:618-23; US 6372907), la apoptosis (Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) *J. Immunol. Methods* 184:39-51) y los ensayos de citotoxicidad. La tecnología de ensayos de microvolumen fluorométrico puede utilizarse para identificar las regulaciones a la alza y a la baja mediante una molécula que actúa sobre la superficie celular (Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *Anal. Biochem.* 271:143-51).

[0041] Los anticuerpos marcados de la invención son útiles como biomarcadores de diagnóstico por imágenes y sondas que se utilizan en los distintos métodos y técnicas de diagnóstico por imagen biomédica y molecular, tales como: (i) MRI (imágenes obtenidas mediante resonancia magnética); (ii) MicroCT (tomografía computarizada); (iii) SPECT (tomografía computarizada de emisión de fotón único); (iv) PET (tomografía con emisión de positrones) Chen y col., (2004) *Bioconjugate Chem.* 15:41-49; (v) bioluminiscencia; (vi) fluorescencia y (vii) ultrasonido. La inmunoscintigrafía es un procedimiento de diagnóstico por imágenes en el que los anticuerpos marcados con sustancias radiactivas se administran a un animal o a un paciente humano y se obtiene una fotografía de los lugares del cuerpo donde se localizan dichos anticuerpos (patente de EE.UU. N.º 6528624). Los biomarcadores de diagnóstico por imágenes pueden medirse y evaluarse objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Existen diferentes tipos de biomarcadores: los Tipo 0 son marcadores de la historia natural de una enfermedad y están correlacionados longitudinalmente con índices clínicos conocidos, como por ejemplo, la valoración por MRI de la inflamación sinovial en la artritis reumatoide; los marcadores Tipo I capturan el efecto de una intervención de acuerdo con un mecanismo de acción, inclusive si el mecanismo no está relacionado con el resultado clínico; los marcadores Tipo II funcionan como puntos de valoración alternativos en donde el cambio o la señal del biomarcador pronostica un beneficio clínico para "validar" la respuesta objetiva, como por ejemplo, una erosión ósea que mide la tomografía computarizada en la artritis reumatoide. Por lo tanto, los biomarcadores de diagnóstico por imágenes pueden proporcionar información terapéutica farmacodinámica (FD) sobre: (i) la expresión de una proteína diana, (ii) la unión de un agente terapéutico a la proteína diana, es decir, la selectividad, y (iii) los datos de eliminación y semivida farmacocinética. Las ventajas de los biomarcadores de imágenes *in vivo* con respecto a los biomarcadores basados en el laboratorio incluyen: tratamiento no invasivo, cuantificación, evaluación de todo el cuerpo, evaluaciones y dosis repetitivas, es decir, muchos momentos específicos, y transferencia potencial de efectos preclínicos (en animales

pequeños) a resultados clínicos (en humanos). Para algunas aplicaciones, la bioimagen sustituye o minimiza la cantidad de experimentos realizados en animales en estudios preclínicos.

[0042] Los métodos de marcado con péptidos son bien conocidos. Véase Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, (1997) *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Glazer y col., (1975) *Chemical Modification of Proteins*. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work y E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. y Noyes, C. M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I y II, CRC Press, New York; Pfliderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", *Modern Methods in Protein Chemistry*, H. Tschesche, Ed., Walter DeGruyter, Berlin y New York; y Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez y col., (2004) *Chem.Eur. J.* 10:1149-1155; Lewis y col., (2001) *Bioconjugate Chem.* 12:320-324; Li y col., (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:110-115; Mier y col., (2005) *Bioconjugate Chem.* 16:240-237.

[0043] Los péptidos y las proteínas marcados con dos grupos, un indicador fluorescente y uno de absorción lo suficientemente cerca entre sí experimentan la transferencia resonante de energía de fluorescencia (FRET). Por lo general, los grupos de indicadores son tintes fluorescentes que se excitan mediante la luz a una longitud de onda determinada y transfieren la energía a un grupo de aceptores o absorbentes con el cambio Stokes adecuado para producir la emisión con un brillo máximo. Los tintes fluorescentes incluyen moléculas con una aromaticidad extendida tal como la fluoresceína y la rodamina y sus derivados. La fracción absorbente en un péptido intacto puede absorber parcial o completamente el indicador fluorescente. Cuando la peptidasa o la protasa producen la escisión de un péptido, puede medirse un aumento detectable en la fluorescencia (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", *Methods in Enzymology*, Academic Press, 248:18-34).

[0044] Los anticuerpos marcados de la invención también pueden utilizarse como un agente para la purificación por afinidad. En este proceso, el anticuerpo marcado se inmoviliza en un soporte sólido, como una resina Sephadex o papel de filtro, utilizando métodos conocidos en la materia. El anticuerpo inmovilizado entra en contacto con una muestra que contiene el antígeno que deberá purificarse y, a continuación, el soporte se lava con un solvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material de la muestra, excepto el antígeno que se purificará y que está unido a la variante polipeptídica inmovilizada. Finalmente, el soporte se lava con otro solvente adecuado tal como el tampón glicina, pH 5,0, que liberará el antígeno de la variante polipeptídica.

[0045] Los reactivos de marcación tienen generalmente una funcionalidad reactiva que puede reaccionar (i) directamente con un tiol de cisteína de un anticuerpo diseñado con cisteína para formar un

anticuerpo marcado, (ii) con un reactivo enlazador para formar un enlazador marcado intermedio o (iii) con un anticuerpo enlazador para formar un anticuerpo marcado. La funcionalidad reactiva de los reactivos de marcación incluye: maleimido, haloacetil, éster succinimidil iodoacetamida (por ejemplo, NHS, N-hidroxisuccinimida), isotiocianato, cloruro sulfonyl, 2,6-diclorotriazinil, éster pentafluorofenil y fosforamidita, a pesar de que también pueden utilizarse otros grupos funcionales.

[0046] Un grupo funcional reactivo ejemplar es el éster N-hidroxisuccinimidil (NHS) de un grupo carboxilo que sustituye una marca detectable, por ejemplo, una biotina o un tinte fluorescente. El éster NHS de la marca puede preformarse, aislarse, purificarse o caracterizarse, o todos los anteriores, o bien puede formarse in situ y reaccionar con un grupo nucleofílico de un anticuerpo. Por lo general, la forma carboxilo de la marca se activa cuando reacciona con alguna combinación de un reactivo de carbodiimida, como por ejemplo, diciclohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida, o un reactivo de uronio, como por ejemplo, TSTU (O-(N-Succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato, HBTU (O-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato) o HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato), un activador tal como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y N-hidroxisuccinimida para proporcionar el éster NHS de la marca. En algunos casos, la marca y el anticuerpo deben acoplarse mediante la activación de la marca en el lugar y reaccionar con el anticuerpo para formar el conjugado de anticuerpo y marca en un paso. Otros reactivos de activación y acoplamiento incluyen TBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato), TFFH (N,N',N'',N'''-tetrametiluronio 2-fluoro-hexafluorofosfato), PyBOP (benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio hexafluorofosfato), EEDQ (2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina), DCC (diciclohexilcarbodiimida); DIPCDI (diisopropilcarbodiimida), MSNT (1-(mesitileno-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazolo y arilo sulfonyl halidos, como ejemplo, cloruro de triisopropilbenzensulfonyl.

Compuestos de péptidos-Fab de unión a la albúmina de la invención:

[0047] En un aspecto, el anticuerpo de la invención se fusiona con una proteína de unión a la albúmina. La unión a proteínas plasmáticas puede ser una manera eficaz de mejorar las propiedades farmacocinéticas de las moléculas de vida corta. La albúmina es la proteína que se encuentra en mayor abundancia en el plasma. Los péptidos de unión a la albúmina sérica (ABP) pueden alterar la farmacodinámica de las proteínas fusionadas al dominio activo, incluyendo la alteración de la absorción, penetración y difusión de tejido. Estos parámetros farmacodinámicos pueden modularse mediante la selección específica de la secuencia adecuada del péptido de unión a la albúmina sérica (US 20040001827). Se identificaron una serie de péptidos de unión a la albúmina mediante la detección de representación en imágenes de fagos (Dennis y col., (2002) "Albumin Binding As A General Strategy for Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; documento WO 01/45746). Los compuestos de la invención incluyen secuencias de péptidos de unión a la albúmina (ABP) que se indican

en: (i) Dennis y col., (2002) *J Biol Chem.* 277:35035-35043 en las Tablas III y IV, página 35038; (ii) US 20040001827 en [0076] identificadores de secuencia n.º: 9-22; y (iii) en el documento WO 01/45746 en las páginas 12-13, los cuales se incorporan en la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Los Fabs de unión a la albúmina (ABP) están diseñados mediante la fusión de un péptido de unión a la albúmina y, por ejemplo, el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con un coeficiente estequiométrico de 1:1 (1 ABP / 1 Fab). Se demostró que la asociación de estos ABP-Fabs con la albúmina incrementó la semivida del anticuerpo más de 25 veces en conejos y ratones. Por lo tanto, los residuos Cis reactivos mencionados anteriormente pueden introducirse en estos ABP-Fabs y utilizarse para la conjugación específica de un punto con fármacos citotóxicos seguidos de estudios *in vivo* en animales.

[0048] Las secuencias de péptidos de unión a la albúmina ejemplares incluyen, entre otras, las secuencias de aminoácidos que se enumeran en los identificadores de secuencia n.º:80-84:

CDKTHHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	Identificador de secuencia n.º:80
QRLMEDICLPRWGCLWEDDF	Identificador de secuencia n.º:81
QRLIEDICLPRWGCLWEDDF	Identificador de secuencia n.º:82
RLIEDICLPRWGCLWEDD	Identificador de secuencia n.º:83
DICLPRWGCLW	Identificador de secuencia n.º:84

Conjugados de anticuerpos con fármacos

[0049] En otro aspecto, la invención proporciona inmunoconjugados, conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC), que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, como por ejemplo un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, animal o vegetal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado). En otro aspecto, la invención también ofrece métodos de uso de los inmunoconjugados. En un aspecto, un inmunoconjugado comprende cualquiera de los anticuerpos anti-STEAP-1 mencionados anteriormente unidos covalentemente a un agente citotóxico o detectable.

[0050] El uso de anticuerpos conjugados con fármacos para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, los fármacos que se utilizan para matar o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26: 151 -172; patente de EE. UU. n.º 4.975.278), permite la administración de la fracción de fármacos a tumores y una acumulación intracelular en éstos, donde la administración sistemática de estos agentes farmacológicos no conjugados puede resultar en niveles inaceptables de toxicidad tanto para las células normales como para las células tumorales que se intentan eliminar (Baldwin y col., (1986) *Lancet* págs. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And*

Clinical Applications, A. Pinchera y col. (eds), págs. 475-506). Se busca entonces la máxima eficacia con la mínima toxicidad. Tanto los anticuerpos monoclonales como los policlonales se han descrito como útiles en estas estrategias (Rowland y col., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183 (-87). Los fármacos empleados en estos métodos incluyen a la daunomicina, la doxorubicina, el metotrexato y la vindesina (Rowland y col., (1986) mencionado anteriormente). Entre las toxinas empleadas en los conjugados de anticuerpos con toxinas se encuentran toxinas bacterianas como la toxina de la difteria, toxinas vegetales como la ricina, toxinas de molécula pequeña como la geldanamicina (Mandler y col., (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler y col., (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler y col., (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (EP 1391213; Liu y col., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) y caliqueamicina (Lode y col. (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman y col., (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Las toxinas pueden producir sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen la unión de tubulina, la unión de ADN o la inhibición de la topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con grandes anticuerpos o ligandos receptores de proteínas.

[0051] ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un anticuerpo conjugado con un radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 murino dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de los linfocitos B cancerígenos y normales, y contra el radioisótopo ¹¹¹In o ⁹⁰Y unido por un quelante enlazador de tiourea (Wiseman y col., (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman y col., (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig y col., (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig y col., (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). A pesar de que el ZEVALIN presenta actividad contra las células B del linfoma no Hodgkin (LNH), su administración provoca citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (Gentuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpos y fármacos compuesto de un anticuerpo huCD33 enlazado a caliqueamicina, se aprobó en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda por inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25(7): 686; Patentes de EE.UU. n.º 4.970.198; 5.079.233; 5.585.089; 5.606.040; 5.693.762; 5.739.116; 5.767.285; 5.773.001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de un anticuerpo con fármacos compuesto por el anticuerpo huC242 enlazado a la fracción de fármacos de los maitansinoides por medio de un enlazador de disulfuro SPP, DM1, está bien avanzado en ensayos clínicos de Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, como los de colon, páncreas, gástricos y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un anticuerpo conjugado con un fármaco, compuesto por el anticuerpo monoclonal del antígeno de membrana antiprostático (PSMA) enlazado al grupo de los maitansinoides, DM1, está en fase de desarrollo para el tratamiento potencial de los tumores de próstata. Los péptidos auriestatinos, la auristatina E (AE) y la monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, se conjugaron a anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específicos para

CD30 en tumores hematológicos) (Doronina y col., (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784) y se encuentran en desarrollo terapéutico.

[0052] Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen en la presente memoria descriptiva. Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen la cadena de difteria A, los fragmentos activos sin unión de la toxina de la difteria, la cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena de ricina A, la cadena de abrina A, la cadena de modecina A, la alfa-sarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), el inhibidor de la Momordica charantia, la curcina, la crotina, el inhibidor de la Saponaria officinalis, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina y el tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232, publicado el 28 de octubre de 1993. Se dispone de diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re . Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden realizar utilizando una variedad de agentes de unión a proteína bifuncionales, como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). For ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col., (1987) *Science*, 238:1098. El ácido triaminopentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido a un anticuerpo (documento W0 94/11026).

[0053] También se contemplan en la presente memoria descriptiva los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, como una calicheamicina, maitansinoides, dolastatinas, auristatinas, un tricoteceno y un CC1065, y los derivados de estas toxinas que tengan actividad tóxica.

Maitansina y maitansinoides

[0054] En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención (longitud completa o fragmentos) conjugado con una o más moléculas de maitansinoides.

[0055] Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez a partir del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. N.º 3896111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producían maitansinoides, como el maitansinol y los ésteres de C-3 amitansinol (patente de EE.UU. N.º 4.151.042). El maitansinol sintético y sus derivados y análogos se describen, por ejemplo, en las

patentes de EE.UU. N.º 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663 y 4.371.533.

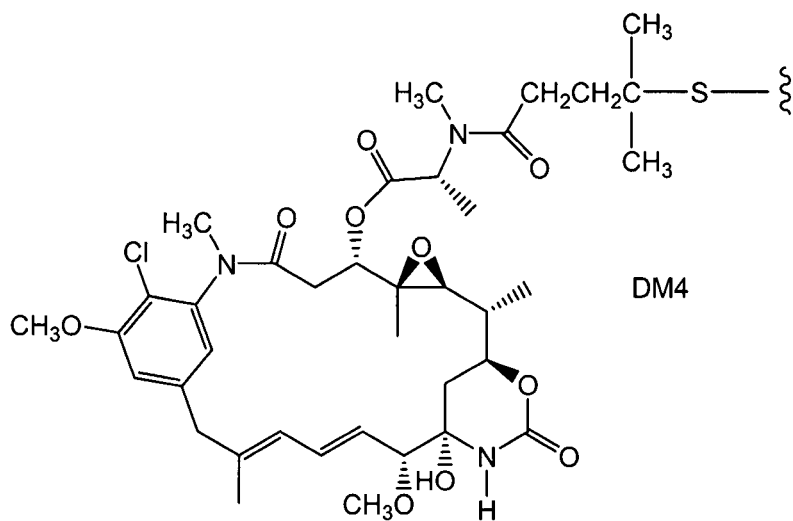
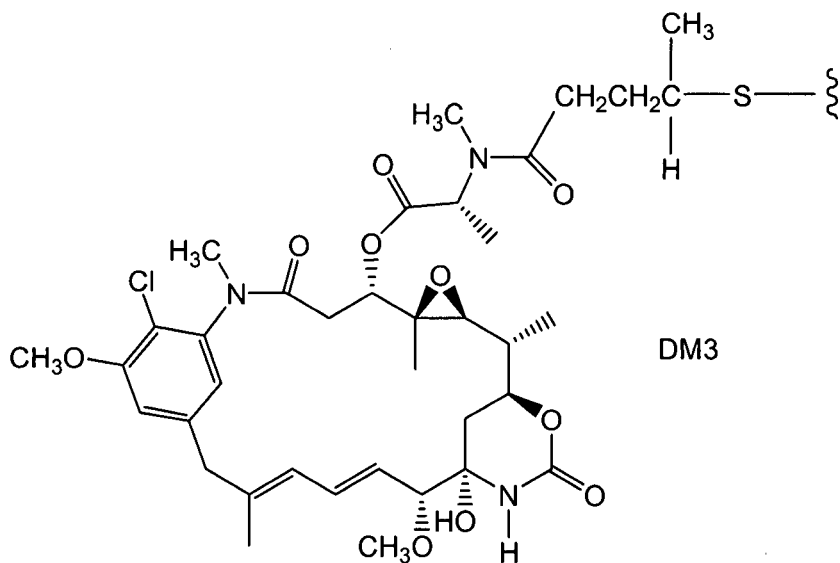
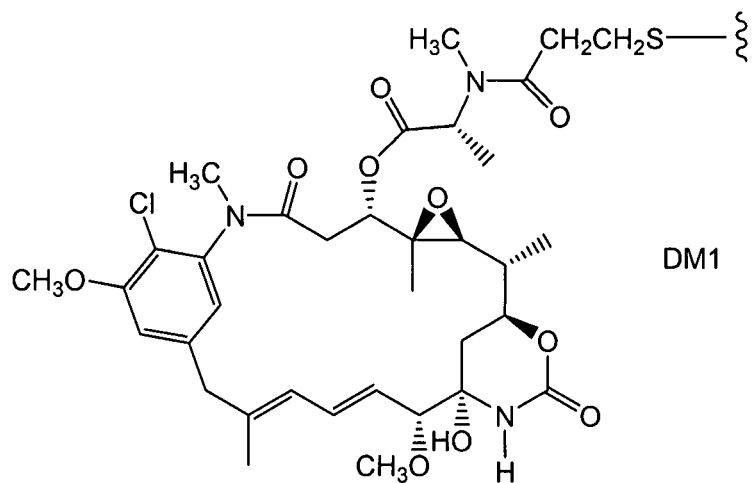
[0056] Los grupos de fármacos maitansinoides son grupos de fármacos que resultan atractivos para la elaboración de anticuerpos conjugados con fármacos por sus siguientes características: (i) son relativamente accesibles en lo que se refiere a su preparación mediante fermentación, modificación química o derivación de productos de fermentación, (ii) son fáciles de someter a derivación, con grupos funcionales adecuados para conjugación a través de los enlazadores no disulfuro con anticuerpos, (iii) tienen estabilidad en plasma y (iv) resultan efectivos frente a distintas líneas celulares tumorales.

[0057] Los compuestos de maitansina aptos para uso como grupos de fármacos maitansinoides son bien conocidos en la materia y se pueden aislar de fuentes naturales según métodos conocidos o se pueden producir mediante técnicas de ingeniería genética (véase Yu y col., (2002) *PNAS* 99:7968-7973), o utilizando maitansinol y sus análogos preparados de forma sintética mediante métodos conocidos.

[0058] Entre los grupos ejemplares de fármacos maitansinoides están los que tienen un anillo aromático modificado, como por ejemplo: C-19-dicloro (patente de EE.UU. N.º 4256746) (preparado por reducción de ansamitocina P2 mediante hidruro de litio-aluminio); C-20-hidroxi (o C-20-dimetil) +/-C-19-dicloro (patentes de EE.UU. N.º 4361650 y 4307016) (preparado mediante desmetilación utilizando *Streptomyces* o *Actinomyces* o decolorinación con LAH); y C-20-dimetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-dicloro (patente de EE.UU. N.º 4.294.757) (preparado mediante acilación usando cloruros de acilo) y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones.

[0059] Entre los grupos ejemplares de fármacos maitansinoides también están los que tienen modificaciones como por ejemplo: C-9-SH (patente de EE.UU. N.º 4424219) (preparado mediante reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅); C-14-alcoximetil(dimetoxi/CH₂ OR)(patente de EE.UU. N.º 4331598); C-14-hidroximetil o aciloximetil (CH₂OH o CH₂OAc) (patente de EE.UU. N.º 4450254) (preparado a partir de Nocardia); C-15-hidroxi/aciloxi (patente de EE.UU. N.º 4364866) (preparado mediante la conversión de maitansinol por *Streptomyces*); C-15-metoxi (patentes de EE.UU. N.º 4313946 y 4315929) (aislado a partir de *Trewia nudiflora*); C-18-N-dimetil (patentes de EE.UU. N.º 4362663 y 4322348) (preparado por desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y 4,5-deoxi (US 4371533) (preparado por la reducción de maitansinol mediante tricloruro de titanio/LAH).

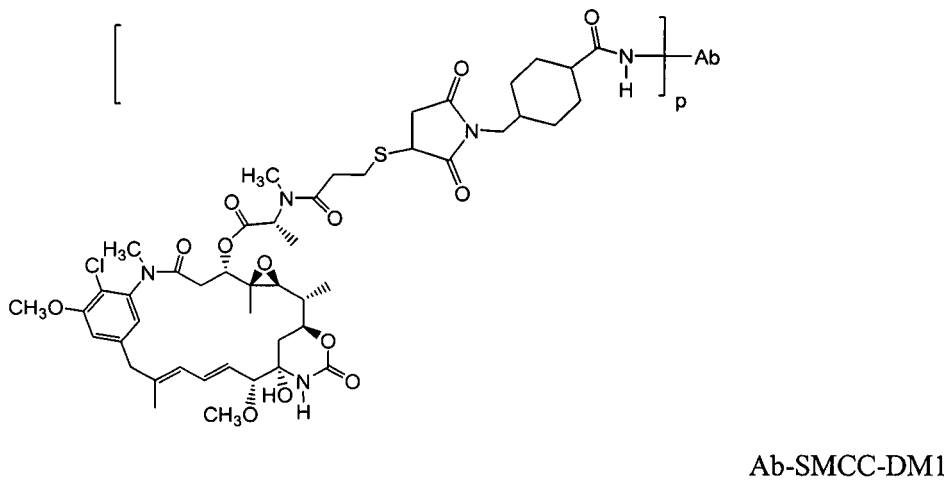
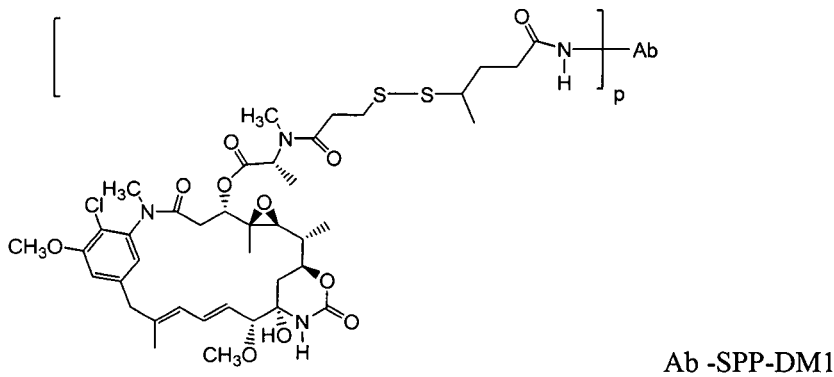
[0060] A continuación se citan algunos ejemplos de formas de realización ejemplares de grupos de fármacos maitansinoides: DM1; DM3; y DM4, con las estructuras:



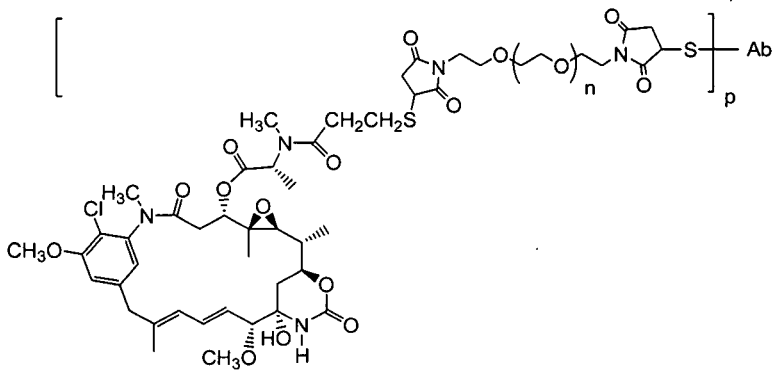
5 donde la línea ondulada indica el enlace covalente del átomo de sulfuro del fármaco a un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo con fármaco. Se ha informado sobre el HERCEPTIN® (trastuzumab)

enlazado por SMCC a DM (documento WO 2005/037992, que se incorpora en la presente memoria descriptiva a modo de referencia). Un conjugado de anticuerpo con fármacos de la presente invención se puede preparar de acuerdo con los procedimientos divulgados en esta memoria descriptiva.

[0061] Otros conjugados ejemplares de anticuerpo con fármacos maitansinoides tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (donde Ab es el anticuerpo y p es 1 a aproximadamente 8):



[0062] Los conjugados ejemplares de un anticuerpo con fármacos donde DM1 se enlaza a través de un enlazador BMPEO a un grupo tiol del anticuerpo tienen la estructura y abreviatura:



donde Ab es el anticuerpo; n es 0, 1 ó 2; y p es 1, 2, 3 ó 4.

[0063] Los immunoconjugados que contienen maitansinoides, los métodos para elaborarlos y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU N.º 5.208.020 y 5.416.064, 6.441.163 y en la patente Europea EP 0 425 235 B1, y los descubrimientos de las mismas se incorporan expresamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Liu y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996) describe los immunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DM1 enlazado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico para las células del cáncer de colon en cultivo y demostró actividad antitumoral en ensayos de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari y col., *Cancer Research* 52:127-131 (1992) describen immunoconjugados en los que un maitansinoide se conjugaba por medio de un enlazado de disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en las líneas celulares de cáncer de colon humanas, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogen HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se probó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco consiguió un alto grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que podría ser mayor si se aumentase el número de moléculas maitansinoides por cada molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una citotoxicidad sistémica baja en ratones.

[0064] Los conjugados de un anticuerpo con un maitansinoide anti-STEAP-1 se preparan mediante enlace químico de un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin hacer que disminuya significativamente la actividad biológica de ambos elementos del conjugado. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.208.020 (cuyos descubrimientos se incorporan expresamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia). Una media de 3-4 moléculas maitansinoides conjugadas por anticuerpo ha mostrado eficacia en la mejora de la citotoxicidad de las células diana sin afectar negativamente a la función o la solubilidad del anticuerpo, aunque cabría esperar incluso que una molécula toxina/anticuerpo mejore la citotoxicidad en relación con el uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la materia y pueden sintetizarse mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. En la patente de EE.UU. N.º 5.208.020 y en otras patentes y publicaciones no patentadas a las que anteriormente se ha hecho referencia, por ejemplo, se describen maitansinoides adecuados. Los maitansinoides preferidos son el maitansinol y análogos modificados del maitansinol, en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, como distintos ésteres del maitansinol.

[0065] Se conocen muchos grupos de enlace en la materia para producir conjugados de anticuerpos con maitansinoides, incluidos, por ejemplo, los descritos en las patentes de EE.UU. N.º 5.208.020, 6.441.163 o patente europea 0 425 235 B1, Chari y col., *Cancer Research* 52:127-131 (1992), y

de la patente de EE.UU. N.º 2005/0169933 A1, y lo descrito en los mismos se incorpora expresamente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Los conjugados de anticuerpos con maitansinoide que incluyen el componente enlazador SMCC pueden prepararse como se indica en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 11/141344, presentada el 31 de mayo de 2005, "*Antibody Drug Conjugates and Methods*". Los

5 grupos enlazadores comprenden grupos disulfuro, grupos de tioéteres, grupos lábiles al ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles a la peptidasa o grupos lábiles a la esterasa, como se revela en las patentes mencionadas anteriormente. En la presente memoria descriptiva se dan ejemplos y se describen grupos enlazadores adicionales.

[0066] Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide se pueden realizar utilizando una
10 variedad de agentes de unión a proteína bifuncionales, como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-
15 etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Los agentes de unión que se prefieren sobre todo son N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson et al., *Biochem. J.* 173:723-737 [1978]) y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace de disulfido.

[0067] El enlazador se puede unir a la molécula de maitansinoide en varias posiciones,
20 dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, un enlace con éster se puede formar mediante reacción con un grupo hidroxilo que utilice técnicas de unión convencionales. La reacción puede producirse en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una forma de realización preferente, el enlace se forma en la posición 3 del maitansinol o un análogo del maitansinol.

[0068] En una forma de realización, cualquiera de los anticuerpos de la invención (longitud
25 completa o fragmentos) se conjuga con una o más moléculas de maitansinoides. En una forma de realización del inmunoconjugado, el agente citotóxico D es un maitansinoide DM 1. En una forma de realización del inmunoconjugado, el ligando se selecciona del grupo compuesto por SPDP, SMCC, IT, SPDP, y SPP.

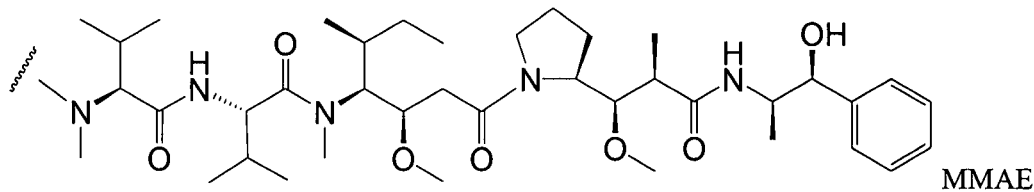
30 Auristatinas y dolostatinas

[0069] En algunas formas de realización, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con dolastatinas o análogos peptídicos a la dolastatina y derivados, las auristatinas (patentes de EE.UU. N.º 5.635.483; 5.780.588). Se ha establecido que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, la hidrólisis GTP y la división nuclear y celular (Woyke y col.,

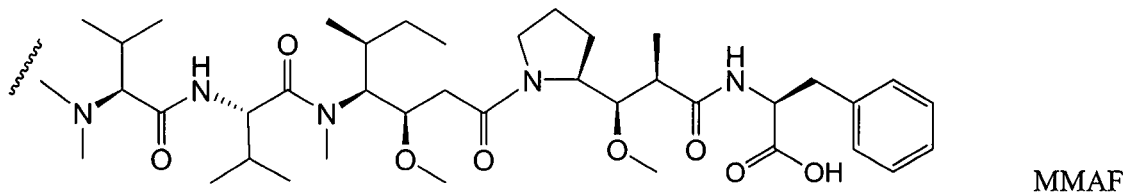
(2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (patente de EE.UU. N.º 5.663.149) y antifúngica (Pettit y col., (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). La fracción del fármaco auristatina o dolastatina puede estar unida al anticuerpo a través de los extremos terminales N (amino) o C (carboxil) de la fracción péptido del fármaco (documento WO 02/088172).

[0070] Entre las formas de realización ejemplares de auristatina están los grupos de fármacos DE y DF de monometilauristatina enlazados al extremo N-terminal, descritas en Senter y col., "*Proceedings of the American Association for Cancer Research*", Volume 45, Abstract Number 623, presentada el 28 de marzo de 2004, cuyo contenido se incorpora expresamente en su totalidad a modo de referencia.

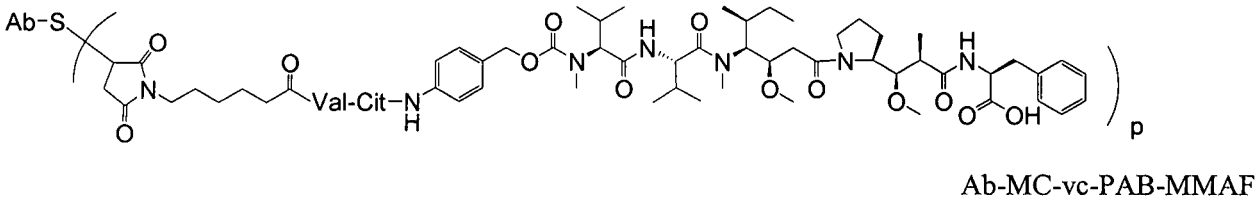
[0071] Una forma ejemplar de realización de auristatina es MMAE (donde la línea ondulada indica el enlace covalente a un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo con fármaco).

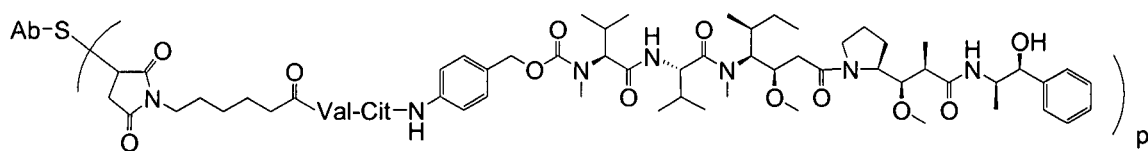


[0072] Otra forma ejemplar de realización de auristatina es MMAF, donde la línea ondulada indica el enlace covalente a un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo con fármaco (patente de EE.UU. N.º 2005/0238649):

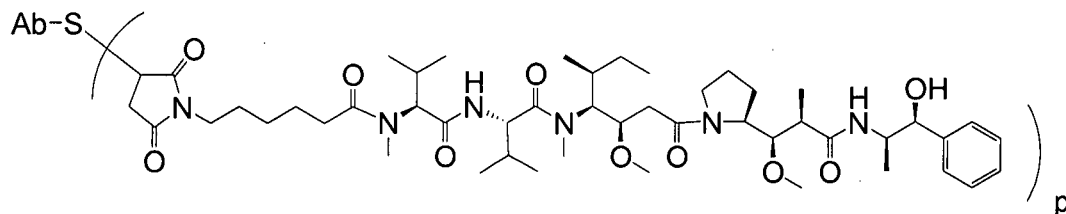


[0073] Otros ejemplos de realizaciones ejemplares que comprenden MMAE o MMAF y varios componentes enlazadores (descritos en la presente memoria en mayor detalle) tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (donde Ab significa anticuerpo y p es 1 a aproximadamente 8):

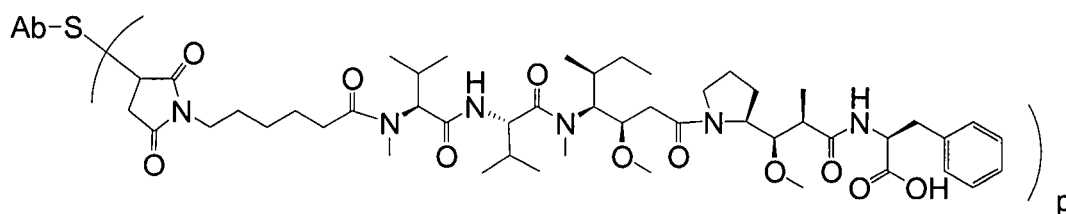




Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

[0074] Por lo general, los grupos de fármacos basados en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptidos. Estos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis de fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, págs. 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los grupos de fármacos auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los siguientes métodos: patente de EE.UU. N.º 5.635.483; patente de EE.UU. N.º 5.780.588; Pettit y col., (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit y col., (1998) *Anti-cáncer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., y col., *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit y col., (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863; y Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784.

Caliqueamicina

[0075] En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina es capaz de producir la ruptura del ADN de hebra doble en concentraciones por debajo de picomolar. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina, véanse las patentes de EE.UU. N.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296 (todas para American Cyanamid Company). Entre análogos estructurales de la caliqueamicina que se pueden utilizar se incluyen,

entre otros, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman y col., *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode y col., *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) y las patentes de EE.UU. anteriormente mencionadas para American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que es posible conjugar el anticuerpo es QFA, que es un atifolato. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen puntos intracelulares de acción y no
5 atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por ello, la absorción celular de estos agentes a través de la internalización mediada por el anticuerpo potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

[0076] Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos
10 colectivamente como complejo LL-E33288 descrito en las patentes de EE.UU. N.º 5.053.394, 5.770.710, así como las esperamicinas (patente de EE.UU. N.º 5.877.296).

[0077] Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos sin unión de la toxina de la difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modicina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de la Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de la Saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y el tricotecenos. Véase, por
15 ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

[0078] Esta invención también contempla un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un
20 compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN como por ejemplo la desoxirribonucleasa; ADNasa).

[0079] Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Se dispone de una variedad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se utiliza para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para gammagrafía, por ejemplo $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , o un marcador giratorio para resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como diagnóstico por imágenes obtenidas mediante resonancia magnética), como yodo-123 nuevamente, yodo-131, indio-111, fluorina-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

[0080] El radio u otros marcadores se pueden incorporar en el conjugado en formas conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos utilizando precursores adecuados de aminoácidos que contengan, por ejemplo, fluorina-19 en vez de hidrógeno. Los marcadores como $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} se pueden unir a través de un residuo de cisteína en el

péptido. El itrio-90 se puede unir a través de un residuo de lisina. El método IODOGEN (Fraker y col., (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57 se puede utilizar para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos detalladamente.

5 **[0081]** Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden realizar utilizando una variedad de agentes de unión a proteína bifuncionales como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como 10 bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal y como se describe en Vitetta y col., *Science*, 238:1098 (1987). El ácido triaminopentaacético 15 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido a un anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil al ácido, un enlazador sensible a la peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contenga disulfuri (Cari y col., *Cancer Research* 52:127-131, Patente de EE.UU. N. ° 5.208.020).

20 **[0082]** Los compuestos de la invención contemplan expresamente, entre otros, el ADC preparado con reactivos reticulares: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que se comercializan (por ejemplo, por Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU). Véanse las páginas 467-498, 2003-2004 *Applications Handbook and Catalog*.

Preparación de los conjugados de anticuerpos con fármacos:

30 **[0083]** En los conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC) de la invención, un anticuerpo (Ab) se conjuga con uno o más grupos de fármacos (D), por ejemplo, grupos de fármacos de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 por anticuerpo, a través de un enlazador (L). En una realización, el número de fracciones de fármaco (D) por anticuerpo es de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, 30 alternativamente, de aproximadamente 2 a aproximadamente 6, alternativamente, de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, alternativamente, de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 fracciones de fármaco por anticuerpo. Puesto que el número de fracciones de fármaco por anticuerpo es generalmente un promedio de todos los conjugados presentes en una población de un conjugado de fármaco y anticuerpo, el

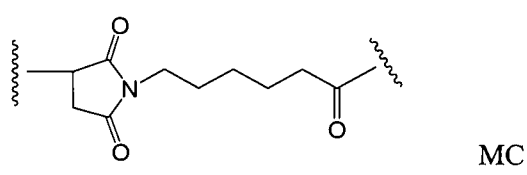
número de fracciones de fármaco por anticuerpo no puede ser un número entero. Los ADC de la formula I se pueden preparar por varios medios, empleando reacciones químicas orgánicas, condiciones y reactivos conocidos por los expertos, como: (1) una reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente, para formar un Ab-L, mediante un enlace covalente, seguida de la reacción con una fracción de fármaco D; y (2) una reacción de un grupo nucleofílico de una fracción de fármaco con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de la reacción con el grupo nucleofílico del anticuerpo. En la presente memoria descriptiva se describen métodos adicionales para la preparación del ADC.

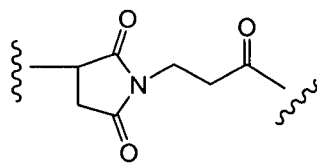


[0084] El enlazador puede estar formado por uno o más componentes enlazadores. Los componentes de enlace ejemplares incluyen: 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobensiloxycarbonil ("PAB"), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC"), y N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"). En una forma de realización, el ligando es valina-citrulina-p-aminobensiloxycarbonil ("vc-PAB") Los componentes enlazadores adicionales son conocidos en la materia y algunos se describen en la presente memoria descriptiva.

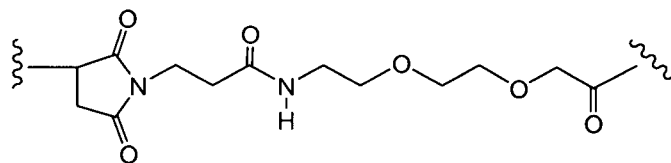
[0085] En ciertas formas de realización, el enlazador puede comprender residuos de aminoácidos. Los componentes enlazadores ejemplares de aminoácidos incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ejemplares incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos ejemplares incluyen: glicina-valina-citrulina (gl-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los residuos de aminoácidos que comprenden un componente enlazador de aminoácidos incluyen aquellos que se producen de forma natural, como así también los aminoácidos menores y los análogos de aminoácidos que no se producen de forma natural, como la citrulina. Los componentes enlazadores de aminoácidos pueden designarse y optimizarse en su selectividad para la escisión enzimática mediante una enzima específica, por ejemplo, una proteasa asociada a un tumor, catepsina B, C y D o una proteasa plasmina.

[0086] A continuación se muestran las estructuras ejemplares de los componentes enlazadores (donde la línea ondulada indica los sitios de enlace covalente a otros componentes del ADC)





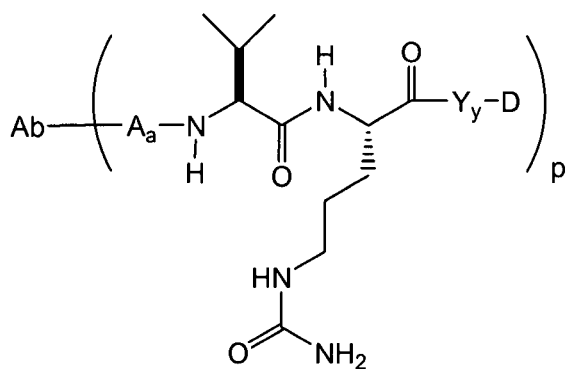
MP



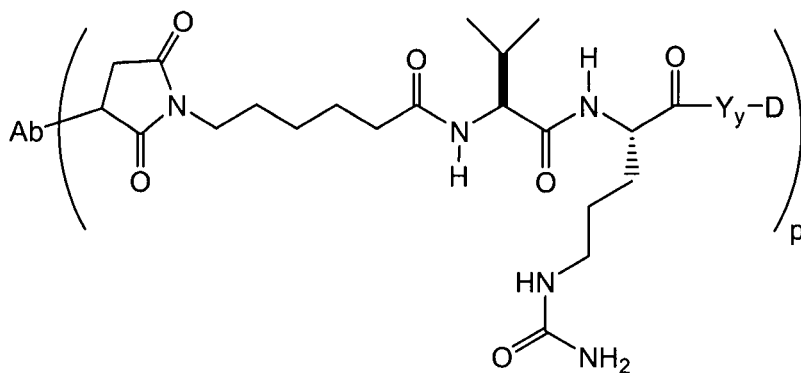
MPEG

5

[0087] Los componentes enlazadores ejemplares adicionales y las abreviaciones incluyen (donde se muestra el anticuerpo (Ab) y el enlazador, y p es 1 a aproximadamente 8):



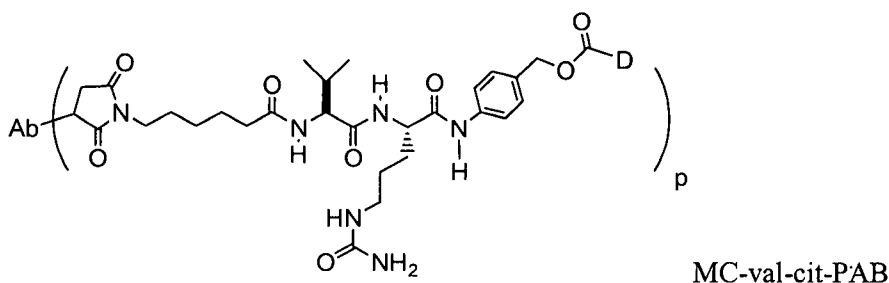
Val-cit



MC-val-cit

10

118



[0088] Los grupos nucleofílicos en los anticuerpos incluyen entre otros: (i) grupos amino N-terminal, (ii) grupos amino de la cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos amino o hidroxilo de azúcares donde el anticuerpo es glicosilado. Los grupos amino, tiol e hidroxilo son nucleofílicos y son capaces de reaccionar para formar uniones covalentes con grupos electrofílicos en las fracciones del enlazador y los reactivos enlazadores, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos y haluro de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos. Ciertos anticuerpos contienen bisulfuros de intercadena reducible, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden convertirse en reactivos mediante conjugación con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor como el DTT (ditiotreitól). Por lo tanto, cada puente de cisteína formará, en teoría, dos nucleófilos tiol reactivos. Los grupos nucleofílicos adicionales pueden introducirse en los anticuerpos a través de la reacción de las lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), lo que da lugar a la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden introducirse en un anticuerpo (o un fragmento del mismo) mediante la introducción de uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo preparando anticuerpos mutantes que comprendan uno o más residuos de aminoácidos de cisteínas no nativas).

[0089] Los conjugados de anticuerpos con fármacos de la invención también pueden producirse mediante la modificación del anticuerpo para introducir fracciones electrofílicas, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleofílicos en el reactivo enlazador o el fármaco. Las azúcares de los anticuerpos glicosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de periodato, a fin de formar grupos cetonas o aldehídos, los cuales pueden reaccionar con el grupo amina de los reactivos enlazadores o las fracciones del fármaco. Los grupos resultantes de amina base de Schiff pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, mediante los reactivos de hidruro de boro para formar enlaces amina estables. En una forma de realización, la reacción de la porción carbohidratada de un anticuerpo glicosilado, ya sea con galactosa oxidasa o con metaperiodato de sodio, puede producir grupos de carbonilo (aldehídos y cetonas) en la proteína que pueden reaccionar con los grupos apropiados en el fármaco ("Bioconjugate Techniques" de Hermanson). En otra forma de realización, las proteínas que contienen residuos de serina o treonina N-terminal pueden reaccionar con metaperiodato de sodio, lo que da lugar a la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh, (1992) *Bioconjugate*

Chem. 3:138-146; patente de EE.UU. N.º 5362852). Se puede hacer que este aldehído reaccione con una fracción de fármaco o un nucleófilo enlazador.

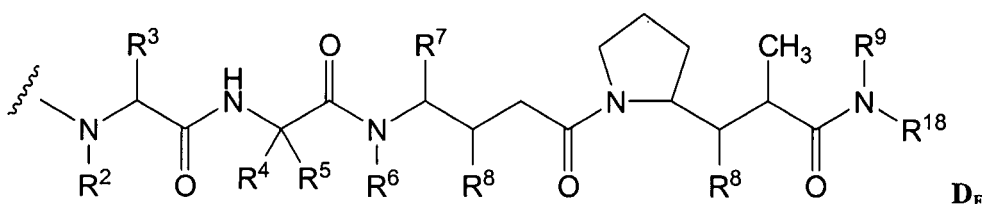
[0090] Del mismo modo, los grupos nucleofílicos en una fracción del fármaco incluyen los siguientes compuestos: los grupos amino, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y aril-hidracida, capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en las fracciones enlazadoras y reactivos enlazadores, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBT, haloformos y haluro de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos.

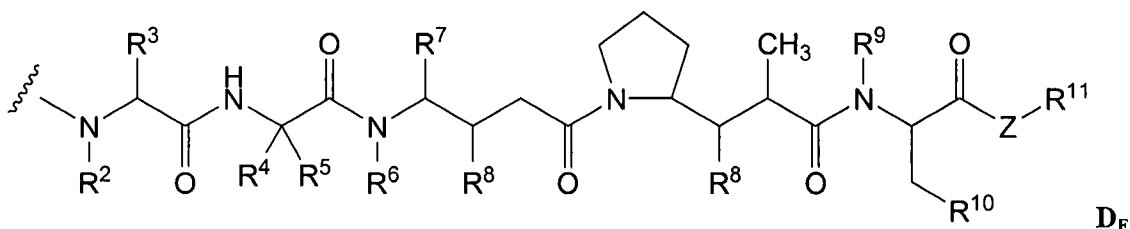
[0091] Se encuentran métodos de conjugación de fracciones enlazador-fármaco a proteínas que actúan sobre las células, tales como los anticuerpos, la inmonoglobulina o los fragmentos de la misma en, por ejemplo, patente de EE.UU. N.º 5.208.020; patente de EE.UU. N.º 6.441.163; documentos WO2005037992, WO2005081711 y WO2006/034488, los cuales se incorporan expresamente en su totalidad a modo de referencia.

[0092] Alternativamente, es posible realizar una fusión de proteínas que contengan el anticuerpo y el agente citotóxico, por ejemplo mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede incluir regiones respectivas que codifiquen las dos porciones del conjugado, ya sea adyacentes entre sí o separados por una región que codifica un péptido de enlace, el cual no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

[0093] En otra forma de realización, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como la estreptavidina) y actuar previamente contra el tumor, donde se administra al paciente el conjugado de anticuerpo con receptor, luego se elimina de la circulación el conjugado no unido utilizando un agente de eliminación, y posteriormente se administra un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótico).

[0094] En una forma de realización del immunoconjugado, el agente citotóxico, D, es una auristatina de fórmula D_E o D_F



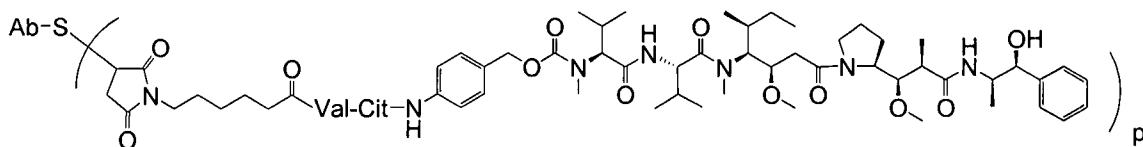


y donde R^2 y R^6 son, cada uno, metilo; R^3 y R^4 son cada uno isopropilo; R^7 es sec butilo, cada R^8 se selecciona independientemente entre CH_3 , $O-CH_3$, OH , y H ; R^9 es H ; R^{10} es arilo; Z es $-O-$ o $-NH-$; R^{11} es H , C_1-C_8 alquilo o $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_3$; y R^{18} es $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-$ arilo; y

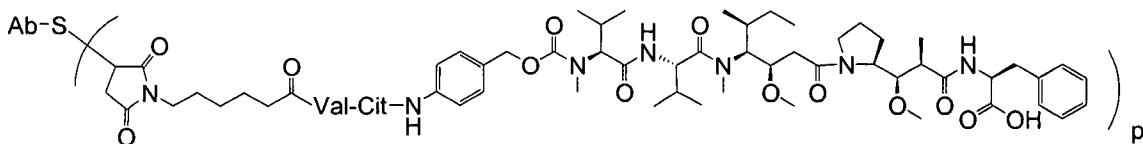
5 (d) p oscila entre aproximadamente 1 y 8.

[0095] Se proporcionan también las siguientes formas de realización para cualquiera de los inmunoconjugados anteriores. En una forma de realización, un inmunoconjugado tiene actividad destructora de células *in vitro* o *in vivo*. En una forma de realización, el enlazador se une al anticuerpo a través de un grupo tiol en el anticuerpo. En una forma de realización, el enlazador es escindible mediante una proteasa. En una forma de realización, el enlazador comprende un dipéptido val-cit. En una forma de realización, el enlazador comprende una unidad p-aminobenzilo. En una forma de realización, la unidad p-aminobenzilo está situada entre el fármaco y un sitio de escisión de la proteasa en el enlazador. En una forma de realización, la unidad p-aminobenzilo es un p-aminobenziloxicarbonilo (PAB). En una forma de realización, el enlazador comprende 6-maleimidocaproilo. En una forma de realización, 6-maleimidocaproilo está situado entre el anticuerpo y un sitio de escisión de la proteasa en el enlazador. Las formas de realización anteriores pueden darse por separado o combinadas entre sí.

[0096] En una forma de realización, el fármaco se selecciona entre MMAE y MMAF. En una forma de realización, el inmunoconjugado tiene la fórmula



20 donde Ab es cualquiera de los anticuerpos anti-STEAP-1 anteriores, S es un átomo de sulfuro y p oscila entre alrededor de 2 y alrededor de 5. En una forma de realización, el inmunoconjugado tiene la fórmula



donde Ab es cualquiera de los anticuerpos anti-STEAP-1 anteriores, S es un átomo de sulfuro y p oscila entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6 , entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 3, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 6, entre aproximadamente 4 y aproximadamente 6.

Métodos de diagnóstico por imágenes del anticuerpo marcado:

[0097] En otra forma de realización de la invención, los anticuerpos diseñados con cisteína pueden marcarse mediante tiol de cisteína con radionucleidos, tintes fluorescentes, grupos de sustratos activadores de la bioluminiscencia, grupos de sustratos activadores de la quimioluminiscencia, enzimas y otros marcadores de detección para experimentos con imágenes con aplicaciones de diagnóstico, farmacodinámica y terapéuticas. Generalmente, el anticuerpo diseñado con cisteína marcado, es decir, "biomarcador" o "sonda", se administra por inyección, perfusión o ingesta oral a un organismo vivo, por ejemplo, un ser humano, un roedor u otro animal pequeño, un órgano perfundido o una muestra de tejido. La distribución de la sonda se detecta durante un período de tiempo y se representa mediante una imagen.

Artículos de fabricación:

[0098] En otra forma de realización de la invención, se proporcionan artículos fabricados o "kit" que contienen materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El elemento de fabricación comprende un envase y una etiqueta o prospecto en el envase o asociado a él. Entre los envases adecuados se encuentran, por ejemplo, botes, viales, jeringas, ampollas, etc. Los envases pueden estar hechos de diversos materiales, como vidrio o plástico. El envase contiene una composición de conjugado de anticuerpo con fármaco (ADC) que es eficaz en el tratamiento de la enfermedad y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa para solución intravenosa o un vial con un tapón perforable por una aguja hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un conjugado de anticuerpo con fármaco. La etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza para el tratamiento de la afección concreta, tal como el cáncer. De modo alternativo o adicional, el elemento de fabricación puede comprender un segundo (o tercer) envase que contiene una solución farmacéuticamente aceptable, como agua bacteriostática para inyección (BWI), una solución salina fosfatada, una solución de Ringer y una solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidas otras soluciones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Composiciones farmacéuticas:

[0099] En un aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los inmunoconjugados anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, se

proporciona un método para el tratamiento de un trastorno proliferativo de la células de próstata, pulmón, colon, vejiga o de ovario, o sarcoma de Ewing, en el cual dicho método comprende la administración a un sujeto de la composición farmacéutica. En una forma de realización, el cáncer de próstata, pulmón, colon, vejiga y ovario y un trastorno de proliferación celular de sarcoma de Ewing es una metástasis de un cancer

5 primario de próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario o sarcoma de Ewing. En una forma de realización, el trastorno de proliferación celular se asocia a un aumento de la expresión de STEAP-1 en la superficie de una célula.

[0100] En un aspecto, se proporciona un método para inhibir la proliferación celular, en el cual dicho método comprende la exposición de una célula a cualquiera de los inmunoconjugados anteriores en

10 condiciones que favorezcan la unión del inmunoconjugado a STEAP-1. En una forma de realización, la célula de próstata, pulmón, colon, vejiga o de ovario, o sarcoma de Ewing, es una célula tumoral. En una realización, la célula tumoral es una célula de un tumor de próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario o de un sarcoma de Ewing de un mamífero que sufre o se sospecha que sufre un trastorno de proliferación celular de próstata, pulmón, colon o vejiga o de un sarcoma de Ewing que incluye, aunque sin limitarse a ella, una

15 metástasis de un tumor cancerígeno primario de próstata, pulmón, colon o vejiga o de un sarcoma de Ewing. En una realización, la célula de próstata, pulmón, colon o vejiga o del sarcoma de Ewing es un xenotrasplante. En una forma de realización, la exposición se produce *in vitro*. En una forma de realización, la exposición se produce *in vivo*.

[0101] En un aspecto, se proporciona un método de utilización del anticuerpo anti-STEAP-1 para

20 efectuar un ensayo de suero soluble STEAP-1 en un mamífero que experimenta trastorno de la proliferación celular de próstata, pulmón o colon (o metástasis de la incidencia primaria de dicho trastorno), midiendo la progresión clínica o la regresión de las enfermedades, o evaluando la carga o recurrencia del tumor.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 [0102] La patente o archivo de solicitud contiene al menos, un dibujo ejecutado a color. Las copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo(s) a color, se proporcionará por la Oficina después de la petición y pago de las tasas necesarias.

[0103] **Figura 1** describe la secuencia de aminoácidos de la STEAP-1 humano (identificador de

30 secuencia n.º: 1) alineados con STEAP-1 del ratón y del mono cinomolgus (identificador de secuencias n.º 2 y 3 respectivamente). Los dominios extracelulares 1, 2 y 3 están identificados y marcados por recuadros sombreados.

[0104] **Figuras 2A y 2B:** La **Figura 2A** describe la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-STEAP-1 120.545 murino que se alinea con el anticuerpo quimérico (quimera 120) y anticuerpo humanizado (injerto 120) y con la secuencia del subgrupo humano III. Las CDR se muestran en un recuadro (CDR-L1, CDR-L2, and CDR-L3). Las secuencias que agrupan las CDR corresponden a las secuencias de estructuras (de FR-L1 a FR-L4). Las secuencias se enumeran de acuerdo con la numeración de Kabat. Las CDR de Kabat, Chothia y de contacto se indican en las CDR recuadradas. La **Figura 2B** describe la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-STEAP-1 murino (120.545) que se alinea con el anticuerpo quimérico (quimera 120) y el anticuerpo humanizado (injerto 120) y con la secuencia kappa humana I. Se prepararon variantes humanizadas 24, 37, 48, 67 y 37/48, 67, 71 y 78 realizando los siguientes cambios de aminoácidos: A24V, V37I, V48M, F67I y L78F en la cadena pesada del anticuerpo del injerto 120. Las CDR se muestran en recuadros. Las secuencias FR-H1, FR-H2, FR-H3 y FR-H4 agrupan las CDR (CDR-H1, CDR-H2, and CDR-H3). Las secuencias se enumeran de acuerdo con la numeración de Kabat. Las CDR de Kabat, Chothia y de contacto se indican en las CDR recuadradas.

[0105] Las **Figuras 3A y 3B** muestran secuencias de estructuras de consenso humanas pesadas variables (VH) del aceptor ejemplares para utilizar en la práctica de la invención con identificadores de secuencia tal como se indica a continuación, donde los números de identificadores de secuencia de estructuras se enumeran en el orden de FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4:

- estructura "A" de consenso del subgrupo I humano de VH menos las CDR de Kabat (identificadores de secuencia n.º: 26, 27, 28, 29).

- estructuras "B", "C" y "D" de consenso del subgrupo I humano de VH menos las regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia n.º: 30, 31, 28, 29; identificadores de secuencia n.º: 30, 31, 32, 29; e identificadores de secuencia n.º: 30, 31, 33, 29).

- estructura "A" de consenso del subgrupo II humano de VH menos las CDR de Kabat (identificadores de secuencia n.º: 34, 35, 36, 29).

- estructuras "B", "C" y "D" de consenso del subgrupo II humano de VH menos las regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia n.º: 37, 38, 36, 29; identificadores de secuencia n.º: 37, 38, 39, 29; e identificadores de secuencia n.º: 37, 38, 40, 29).

- estructura "A" de consenso del subgrupo III humano de VH menos las CDR de Kabat (identificadores de secuencia n.º: 41, 42, 43, 29).

- estructuras "B", "C" y "D" de consenso del subgrupo III humano de VH menos las regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia n.º: 44, 45, 43, 29; identificadores de secuencia n.º: 44, 45, 46, 29; e identificadores de secuencia n.º: 44, 45, 46, 29).

- estructura "A" del aceptor 1 humano de VH menos las CDR de Kabat (identificadores de secuencia n.º: 48, 42, 49, 29).

- estructuras "B" y "C" del aceptor humano de VH menos las regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia n.º: 44, 45, 49, 29; e identificadores de secuencia n.º: 44, 45, 50, 29).

5 - estructura "A" del aceptor 2 humano de VH menos las CDR de Kabat (identificadores de secuencia n.º: 48, 42, 51, 29).

- estructuras "B", "C" y "D" del aceptor 2 humano de VH menos las regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia n.º: 44, 45, 51, 29; identificadores de secuencia n.º: 44, 45, 52, 29; e identificadores de secuencia n.º: 44, 45, 53, 29).

10 [0106] Las **Figuras 4A y 4B** muestran secuencias de estructuras de consenso humanas ligeras variables (VL) del aceptor ejemplares para utilizar en la práctica de la invención con identificadores de secuencia tal como se indica a continuación:

- estructura de consenso del subgrupo I-1 kappa humano VL (κ v1-1): identificadores de secuencia n.º: 54, 55, 56, 57

15 - estructura de consenso del subgrupo I kappa humano de VL (κ v1): identificadores de secuencia n.º: 54, 58, 56, 57

- estructura de consenso del subgrupo II kappa humano de VL (κ v2): identificadores de secuencia n.º: 58, 59, 60, 57

20 - estructura de consenso del subgrupo III kappa humano de VL (κ v3): identificadores de secuencia n.º: 61, 62, 63, 57

- estructura de consenso del subgrupo IV kappa humano de VL (κ v4): identificadores de secuencia n.º: 64, 65, 66, 57.

25 [0107] La **Figura 5** representa las alineaciones de las secuencias de la región Fc de IgG humana de secuencia nativa, humIgG1 (alotipos no A, identificador de secuencia n.º: 85; y alotipos A, donde la secuencia de aminoácidos SREEM en el identificador de secuencia n.º: 85 cambia a SRDEL), humIgG2 (identificador de secuencia n.º 86), humIgG3 (identificador de secuencia n.º: 87) y humIgG4 (identificador de secuencia n.º: 88) con diferencias entre las secuencias marcadas con asteriscos. Los números sobre las secuencias representan el sistema de numeración EU. También se muestra un ejemplo de la región constante kappa.

30 [0108] Las **Figuras 6A-6D** representan un análisis FACS (Separador Celular Activado por Fluoresceína) normalizado para el nivel de expresión de cada anticuerpo o variante en el fago. La Figura 6A muestra variantes de FACS en el STEAP-1 con expresión celular (LB50) para cuatro ejemplos de

anticuerpos. La Figura 6B muestra variantes de FACS en el STEAP-1 sin expresión celular (S408) para varios anticuerpos como se indica en la figura y en el Ejemplo 1. Las Figuras 6C y 6D son alineaciones de variantes de FACS después de la normalización para los niveles de expresión en fagos.

[0109] Las Figuras 7A-7F representan gráficamente análisis FACS que muestran la unión de anticuerpos 24 anti-STEAP 1 de versión murina, quimérica y humanizada a STEAP-1 humano expresado en la superficie celular. Las Figuras 7A-7C indican que los anticuerpos murina 120, quimérica 120 y humanizada 120 v.24 del anti-STEAP-1 se unen al STEAP-1 humano y de mono cynomolgus, pero no al STEAP-1 de ratón. Las Figuras 7D-7F son diagramas de FACS que muestran la unión de anticuerpos (clon 67) de murina 120, quimérica 120 y humanizada 120 v. 24 a SEAP-1 humano expresado en la superficie celular. El STEAP-1 exógeno se expresó de manera estable en células 293 (denominadas células LB50) y en células PC3 (denominadas células PS5.4) (Figuras 7D y 7E), y se expresó endógenamente en células LNCaP BR (Figura 7F).

[0110] Figuras 8A y 8B. La Figura 8A es un gráfico que muestra que la administración de 120-MC-vc-PAB-MMAE anti-STEAP murino en 3 mg/kg fue eficaz en un modelo xenotrasplantado (células LNCaP-Ner) de tumor de próstata. Véase el Ejemplo 4. La Figura 8B es un gráfico que muestra que la administración de una dosis única del anticuerpo 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg), 120v.24-MC-MMAF (6 mg/kg) y 120v.24-MC-MMAF (12 mg/kg) anti-STEAP-1 humanizado, y de 120 MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) anti-STEAP-1 quimérico resultó eficaz en un modelo de tumor de próstata trasplantado de célula LNCaP. Véase el Ejemplo 4.

[0111] La Figura 9 es un gráfico que muestra que la administración del anticuerpo 120 MC-vc-PAB-MMAE quimérico anti-STEAP-1 (abreviado anti-STEAP vcMMAE) en 3 mg/kg, o de un MC-MMAF 120 quimérico STEAP-1 (abreviado anti-STEAP mcMMAF) en 6 mg/kg resultó eficaz en un modelo xenotrasplantado de cáncer de próstata de ratón beige SCID castrado trasplantado con células LNCaP. Véase el Ejemplo 4.

[0112] La Figura 10 es un gráfico que muestra que la administración del anticuerpo 120 MC-vc-PAB-MMAE quimérico anti-STEAP-1 (abreviado anti-STEAP vcMMAE (en 3 mg/kg) resultó eficaz en un modelo xenotrasplantado de cáncer de próstata de ratón macho beige SCID (andrógeno dependiente) trasplantado con células LuCap 77. Véase el Ejemplo 4.

[0113] La Figura 11 es un gráfico que muestra que la administración del anticuerpo 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE humanizado anti-STEAP-1 en 3 mg/kg, y del anticuerpo 120v.24-MC-MMAF humanizado anti-STEAP-1 en 6 mg/kg y 12 mg/kg a ratón beige SCID castrado trasplantado con tumor de próstata LuCap35V resultó eficaz en relación con los controles. Véase el Ejemplo 4.

[0114] La Figura 12 es un diagrama que representa al STEAP-1 embebido en una membrana celular. La unión del anticuerpo 120 anti-STEAP-1 depende de la conformación y no reconoce a un epítipo lineal de STEAP-1.

[0115] Las **Figuras 13A-13D** muestran al STEAP-1 expresado sobre la superficie de las células cuando es detectado mediante inmunohistoquímica. La **Figura 13A** muestra un tñido inmunohistoquímico de células 293 que expresan el STEAP-1 exógeno sobre la superficie celular. La **Figura 13B** muestra un tñido inmunohistoquímico de células PC3 que expresan el STEAP-1 exógeno sobre la superficie celular.

5 La **Figura 13C** muestra un tñido inmunohistoquímico de células LNCaP que expresan el STEAP-1 endógeno sobre la superficie celular. La **Figura 13D** muestra un tñido inmunohistoquímico de células LuCAP 77 que expresan el STEAP-1 endógeno sobre la superficie celular.

[0116] Las **Figuras 14A-14E** son gráficos que muestran la eficacia relativa del anticuerpo 120v.24-MCMMAF anti-STEAP-1 y del anticuerpo 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE anti-STEAP-1 para
10 destruir al STEAP-1 que se expresa en células in vitro. Las células PS5.4 (**Figura 14A**) son células PC3 transformadas con un vector que codifica a STEAP-1 tal como ese STEAP-1 se expresa en la superficie celular. Las células LB50 (**Figura 14B**) son células 293 transformadas con un vector que codifica a STEAP-1 tal como ese STEAP-1 se expresa en la superficie celular. Las células LNCaP (**Figura 14C**) expresan endógenamente a STEAP-1. "PC3 vec" (**Figura 14D**) y "293 vec" (**Figura 14E**) se refieren a las
15 células 293 y PC3, respectivamente, transformadas con un vector de control.

[0117] La **Figura 15** muestra las representaciones de los conjugados de anticuerpo anti-STEAP-1 diseñado con cisteína (ADC) con fármacos, donde una fracción del fármaco se une a un grupo diseñado con cisteína en: La cadena ligera (LC-ADC); la cadena pesada (HC-ADC) y la región Fc (Fc-ADC).

[0118] La **Figura 16** muestra los pasos para: (i) reducir los aductos de disulfuros de cisteína, las
20 intercadenas y los disulfuros de las intercadenas en un anticuerpo anti-STEAP-1 diseñado con cisteína (ThioMab) con un agente TCEP reductor (tris(2-carboxietil)fosfino hidrocloreuro); (ii) oxidar parcialmente, es decir, reoxidar para reformar la intercadena y los disulfuros de intercadenas con dhAA (ácido dehidroascórbico); y (iii) lograr la conjugación del anticuerpo reoxidado con un enlazador a fármaco intermedio para formar un conjugado de anticuerpo anti-STEAP-1 diseñado con cisteína con fármacos
25 (ADC).

[0119] Las **Figuras 17AC** muestran los sitios de sustitución de aminoácidos realizados para generar anticuerpos anti-STEAP-1 diseñados con cisteína (tio-anticuerpos monoclonales). La **Figura 17A** muestra la variante tio-LC de V205C con la correspondiente numeración secuencial y la numeración estandarizada de acuerdo con el sistema Kabat. La **Figura 17B** muestra la variante tio-HC de A118C con la
30 correspondiente numeración secuencial y la numeración estandarizada de acuerdo con el sistema de la UE. La **Figura 17C** muestra la variante tio-Fc de S400C con la correspondiente numeración secuencial y la numeración estandarizada de acuerdo con el sistema de la UE.

Las **Figuras 18A-F** representan análisis FACS que muestran que los conjugados de fármaco y anticuerpo tio anti-STEAP-1 (TDC) conservan la capacidad de unión a STEAP-1 expresado en la superficie

celular. Las **Figuras 18A-18C** son diagramas FACS que muestran la unión de 120-vc-PAB-MMAE (LCV205C) humano tio anti-STEAP-1 (abreviado como huSteap1 TDC (L205C) vcE y 120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (abreviado como huSteap1 TDC (HCA118C) vcE) humano tio a STEAP-1 expresado en la superficie celular. El STEAP-1 exógeno se expresó de manera estable en células 293 (denominadas células LB50) y en células PC3 (denominadas células PS5.4) (**Figuras 18A y 18B**), y se expresó endógenamente en células LNCaP BR (**Figura 18C**). Las **Figuras 18D, 18E y 18F** son alineaciones de las variantes FACS que se muestran en las **Figuras 7A, 7B y 7C**, respectivamente.

[0120] Las **Figuras 19A-C** muestran la eficacia relativa de los conjugados de fármaco y anticuerpo (TDC) 120-vc-PAB-MMAE (LCV205C) humano tio anti-STEAP-1 (LCV205C) (abreviado como huSteap1 TDC (L205C) vcE) y 120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (abreviado como huSteap1 TDC (HCA118C) vcE) humano tio para destruir la expresión de STEAP-1 en células in vitro. Las células LB50 (**Figura 19A**) son células 293 transformadas con un vector que codifica a STEAP-1 tal como ese STEAP-1 se expresa en la superficie celular. Las células PS5.4 (**Figura 19B**) son células PC3 transformadas con un vector que codifica a STEAP-1 tal como ese STEAP-1 se expresa en la superficie celular. Las células LNCaP (**Figura 19C**) expresan endógenamente a STEAP-1.

[0121] La **Figura 20** es un gráfico que muestra que la administración del anticuerpo 120-vc-PAB-MMAE humano tio anti-STEAP-1 (HCA118C) (abreviado hu Steap1 HC TDC vcE) en 3 mg/kg resultó eficaz en relación con los controles en un modelo xenotrasplantado de cáncer de próstata de ratón macho beige SCID (andrógeno dependiente) trasplantado con células LNCaP. Véase el Ejemplo 8.

[0122] La **Figura 21** es un gráfico que muestra que la administración de TDC anti-STEAP-1 120-vc-PAB-MMAE humano tio (HCA118C) (abreviado como hu Steap1 HC TDC vcE) en 3 mg/kg o de 120-MC-MMAF humano tio (HCA118C) (abreviado como hu Steap1 HC TDC mcF) en 1, 3 ó 6 mg/kg resultó eficaz en relación con los controles en un modelo xenotrasplantado de cáncer de próstata de ratón beige SCID macho (andrógeno dependiente) trasplantado con células LNCaP. Véase el Ejemplo 8.

[0123] La **Figura 22** es un gráfico que muestra que la administración de 120-vc-PAB-MMAE humano tio anti-STEAP-1 TDC (HCA118C) (abreviado hu Steap1 HC TDC vcE) en 3 mg/kg o de 120-MC-MMAF (HCA125C) (abreviado como hu Steap1 HC TDC mcF) humano tio en 3 ó 6 mg/kg resultó eficaz en relación con los controles en un modelo xenotrasplantado de cáncer de próstata de ratón beige SCID castrado trasplantado con tumor de próstata LuCaP 35V. Véase el Ejemplo 8.

[0124] La **Figura 23** muestra los sitios de sustitución de aminoácido hechos para generar el anticuerpo anti-STEAP-1 diseñado por ingeniería de cisteína (tio-mAb), designado "Simmons IV", o simplemente "SGIV". La secuencia de aminoácido de la cadena ligera de SGIV (SEC ID NO:90), se muestra en alineamiento con la cadena ligera del anticuerpo mu 120 (SEC ID NO. 89) y anticuerpo 120.v24 (SEC ID NO:91). La variante tio-LC de SGIV con la numeración secuencial correspondiente y numeración

estandarizada de conformidad con el sistema Kabat, se muestra alineada con el anticuerpo precursor mu 120, así como también con la variante tio-LC de 120.v24 con numeración secuencial correspondiente y numeración estandarizada, de conformidad con el sistema Kabat. Las CDR están enmarcadas (CDR-L1, CDR-L1 y CDR-L3). Las secuencias que encierran las CDR son las secuencias de estructura (FR-L1 a FR-L4). Las secuencias son numeradas de conformidad con la numeración de Kabat. Las CDR de Kabat, Chothia y de contacto, están indicadas alrededor de las CDR enmarcadas. Véase Ejemplo 9.

[0125] La **Figura 24** muestra los sitios de sustituciones de aminoácido de estructura para generar varias variantes de anticuerpos anti-STEAP-1 diseñados por ingeniería de cisteína (tio-mAb), de los anticuerpos SGIV y 120v.24. La secuencia de aminoácido de la cadena ligera de SGIV se muestra con numeración estandarizada de conformidad con el sistema de Kabat, en alineamiento con variantes LS.VLVH1 (SEC ID NO:92); LS.VLVH2 (SEC ID NO:93); LS.Q (SEC ID NO:94); y LS.CH1 (SEC ID NO:95). La secuencia de aminoácido de la cadena ligera de 120.v24 con numeración estandarizada de conformidad con el sistema Kabat, se muestra en alineamiento con variantes ED.FW1 (SEC ID NO:96); ED.FW2 (SEC ID NO:97); ED.FW3 (SEC ID NO:98); ED.all (SEC ID NO:99); ED.Pro (SEC ID NO:100); y ED.pl (SEC ID NO:101). Las CDR están enmarcadas. Las secuencias son numeradas de conformidad con la numeración de Kabat. Véase Ejemplo 9.

[0126] La **Figura 25** muestra trazos Scatchard de enlace anticuerpo a STEAP-1 expresados en la superficie de las células LNCaP.BR. Las muestras duplicadas fueron medidas usando el anticuerpo 120.v24 (Figuras 25(A)-(D)) y la variante SGIV (Figuras 25(E)-(H)). Véase Ejemplo 9.

[0127] La **Figura 26** muestra trazos Scatchard de enlace anticuerpo a STEAP-1 expresados en la superficie de las células 293.LB50. Las muestras duplicadas fueron medidas usando el anticuerpo 120.v24 (Figuras 26(A)-(D)) y la variante SGIV (Figuras 26(E)-(H)). Véase Ejemplo 9.

[0128] La **Figura 27** es una tabla que compara las afinidades de enlace promedio, medidas por el análisis Scatchard, para mu 1789, mu 120, quimera Fc, anticuerpos humanizados 120.v24, tio-120.v24 y tio-SGIV en células PC-3-PS5.4, 293-LB50 y LNCaP-BR, así como también en células 293 que expresan temporalmente STEAP-1. Véase Ejemplo 9.

[0129] La **Figura 28** representa un análisis FACS que muestra cambios FACS en células establemente transfectadas con STEAP-1 (293 STEAP-1 LB48, 293 STEAP-1 LB50 y 293 STEAP-1 LB53), con muestras de anticuerpo SGIV y 120.v24. Véase Ejemplo 9.

[0130] La **Figura 29** muestra el titulador de anticuerpo observado en diferentes colectadas de células que producen anticuerpo SGIV o 120.v24.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

[0131] Se proporcionan anticuerpos aislados que se unen a STEAP-1. Se proporcionan, además, inmunoconjugados que comprenden anticuerpos anti-STEAP-1. Los anticuerpos e inmunoconjugados de la invención son útiles, como por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de trastornos asociados a una expresión alterada, como por ejemplo, una expresión aumentada, de STEAP-1. En determinadas formas de realización, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención son útiles para el diagnóstico o tratamiento de un trastorno de proliferación celular, como un tumor o cáncer. En ciertas realizaciones, STEAP-1 se expresa en el tumor o cáncer del tejido de la próstata, del pulmón o del colon. En determinadas formas de realización, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención son útiles para la detección de STEAP-1, por ejemplo, STEAP-1 expresado en la superficie celular. En determinadas formas de realización, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención son útiles para la detección de la expresión STEAP-1 en la superficie de las células normales y/o tumorales o cancerosas de tejido de próstata, pulmón o colon.

[0132] Se proporcionan polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-STEAP-1. Se proporcionan vectores que comprenden polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-STEAP-1, así como células hospederas que comprenden dichos vectores. También se proporcionan composiciones, incluyendo las formulaciones farmacéuticas, que comprenden uno o más de los polinucleótidos, anticuerpos anti-STEAP-1 o inmunoconjugados de la invención.

[0133] Se ofrecen métodos para el tratamiento de un trastorno de proliferación celular incluido, pero sin limitarse al mismo, un tumor o un cáncer, con un anticuerpo anti-STEAP-1, un conjugado de fármaco y anticuerpo o un inmunoconjugado. Dichos métodos incluyen, aunque sin limitarse al mismo, el tratamiento de tumor o cáncer de próstata, pulmón o colon en un mamífero. Se ofrecen métodos para la detección de la expresión de STEAP-1 en un tejido celular utilizando un anticuerpo anti-STEAP-1, un conjugado de fármaco y anticuerpo o un inmunoconjugado. Dichos métodos incluyen, aunque sin limitarse a la misma, la detección de la expresión de STEAP-1 en, como un ejemplo no limitante, una célula normal, una célula tumoral o una célula cancerosa de próstata, pulmón o colon.

Técnicas generales

[0134] Las técnicas y procedimientos descritos o remitidos en la presente memoria descriptiva por lo general se conocen bien y se emplean habitualmente con la metodología tradicional utilizada por los expertos en la materia, como por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3.^a edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, y col. eds., (2003)); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *Pcr 2: A Practical Approach* (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*,

and *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, y D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley y Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis y col., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan y col., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V. T. DeVita y col., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

15 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Definiciones

[0135] Un anticuerpo "aislado" es aquél que se ha identificado y separado, y/o recuperado, a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir en la investigación, el diagnóstico o los usos terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos y no proteínicos. En algunas formas de realización, un anticuerpo se purificará (1) en más del 95% de su peso tal como se determina, por ejemplo, por el método de Lowry, y en algunas formas de realización, en más del 99% de su peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante, por ejemplo, un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta alcanzar la homogeneidad mediante SDS-PAGE, en condiciones reductoras o no reductoras, empleando, por ejemplo, la tinción con azul de Coomassie o plata. Los anticuerpos aislados incluyen el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. En cualquier caso, normalmente, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

[0136] Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se separa de al menos una de las otras moléculas de ácido nucleico con las que se asocia habitualmente, por ejemplo, en su entorno natural. Una molécula aislada de ácido nucleico incluye, además, una molécula de ácido nucleico contenida en células que habitualmente expresan la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica diferente de su ubicación cromosómica natural.

[0137] Por "purificada" se entiende una molécula que está presente en una muestra a una concentración de al menos el 95% de su peso, o al menos el 98% del peso de la muestra en la que está contenida.

5 [0138] Las frases "sustancialmente similar" o "sustancialmente el/la mismo(a)", tal y como se usan en la presente memoria descriptiva, indican un grado suficientemente elevado de similitud entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado a un anticuerpo de la invención y el otro asociado a un anticuerpo de control/referencia), de forma que alguien experto en la materia consideraría la diferencia entre los dos valores de escasa o ninguna significación estadística o biológica, o ambos, dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd). La diferencia entre dichos
10 dos valores es, por ejemplo, inferior al 50% aproximadamente, al 40% aproximadamente, al 30% aproximadamente, al 20% aproximadamente y/o al 10% aproximadamente como función del valor para la molécula de control/referencia.

15 [0139] Las frases "sustancialmente reducido(a)", "sustancialmente diferente", tal y como se usan en la presente memoria descriptiva, indican un grado suficientemente elevado de diferencia entre dos valores numéricos (por lo general, uno asociado a una molécula y el otro asociado a una molécula de control/referencia), de forma que alguien experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene una significación estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, superior
20 al 10% aproximadamente, al 20% aproximadamente, al 30% aproximadamente, al 40% aproximadamente y/o al 50% aproximadamente como función del valor para la molécula de control/referencia.

[0140] En la presente memoria descriptiva, por "vector" se entiende una molécula de un ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que hace referencia a un ADN circular de doble cadena al que se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector fágico. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que segmentos
25 adicionales de ADN se pueden ligar al genoma vírico. Algunos vectores tienen capacidad de replicación autónoma en una célula hospedera en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales en mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales en mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedera al introducirse en ésta y, de este modo, se replican al mismo tiempo que el genoma del hospedero. Asimismo,
30 existen vectores capaces de dirigir la expresión de genes a los que están enlazados por su función. Estos vectores se denominan en la presente memoria descriptiva "vectores de expresión recombinantes" o simplemente "vectores recombinantes". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante tienen con frecuencia la forma de plásmidos. En la presente especificación, los

términos "plásmido" y "vector" son intercambiables, dado que el plásmido es la forma de vector más frecuentemente usada.

[0141] En la presente memoria descriptiva, "polinucleótido" o "ácido nucleico" son términos que se utilizan indistintamente y se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar a un polímero mediante ADN o ARN polimerasa o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede incluir nucleótidos modificados tales como nucleótidos metilados y sus análogos. De estar presente, la modificación de la estructura del nucleótido se puede producir antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede comprender una o más modificaciones realizadas tras síntesis, como conjugación a un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "cofias", sustitución de uno o más de los nucleótidos que se producen de forma natural por un análogo; modificaciones de enlaces internucleótidos, como aquellas en las que intervienen enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.); las que contienen porciones colgantes, como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, poli-L-lisina, etc.); las que contienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.); las que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.); las que contienen alquilantes; las que contienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa, etc.), así como formas no modificadas de polinucleótido(s). Asimismo, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en los azúcares puede sustituirse, por ejemplo, por grupos de fosfonatos, grupos fosfatos, protegerse mediante grupos protectores estándar, o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o puede conjugarse a soportes sólidos o semisólidos. El OH terminal 5' y 3' puede fosforilarse y sustituirse por aminas o porciones de grupos orgánicos en casquete (capping) de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidos en la materia; por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-allyl-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosas, azúcares furanosas, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos nucleósidos básicos como metil ribosida. Uno o más enlaces de fosfodiéster pueden sustituirse por otros grupos de enlace alternativos. Estos grupos alternativos de enlace incluye formas de realización en las que el fosfato se sustituye por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR₂" ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), donde cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (de 1 °C a 20 °C) que contiene opcionalmente un enlace a éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o aradilo. No todos los enlaces en un polinucleótido tienen que ser idénticos. La descripción anterior se

aplica a todos los polinucleótidos mencionados en la presente memoria descriptiva, incluyendo el ARN y el ADN.

[0142] En la presente memoria descriptiva, "oligonucleótido" se refiere por lo general a polinucleótidos cortos, habitualmente de cadena única y sintéticos que suelen tener una longitud inferior a 200 nucleótidos, aunque no necesariamente. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no se excluyen mutuamente. La descripción anteriormente incluida sobre polinucleótidos es aplicable igualmente y en su integridad a los oligonucleótidos.

[0143] "El Porcentaje (%) de identificación de la secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptidos de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identificación de la secuencia y no considerar ninguna sustitución conservadora parte de la identificación de la secuencia. A efectos de determinar el porcentaje de identificación de la secuencia de aminoácidos, la alineación se puede conseguir de varias formas que son conocidas en la materia; por ejemplo, usar software comercializado como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para la alineación de secuencias, incluyendo los algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, a efectos de la presente memoria descriptiva, los valores porcentuales de identificación de la secuencia de aminoácidos se generan utilizando el software de comparación de secuencias ALIGN-2. Dicho software fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente ha sido presentado, junto con la documentación del usuario, en la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington D.C., 20559, donde está inscrito con el n.º de Registro de Derechos de Autor de Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está comercializado por Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. Este programa debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. El programa ALIGN-2 define todos los parámetros de comparación de secuencias, que no varían.

[0144] En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el porcentaje de identificación de la secuencia de aminoácidos de una determinada secuencia aminoacídica A con respecto a una determinada secuencia aminoacídica B (lo que también se puede expresar diciendo que una determinada secuencia aminoacídica A tiene o contiene un porcentaje concreto de identificación de la secuencia aminoacídica con respecto a una determinada secuencia aminoacídica B) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

en la que X es la cantidad de residuos de aminoácidos establecidos como coincidencia total por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación hecha por ese programa de A y B, y en la que Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Se detectará que, cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el porcentaje de identificación de la secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al porcentaje de identificación de la secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se indique lo contrario, todos los valores del porcentaje de la identidad de la secuencia de aminoácidos usados en la presente memoria descriptiva se obtienen como se han descrito en el párrafo anterior, utilizando el programa informático ALIGN-2.

[0145] En la presente memoria descriptiva, "STEAP-1" se refiere a cualquier STEAP-1 nativo procedente de vertebrados, incluyendo mamíferos como primates (por ejemplo, humanos, monos cinomolgus) y roedores (por ejemplo, ratas y ratones), a menos que se especifique lo contrario. El término engloba STEAP-1 no procesado de "longitud completa", así como cualquier forma de STEAP-1 que derive del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes de STEAP-1 presentes naturalmente, por ejemplo, variantes de ajuste, variantes alélicas o isoformas. La secuencia de aminoácidos del STEAP-1 humana se describe en la Figura 1 (identificador de frecuencia nº 1). En una forma de realización, el STEAP-1 se expresa en la superficie celular, como por ejemplo, en la superficie de una célula normal de próstata, pulmón o colon y ha aumentado la expresión en células cancerosas de próstata, pulmón o colon o metástasis de dichas células cancerosas. La Figura 1 también muestra la secuencia de aminoácidos del STEAP-1 de ratones y del mono cinomolgus (identificador de frecuencia nº 2 y 3 respectivamente).

[0146] Los "anticuerpos" (Ab) e "inmunoglobulinas" (Ig) son glicoproteínas que tienen características estructurales similares. Mientras que los anticuerpos presentan especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que por lo general no presentan especificidad a antígenos. Por ejemplo, los polipéptidos de la última clase se producen a niveles bajos en el sistema linfático y a niveles mayores por los mielomas.

[0147] Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales intactos o de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos monovalentes, anticuerpos polivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos en tanto en cuanto presenten la actividad biológica deseada) y también pueden incluir determinados fragmentos de anticuerpos (tal como se describe en mayor detalle en la presente memoria descriptiva). Un anticuerpo puede ser quimérico, humano, humanizado o con afinidad madurada, o todos los anteriores.

[0148] Por "anticuerpo anti-STEAP-1" o "anticuerpo que se une a STEAP-1" se entenderá un anticuerpo con capacidad de unión a STEAP-1, con suficiente afinidad para que dicho anticuerpo sea útil

como agente diagnóstico o terapéutico, o ambos, para actuar contra STEAP-1. Preferiblemente, el alcance de la unión de un anticuerpo anti-STEAP-1 a una proteína no afín no relacionada con STEAP-1 presenta menos de un 10% aproximadamente de unión del anticuerpo a STEAP-1, según medición, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo (RIA). En ciertas formas de realización, un anticuerpo que se une a STEAP-1 tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$. En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-STEAP-1 se une a un epítipo de STEAP-1 que se conserva entre los STEAP-1 de distintas especies.

[0149] Por "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se entienden los dominios amino terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede referir como "VH". El dominio variable de la cadena ligera se puede referir como "VL". Estos dominios suelen ser las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

[0150] El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en sus secuencias de un anticuerpo a otro y se utilizan para la unión y especificidad de cada anticuerpo en particular con relación a su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones de determinación de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables (HVR) de los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se llaman regiones de estructura (FR). Cada dominio variable de las cadenas pesada y ligera nativas comprende cuatro FR que, en gran parte, adoptan una configuración de hoja- β , conectadas por tres CDR, que crean bucles que conectan la estructura de la hoja- β , y en algunos casos forman parte de ella. Las CDR de cada cadena se mantienen unidas y en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, junto a las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero desarrollan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos.

[0151] Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier vertebrado pueden asignarse a una de dos clases claramente diferenciadas, denominadas kappa (κ) y lambda (λ), en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

[0152] Según las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) pueden asignarse a distintas clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden seguir dividiéndose en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las distintas clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las distintas clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y se describen de forma general, por ejemplo, en Abbas y col., *Cellular and Mol. Immunology*, 4.^a ed. (2000). Un anticuerpo puede formar parte de una molécula de fusión más amplia, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo a una o más proteínas o péptidos.

[0153] En la presente memoria descriptiva, los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo entero" se usan indistintamente para hacer referencia a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no así a fragmentos de anticuerpo definidos a continuación. Estos términos hacen referencia en concreto a un anticuerpo con cadenas pesadas que contiene la región Fc.

[0154] Los "fragmentos de anticuerpos" contienen únicamente una porción de un anticuerpo intacto, en la que la porción conserva al menos una, aunque también puede conservar la totalidad o la mayoría, de las funciones normalmente asociadas a esa porción cuando está presente en un anticuerpo intacto. En una forma de realización, un fragmento de anticuerpo contiene un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, de este modo, conserva la capacidad para unirse al antígeno. En otra forma de realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que contiene la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas habitualmente asociadas a la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, como la unión a FcRn, la modulación de la semivida del anticuerpo, la función de la ADCC y la unión a complemento. En una forma de realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que *in vivo* tiene una semivida sustancialmente similar a la de un anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de este tipo puede contener un brazo de unión a antígeno enlazado a una secuencia Fc capaz de dar estabilidad *in vivo* al fragmento.

[0155] La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno de ellos con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y aún es capaz de establecer un enlace cruzado con el antígeno.

[0156] El "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de unión a antígeno. En una forma de realización, una especie Fv de dos cadenas está compuesta por un dímero de un dominio variable de cadena pesada y otro de cadena ligera en una estrecha asociación no covalente. En una especie Fv de cadena única (scFv), un dominio variable de cadena pesada y otro de cadena ligera se pueden enlazar covalentemente mediante un enlazador peptídico flexible, de forma que las cadenas pesada y ligera se asocien en una estructura "dimérica" análoga a la presente en una especie Fv de dos cadenas. En esta configuración, las tres regiones CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones CDR confieren al

anticuerpo una especificidad de unión a antígeno. No obstante, incluso un dominio variable simple (o la mitad de un Fv que comprenda únicamente tres regiones CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer un antígeno y unirse a él, aunque con una afinidad inferior a la del sitio de unión completo.

- 5 [0157] El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de un anticuerpo. Fab'-SH es la denominación que se da en la presente memoria descriptiva al Fab' en el que
- 10 el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes presenta(n) un grupo tiol libre. Los fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' con cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

- 15 [0158] Los fragmentos "Fv de cadena única" o "scFv" de un anticuerpo comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo presentes en una cadena simple de polipéptidos. Por lo general, el polipéptido scFv comprende también un enlazador de polipéptidos entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, págs. 269-315 (1994).

- 20 [0159] El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptidos (VH-VL). Mediante el uso de un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, estos dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos
- 25 se describen con más detalle, por ejemplo, en la patente europea EP 404.097; el documento WO93/1161; Hudson y col. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134; y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson y col. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

- 30 [0160] En la presente memoria descriptiva, "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, que los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos, excepto en posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de formación natural que podrían estar presentes en cantidades insignificantes. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo, que consiste en que no es una mezcla de anticuerpos discretos. En determinadas formas de realización, dicho anticuerpo monoclonal incluye típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en la que la

secuencia polipeptídica de unión a dicha diana se obtuvo mediante un procedimiento que incluye la selección de una sola secuencia polipeptídica de unión a la diana a partir de muchas secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un solo clon a partir de muchos clones, como un conjunto de clones de hibridoma, clones fágicos o clones de ADN

5 recombinante. Es conveniente saber que una secuencia seleccionada de unión a la diana puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad para la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en cultivos celulares, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprenda la secuencia de unión a la diana alterada es, además, un anticuerpo monoclonal de esta invención. En contraste con las preparaciones de
10 anticuerpos policlonales que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un solo determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que no suelen estar contaminadas por otras inmunoglobulinas.

15 [0161] El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo, que consiste en que se ha obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que sea necesario producir el anticuerpo por algún procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilicen de conformidad con la presente invención pueden obtenerse a partir de diversas técnicas, incluyendo, por ejemplo, el procedimiento del hibridoma (por ejemplo, Kohler y col.,
20 *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.^a ed. 1988); Hammerling y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), los métodos del ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.816.567), las tecnologías de reproducción de imágenes de fagos (véase, por ejemplo, Clackson y col.,
25 *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu y col., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee y col., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee y col., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004), y técnicas para producir anticuerpos humanos o semejantes a los humanos en animales que tienen partes o la totalidad de los loci de la inmunoglobulina humana o los genes que codifican las secuencias de la
30 inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, el documento WO98/24893; el documento WO96/34096; el documento WO96/33735; el documento WO91/10741; Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann y col., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); las patentes de EE.UU. N.º 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; Marks y col., *Bio. Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg y col., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild y col., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

[0162] En la presente memoria descriptiva, los anticuerpos monoclonales incluyen específicamente los anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada o ligera, o ambas, es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de una especie en particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. N.º 4.816.567 y Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)).

[0163] Las formas "humanizadas" de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En una forma de realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos procedentes de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), como ratón, rata, conejo o primates no humanos, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de estructura (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por sus correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentren en el anticuerpo receptor o donante. Estas modificaciones se pueden llevar a cabo para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables, o al menos uno, y típicamente dos, en los que todos, o sustancialmente todos, los bucles hipervariables correspondan a los de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las FR sean las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente humana. Para obtener más detalles, véase Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986), Riechmann y col., *Nature*, 332:323-329 (1988) y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos y las referencias citadas en éstos: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

[0164] Un "anticuerpo humano" es aquel que contiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o que se ha producido utilizando cualquiera de las técnicas para producción de anticuerpos humanos expuestas en la presente memoria descriptiva. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que contenga residuos de unión a antígeno no humanos.

[0165] En la presente memoria descriptiva, por "región hipervariable", "HVR" o "HV" se entienden las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en su secuencia y/o

forman bucles estructuralmente definidos. Por lo general, los anticuerpos contienen seis regiones hipervariables: tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). En anticuerpos nativos, H3 y L3 muestran la máxima diversidad en las seis regiones hipervariables y se cree que H3 en concreto desempeña un papel único en otorgar una buena especificidad a los anticuerpos. Xu y col. (2000) *Immunity* 13:37-45; Johnson y Wu (2003) en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ). De hecho, los anticuerpos de camélidos que se producen naturalmente y están formados por una cadena pesada son sólo funcionales y estables en ausencia de la cadena ligera. Hamers-Casterman y col. (1993) *Nature* 363:446-448; Sheriff y col. (1996) *Nature Struct. Biol.* 3:733-736.

[0166] En la presente memoria descriptiva se usan y engloban diversas delineaciones de regiones hipervariables. Las regiones de determinación de complementariedad (CDR) de Kabat están basadas en la variabilidad de las secuencias y son las más frecuentemente usadas (Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia, en cambio, se refiere a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de AbM representan una solución intermedia entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y se utilizan en el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables "de contacto" se basan en un análisis de las estructuras de cristales complejos disponibles. Los residuos procedentes de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto	
---	-----	---	-----	-----	
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36	
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55	
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96	
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B	(Numeración de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35	(Numeración de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58	
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101	

[0167] Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables ampliadas" como se indica a continuación: 24-36 ó 24-34 (L1), 46-56 ó 50-56 (L2) y 89-97 ó 89-96 (L3) en la VL y 26-35 ó 26-35A (H1), 50-65 ó 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 ó 95-102 (H3) en la VH. Los residuos de dominio variable se numeran según Kabat y col., mencionado anteriormente, para cada una de estas definiciones. Las regiones hipervariables HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3 de los anticuerpos himanizados anti-STEAP-1 120v.24 de la invención son H26-H35A, H49-H6 y H95-H102 según la numeración de Kabat. Las regiones hipervariables HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de los anticuerpos 120v.24 anti-STEAP-1 humanizados de la

138

invención son L24-34, L50-56 y L89-97 utilizando la numeración de Kabat. En esta memoria descriptiva los términos "HVR" y "CDR" se emplean de manera intercambiable.

[0168] Los residuos de una "estructura" o "FR" son aquellos residuos de un dominio variable distintos de los de una región hipervariable, tal como se define en la presente memoria descriptiva.

5 [0169] El término "numeración de residuos de dominio variable como en Kabat" o "numeración de la posición de los aminoácidos como en Kabat", y las variaciones de éstos, se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Utilizando este sistema
10 de numeración, la secuencia lineal real de aminoácidos puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que correspondan a un acortamiento de una FR o HVR del dominio variable o a una inserción en ellas, respectivamente. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácidos (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc., según Kabat) después de un residuo 82 de la FR de la cadena
15 pesada. La numeración de Kabat de los residuos puede estar determinada para un anticuerpo dado por una alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia "estándar" numerada según Kabat.

[0170] Un anticuerpo con "maduración de afinidad" es aquél con una o más alteraciones en una o más HVR de éste que dan lugar a una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación
20 con un anticuerpo parental que no incluye dicha(s) alteración(es). En una forma de realización, un anticuerpo con maduración de afinidad presenta afinidades nanomolares e incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos con maduración de afinidad se producen mediante procedimientos bien conocidos en la materia. En Marks y col., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992), se describe la maduración de afinidad mediante la transposición de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de la HVR y/o
25 los residuos estructurales se describen en: Barbas y col. *Proc Nat. Acad. Sci, USA*, 91:3809-3813 (1994), Schier y col., *Gene*, 169:147-155 (1995), Yelton y col., *J. Immunol.*, 155:1994-2004 (1995), Jackson y col., *J. Immunol.*, 154(7):3310-9 (1995) y Hawkins y col., *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992).

[0171] Un anticuerpo "de bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Algunos anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas
30 inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

[0172] En la presente memoria descriptiva, un "anticuerpo agonista" es un anticuerpo que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

[0173] Las "funciones efectoras" de un anticuerpo hacen referencia a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de una secuencia nativa o una región Fc variable de una secuencia aminoacídica) de un anticuerpo y pueden variar con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de un anticuerpo incluyen: La unión de C1q y la citotoxicidad dependiente de complemento, la unión de receptores de Fc, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis, la regulación a la baja de los receptores en la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B) y la activación de las células B.

[0174] Los términos "receptor de Fc" o "FcR" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas formas de realización, un FcR es un FcR nativo humano. En algunas formas de realización, un FcR es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye las subclases de receptores FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluidas las variantes alélicas y las formas con ajuste alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen el FcγRIIA (un "receptor activador") y el FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), los cuales tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor activador FcγRIIA contiene en su dominio citoplasmático un motivo activador inmunorreceptor basado en la tirosina (ITAM). El receptor promotor FcγRIIB contiene en su dominio citoplasmático un motivo inhibidor inmunorreceptor basado en la tirosina (ITIM). (Véase Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). En Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991), Capel y col., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994) y de Haas y col., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995) también se revisan los FcRs. Otros FcR, incluidos aquellos que se identifiquen en el futuro, se engloban en el término "FcR" empleado en la presente memoria descriptiva.

[0175] El término "receptor Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer y col., *J. Immunol.*, 117:587 (1976) y Kim y col., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)) y de la regulación de la homeostasis de las inmunoglobulinas. Se conocen los métodos de medición de la unión al FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie 1997, Hinton 2004). La unión al FcRn humano *in vivo* y la semivida sérica de los polipéptidos de unión al FcRn humano de alta afinidad pueden analizarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan el FcRn humano, o en primates a los que se administran polipéptidos de variante Fc.

[0176] El documento WO00/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpos con capacidad de unión a los FcRs mejoradas o disminuidas. El contenido de esta publicación de patente se incorpora específicamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Véase, además, Shields y col., *J. Biol. Chem.*, 9(2): 6591-6604 (2001).

[0177] Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. En determinadas formas de realización, las células expresan al menos el FcγRIII y realizan la función o funciones efectoras de ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median en la

ADCC serían las células mononucleares de la circulación periférica (PBMC), las células asesinas naturales (NK), los monocitos, las células T citotóxicas y los neutrófilos. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

5 [0178] La "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual una IgG secretada y unida a los receptores Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) posibilita que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porte un antígeno y, posteriormente, destruyan dicha célula diana con citotoxinas. Las células primarias para mediar en la ADCC, células NK, expresan sólo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII.

10 La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). A fin de evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, como el que se describe en las patentes de EE.UU. N.º 5.500.362 ó 5.821.337, o se puede realizar el ensayo de Presta que se describe en la patente de EE.UU. N.º 6.737.056. Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se encontrarán las células sanguíneas

15 mononucleares periféricas (PBMC) y las asesinas naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal como el que se desvela en Clynes y col., *PNAS (EE.UU.)* 95:652-656 (1998).

[0179] La "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La vía clásica de activación del complemento se inicia por la unión

20 del primer componente del sistema del complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno cognado. A fin de evaluar la activación del complemento, se puede efectuar un ensayo de CDC, como por ejemplo, el que se describe en Gazzano-Santoro y col., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996).

[0180] Las variantes polipeptídicas con secuencias aminoacídicas de la región Fc alteradas y capacidad aumentada o disminuida de unión a Cq1 se describen en la patente de EE.UU. N.º 6.194.551B1 y el documento WO99/51642. El contenido de dichas publicaciones de patentes se incorpora específicamente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Véase, además, Idusogie y col., *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

25

[0181] Por "polipéptido que comprende una región Fc" se entiende un polipéptido, como un anticuerpo o una inmunoadhesina, que comprende una región Fc. La lisina en el extremo C terminal (residuo 447 según el sistema de numeración de EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o recombinando el ácido nucleico que codifica el polipéptido. Por lo tanto, una composición que contenga un polipéptido con una región Fc según esta invención puede comprender

30

polipéptidos con el K447, con todos los K447 eliminados, o una mezcla de polipéptidos con el residuo K447 o sin él.

[0182] A efectos de la presente memoria descriptiva, una "estructura humana del aceptor" es una estructura que comprende la secuencia aminoacídica de una estructura de VL o VH derivada de una estructura de inmunoglobulinas humanas, o de una estructura de consenso humana. Una estructura humana del aceptor "derivada de" una estructura de inmunoglobulinas humanas o una estructura de consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de éstas o puede contener cambios preexistentes en la secuencia de aminoácidos. En algunas formas de realización, el número de cambios preexistentes en la secuencia de aminoácidos es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En el caso de que haya cambios preexistentes de aminoácidos en una VH, estos cambios, preferentemente, se dan sólo en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos de aminoácidos en estas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una forma de realización, la estructura humana de VL del aceptor tiene una secuencia idéntica a la de la estructura de VL de la inmunoglobulina humana o a la estructura de consenso humana.

[0183] Una "estructura de consenso humana" es una estructura que representa los residuos de aminoácidos más frecuentes en una selección de secuencias de estructura de VL o VH de inmunoglobulina humana. Por lo general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana se realiza en un subgrupo de secuencias de dominio variable. Por lo general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una forma de realización, para VL, el subgrupo es un subgrupo kappa I como en Kabat y col., mencionado anteriormente. En una forma de realización, para VH, el subgrupo es un subgrupo III como en Kabat y col., mencionado anteriormente.

[0184] Una "estructura de consenso del subgrupo III de VH" comprende la secuencia de consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III variable pesado de Kabat y col., mencionado anteriormente. En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos de la estructura de consenso del subgrupo III de VH comprende al menos una parte, o la totalidad, de las siguientes secuencias:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (FR-H1, identificador de secuencia n.º: 21)-HVR-H1-
WVRQAPGKGLEWV (FR-H2, identificador de secuencia n.º: 22)-HVR-H2-
RFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (FR-H3, identificador de secuencia n.º: 23)-HVR-H3-
WGQGTLVTVSS (FR-H4, identificador de secuencia n.º: 24).

[0185] Una "estructura de consenso del subgrupo I de VL" comprende la secuencia de consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa variable ligero de Kabat y col., mencionado anteriormente. En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos de la estructura de consenso del subgrupo I de VH comprende al menos una parte, o la totalidad, de las siguientes secuencias:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC (FR-L1, identificador de secuencia n.º: 17)-HVR-L1-
WYQQKPGKAPKLLIY (FR-L2, identificador de secuencia n.º: 18)-HVR-L2-
GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (FR-L3, identificador de secuencia n.º: 19)-HVR-L3-
FGQGTKVEIKR (FR-L4, identificador de secuencia n.º: 20). Una "secuencia de señal de la secreción" o

5 "secuencia de señal" se refiere a la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de señal corta que puede utilizarse para dirigir una proteína de interés recientemente sintetizada a través de una membrana celular, generalmente la membrana interna o ambas membranas, tanto la interna como la externa, de las procariotas. Como tal, la proteína de interés, como por ejemplo el polipéptido de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, se secreta en un periplasma de las células hospederas procarióticas o en el medio de cultivo. El péptido de señal que se codifica mediante la secuencia de señal de la secreción puede ser
10 endógeno o exógeno para las células hospederas, incluyendo los péptidos de señal propios de los polipéptidos que se expresarán. Las secuencias de señal de la secreción generalmente se encuentran presentes en el extremo amino de un polipéptido que se expresará, y por lo general se eliminan enzimáticamente del citoplasma entre la biosíntesis y la secreción de un polipéptido. Por lo tanto, el
15 péptido de señal normalmente no se encuentra presente en una proteína madura.

[0186] Un "aminoácido de cisteína libre" se refiere a un residuo de aminoácido cisteína diseñado para obtener un anticuerpo progenitor que tiene un grupo funcional tiol (-SH) y no está acoplado a, o a una parte de, un puente disulfuro intramolecular o intermolecular.

[0187] El término "valor de reactividad del tiol" es una caracterización cuantitativa de la
20 reactividad de los aminoácidos de cisteína libre. El valor de reactividad del tiol es el porcentaje de un aminoácido de cisteína presente en un anticuerpo diseñado con cisteína que reacciona con un reactivo tiol-específico y convertido a un valor máximo de 1. Por ejemplo, un aminoácido de cisteína libre en un anticuerpo diseñado con cisteína que reacciona en 100% de producto con un reactivo tiol-específico, como por ejemplo un reactivo biotina-maleimida, para formar un anticuerpo denominado biotina tiene un valor
25 de reactividad del tiol de 1,0. Otro aminoácido cisteína diseñado en el mismo o en otro anticuerpo progenitor que reacciona en 80% de producto con un reactivo tiol-específico tiene un valor de reactividad del tiol de 0,8. Otro aminoácido cisteína diseñado en el mismo o en otro anticuerpo progenitor que no logra en absoluto reaccionar con un reactivo tiol-específico tiene un valor de reactividad del tiol de 0. La determinación del valor de reactividad del tiol de una cisteína específica puede realizarse mediante ensayo
30 ELISA, espectroscopía de masas, cromatografía líquida, autorradiografía u otras pruebas analíticas cuantitativas. Entre los reactivos tiol-específicos que permiten la captura del anticuerpo diseñado con cisteína y la comparación y cuantificación de la reactividad de la cisteína se incluyen biotina-PEO-maleimida ((+)-biotinil-3-maleimidopropionamidil-3,6-dioxaoctainodiamina, Oda et al (2001) *Nature Biotechnology* 19:379-382 (Pierce Biotechnology, Inc.), Biotina-BMCC, PEO-Yodoacetyl Biotina,

Yodoacetil-LC-Biotina y Biotina-HPDP (Pierce Biotechnology, Inc.), y Na-(3-maleimidilpropionil)biocitina (MPB, Molecular Probes, Eugene, OR). Otras fuentes comerciales para la obtención de reactivos de ligandos de biotinilación, bifuncionales o multifuncionales incluyen a Molecular Probes, Eugene, OR y Sigma, St. Louis, MO.

5 [0188] Un "anticuerpo progenitor" es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácido a partir de la cual uno o más residuos de aminoácido son sustituidos por uno o más residuos de cisteína. El anticuerpo progenitor puede comprender una secuencia nativa o natural. El anticuerpo progenitor puede tener modificaciones de la secuencia de aminoácido preexistente (como por ejemplo adiciones, eliminaciones y/o sustituciones) relacionadas con otro tipo nativo, natural o formas modificadas de un anticuerpo. Un anticuerpo progenitor puede dirigirse contra un antígeno objetivo de interés, p.ej. un polipéptido biológicamente importante. También se contemplan los anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipéptidos (como los antígenos glicolípidos asociados a un tumor; véase 5091178 de EE.UU.).

15 [0189] Por "afinidad de unión" generalmente se entiende la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su molécula de enlace (por ejemplo, un antígeno). A menos que se especifique lo contrario, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, por "afinidad de unión" se entiende la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su molécula de enlace Y se puede representar por lo general mediante la constante de disociación (K_d). La afinidad se puede medir mediante métodos habituales conocidos en la especialidad, incluidos los descritos en la presente memoria descriptiva. Los anticuerpos de baja afinidad suelen unirse al antígeno lentamente y suelen disociarse de inmediato, mientras que los anticuerpos de alta afinidad por lo general se unen al antígeno más rápidamente y suelen permanecer unidos durante más tiempo. Existen diversos métodos para medir la afinidad de unión conocidos en la especialidad y todos ellos se pueden utilizar para los fines de la presente invención. A continuación, se describen, a modo de ejemplo, formas de realización específicas.

25 [0190] En una forma de realización, el " K_d " o el "valor K_d " según esta invención se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno, como se describe en el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de Fab a antígenos se mide equilibrando los Fab con una concentración mínima del antígeno marcado (^{125}I) en presencia de una serie de titulación de antígeno no marcado y, después, capturando el antígeno unido con una placa de anticuerpo de revestimiento anti-Fab (Chen, y col., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). Para establecer las condiciones del ensayo, las placas de microtitulación (Dynex) se recubren durante toda la noche con 5 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato sódico (pH 9,6) y, a continuación, se bloquean con 2% (p/v) de albúmina de suero bovino en PBS durante dos a cinco

horas a temperatura ambiente (23 °C aproximadamente). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), 100 pM o 26 pM de antígeno marcado con [¹²⁵I] se mezclan con diluciones seriadas de un Fab de interés (por ejemplo, que concuerde con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta y col., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). A continuación, el Fab de interés se incuba durante toda la noche; no

- 5 obstante, la incubación puede continuar durante más tiempo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcance el equilibrio. Después, las mezclas se transfieren a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se extrae la solución y se lava la placa ocho veces con Tween-20 al 0,1% en PBS. Una vez secas las placas, se añaden 150 µl/pocillo de centelleador (MicroScint-20; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma
- 10 Topcount (Packard) durante diez minutos. Se eligen concentraciones de cada Fab que proporcionen menos o igual del 20% de unión máxima para utilizarlas en ensayos de unión competitivos.

- [0191] Según otra forma de realización, el K_d o valor K_d se mide utilizando análisis de resonancia plasmón de superficie que usa BIAcoreTM-2000 o BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, New Jersey) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Los
- 15 biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore® Inc) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), según las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato sódico, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de la proteína emparejada. Tras la inyección del antígeno, se inyecta 1 M de etanolamina para bloquear grupos
- 20 no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyecta el doble de diluciones seriadas de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0,05% de Tween 20 (PBST) a 25 °C a un caudal de 25 µl/min aproximadamente. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un sencillo modelo de unión uno a uno de Langmuir (BIAcore® Evaluation Software, versión 3.2) al encajar simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calcula como
- 25 el cociente k_{off}/k_{on}. Véase, por ejemplo, Chen, Y., y col., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Si la tasa de asociación excede de 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ según el ensayo de resonancia plasmón de superficie mencionado anteriormente, la tasa de asociación se puede determinar utilizando una técnica de absorción fluorescente que mide el aumento o disminución de la intensidad de la emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de frecuencia) a 25 °C de 20 nM de un anticuerpo anti-antígeno (forma Fab) en
- 30 PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones cada vez más elevadas de antígeno según medición en un espectrómetro, como un espectrómetro equipado con módulo "stop-flow" (interruptor de flujo) (Aviv Instruments) o un espectrómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta con agitador.

STEAP-1 es aquél que tiene niveles significativamente superiores de STEAP-1 en la superficie de sus células en comparación con una célula no cancerosa de la misma clase de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar causada por una amplificación génica o por un aumento de la transcripción o traducción. La sobreexpresión de STEAP-1 puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando el

5 aumento de los niveles de STEAP-1 presentes en la superficie de una célula (por ejemplo, mediante un ensayo inmunohistoquímico; análisis FACS). Como alternativa, o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico o de ARNm que codifica a STEAP-1 presentes en la célula, p.ej. a través de la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH, véase el documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), las técnicas de Southern o Northern, o las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR),

10 como la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobreexpresión de STEAP-1 midiendo el antígeno vertido en un fluido biológico como el suero, por ejemplo, utilizando ensayos basados en anticuerpos (véase también la patente de EE.UU. nº 4.933.294 concedida el 12 de junio de 1990, el documento WO91/05264 publicado el 18 de abril de 1991, la patente de EE.UU. nº 5.401.638 concedida el 28 de marzo de 1995 y Sias y col., *J. Immunol. Methods*, 132: 73-80 (1990)). Aparte de los

15 anteriores ensayos, el experto en la materia también dispone de diversos ensayos *in vivo*. Por ejemplo, se puede exponer células del cuerpo del paciente a un anticuerpo que esté opcionalmente etiquetado con una etiqueta detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y evaluar la unión del anticuerpo a dichas células, por ejemplo, mediante la exploración externa por radiactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo. Entre los tipos de cáncer que expresan a STEAP-1 se

20 incluyen el cáncer de próstata, el de pulmón y el de colon.

[0198] En la presente memoria descriptiva, "tratamiento" (y variaciones de dicho término, como "tratar" o "tratados") se refiere una intervención clínica en un intento de alterar el proceso natural del individuo o célula tratada y se puede realizar como prevención o durante la evolución de la enfermedad. Son efectos deseables del tratamiento la prevención de la enfermedad o de su recidiva, el alivio de los

25 síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución del ritmo de progresión de la enfermedad, la mejora o los cuidados paliativos del estado de la enfermedad y la remisión o un pronóstico de mejoría. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se utilizan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno o para ralentizar la progresión de una enfermedad o trastorno.

30 [0199] Los parámetros anteriores para evaluar el éxito del tratamiento y la mejora de la enfermedad se pueden medir fácilmente mediante procedimientos habituales conocidos por un médico. En el caso del tratamiento del cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (RR). En el caso del cáncer del próstata, el progreso de la terapia puede evaluarse mediante métodos de rutina, por lo general midiendo los

niveles de PSA (antígeno específico de la próstata); cuanto mayor es el nivel de PSA en la sangre, más extendido está el cáncer. Se dispone de ensayos comerciales para la detección de PSA, p.ej., los kits de ensayo Tandem-E y Tandem-R de Hybitech, el ensayo policlonal ProsCheck de Yang (Yang Labs, Bellevue, WA); Imx de Abbott (Abbott Labs, Abbott Park, IL), etc. La metástasis puede determinarse

5 mediante estudios de diseminación y exploración ósea y pruebas para medir el nivel de calcio y otras enzimas a fin de determinar si el cáncer se ha extendido hasta los huesos. También se puede realizar una TAC para detectar la extensión por la pelvis y los nódulos linfáticos de la zona. Se realizan estudios radiológicos de tórax y mediciones, mediante métodos conocidos, de los niveles enzimáticos hepáticos para detectar metástasis en los pulmones y el hígado, respectivamente. Otros métodos habituales para realizar un
10 seguimiento de la enfermedad incluyen ecografía transrectal (TRUS) y biopsia transrectal por punción con aguja gruesa (TRNB).

[0200] Un "sujeto" es un vertebrado. En algunas formas de realización, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen animales de granja (como vacas), animales utilizados en actividades deportivas, animales de compañía (como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas. En algunas
15 formas de realización, el mamífero es un humano.

[0201] Una "cantidad eficaz" es una cantidad eficaz, a las dosis y durante el tiempo necesarios para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención puede variar según factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad de la sustancia/molécula para dar lugar a una
20 respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz comprende aquella cantidad a la que los efectos tóxicos o perjudiciales de la sustancia/molécula son contrarrestados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad eficaz desde el punto de vista profiláctico" es una cantidad eficaz, a las dosis y durante el tiempo necesarios, para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Habitualmente, aunque no necesariamente, dado que una dosis profiláctica se
25 utiliza en sujetos antes de la enfermedad o en una etapa temprana, la cantidad profilácticamente eficaz sería inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir el número de células cancerosas y el tamaño del tumor; inhibir (es decir, lentificar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, lentificar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la
30 metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados al cáncer. Véase la anterior definición de "tratamiento". Con relación a la capacidad del fármaco para evitar el crecimiento de las células cancerosas, y/o eliminar las existentes, éste puede ser citostático y/o citotóxico.

[0202] La administración "crónica" se refiere a la administración del agente o agentes de un modo continuo, frente a un modo agudo, con el fin de mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un período prolongado de tiempo. La administración "intermitente" es el tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino que tiene carácter cíclico.

5 [0203] La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

10 [0204] Los "vehículos", tal como se utiliza este término en la presente memoria descriptiva, incluyen vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no sean tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a los mismos con las dosis y concentraciones empleadas. Con frecuencia, el
15 vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Entre los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables están tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes como ácido ascórbico; un polipéptido de bajo peso molecular (inferior a 10 residuos); proteínas, como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina; monosacáridos,
20 disacáridos y otros carbohidratos, como glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; alcoholes azucarados, como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, como el sodio; y/o surfactantes no iónicos, como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

25 [0205] "Marcador" tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva se refiere a un compuesto o a una composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo de manera de generar un anticuerpo "marcado". El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de isótopos radioactivos o fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o de una composición sustrato que sea detectable.

30 [0206] El término "señalizado con epítipo" utilizado en la presente memoria descriptiva se refiere a un polipéptido quimérico que contiene un polipéptido anticuerpo anti-PSCA fusionado a un "polipéptido señalado". El polipéptido señalado tiene suficientes residuos para proporcionar un epítipo contra el cual se pueda elaborar un anticuerpo, pero es suficientemente corto para que no interfiera en la actividad del polipéptido Ig al cual se fusiona. El polipéptido señalado es también preferentemente único, a fin de que el anticuerpo no tenga una reacción cruzada sustancial con otros epítipos. Por lo general, los polipéptidos señalizados aptos tienen al menos 6 residuos de aminoácidos, siendo la cantidad habitual entre 8 y 50
(preferentemente, entre 10 y 20).

[0207] Según su definición en la presente memoria descriptiva, una "molécula pequeña" tiene un peso molecular inferior a unos 500 daltons.

[0208] El término "prospecto adjunto" se utiliza para hacer referencia a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de los productos terapéuticos, las cuales contienen información sobre las indicaciones, el uso, la posología, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias de uso de dichos productos terapéuticos.

[0209] Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico, p.ej., un ARN, ADN o un polímero combinado que es sustancialmente separado de otras secuencias del ADN del genoma, así como proteínas o complejos como los ribosomas y las polimerasas, que acompañan naturalmente a una secuencia nativa. El término comprende a una secuencia de ácido nucleico que ha sido extraída del medio en el que se genera naturalmente, e incluye fragmentos aislados de ADN recombinantes o clonados y análogos químicamente sintetizados o análogos sintetizados biológicamente mediante sistemas heterólogos. Una molécula sustancialmente pura incluye formas aisladas de la molécula.

[0210] Un "vector" incluye vectores lanzadera y de expresión. Por lo general, el constructo del plásmido también incluirá un origen de replicación (por ejemplo, el origen ColE1 de replicación) y un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a tetraciclina o ampicilina), para replicación y selección, respectivamente, de los plásmidos en bacterias. Un "vector de expresión" se refiere a un vector que contiene las secuencias de control o elementos reguladores necesarios para la expresión de los anticuerpos, incluido el fragmento del anticuerpo de la invención, en células eucarióticas o bacterianas. Los vectores aptos se dan a conocer más adelante.

[0211] La célula que produce un anticuerpo anti-STEAP-1 de la invención incluirá la célula del hibridoma progenitor, p.ej. los hibridomas que se depositan con el ATCC, así como las células hospederas bacterianas y eucarióticas en las que se ha introducido el ácido nucleico que codifica a los anticuerpos. Las células hospederas aptas se dan a conocer más adelante.

[0212] Un "agente inhibidor del crecimiento" se refiere, en el contexto de la presente memoria descriptiva, a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que exprese PSCA, tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, el agente inhibidor del crecimiento puede reducir significativamente el porcentaje de células que expresen PSCA en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento serían los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto distinto de la fase S), como los agentes que inducen la detención de la G1 y la fase M. Entre los bloqueadores clásicos de la fase M se incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los

inhibidores de la topoisomerasa II como la doxorubicina, la epirrubicina, la daunorrubicina, el etopósido y la bleomicina. Esos agentes que detienen la G1 también se desbordan en la detención de la fase S, por ejemplo, los agentes de alquilación del ADN como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbacina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y la ara-C. Puede encontrarse más información al respecto en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn y Israel, eds., capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" (Regulación del ciclo celular, oncogenes y fármacos antineoplásicos) por Murakami y col. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente en la página 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son medicamentos anticancerígenos derivados ambos del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer) se deriva del tejo europeo y es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven la unión de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos al evitar la despolimerización, que ocasiona la inhibición de mitosis en células.

[0213] El término "agente citotóxico", en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa muerte o destrucción celular. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etoposido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina u otros agentes intercaladores, enzimas y fragmentos de éstas como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluidos fragmentos y/o variantes de éstos, toxinas, agentes inhibidores del crecimiento, fracciones de fármacos, y los diversos agentes antineoplásicos o antitumorales divulgados más adelante. Otros agentes citotóxicos se describen más adelante. Un agente tumoricida ocasiona la destrucción de las células tumorales.

[0214] Una "toxina" es una sustancia con capacidad para tener un efecto perjudicial en el crecimiento o proliferación de una célula.

[0215] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes como la tiotepa y la ciclofosfamida (CYTOXAN®); los sulfonatos de alquilo como el busulfán, el improsulfán y el piposulfán; las aziridinas como la benzodopa, la carboquona, la meturedopa y la uredopa; las etiloniminas y metilamelaminas incluyendo la altretamina, la trietilenomelamina, la trietilenofosforamida, la trietilenotiofosforamida y la trimetilolomelamina; los acetogeninos (en especial, el bullatacín y la bullatacinona); el delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); la beta-lapachona; el lapachol; las colchicinas; el ácido betulínico, una camptotecina (incluyendo el topotecán análogo sintético (HYCAMTIN®), el CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), la acetilcamptotecina, la escopolectina y la 9-aminocamptotecina); la

briostatina; la callistatina; el CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adocelesina, carcelesina y bicelesina); la podofilotoxina; el ácido podofilínico; la teniposida; las criptoficinas (particularmente la criptoficina 1 y la 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); la eleuterobina; la pancratiostatina; una sarcodictina; la espongistatina; los gases nitrógeno como el

5 clorambucil, la clornafacina, la colofosfamida, la estramustina, la ifosfamida, la mecloretamina, el clorhidrato de óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembichina, la fenesterina, la prednimustina, la trofosfamida y la uramustina; las nitrosureas como la carmustina, la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina y la ranimustina; los antibióticos como los de enedina (por ejemplo, la caliqueamicina, especialmente la caliqueamicina gamma 1I y la omega 1I (véase, por ejemplo, Agnew,

10 *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); la dinemicina, incluyendo la dinemicina A; una esperamicina; el cromóforo de neocarcinostatina y los cromóforos de antibióticos de enedina cromoproteína relacionados (las aclacinomisinas, la actinomicina, la autramicina, la azaserina, las bleomicinas, la cactinomicina, la carabicina, la carminomicina, la carcinofilina, las cromomicinas, la dactinomicina, la daunorrubicina, la detorrubicina, la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, la doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, la

15 morfolino-doxorrubicina, la cianomorfolino-doxorrubicina, la 2-pirrolino-doxorrubicina y la desoxidoxorrubicina), la epirubicina, la esorrubicina, la idarrubicina, la marcelomicina, las mitomicinas como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomicinas, la peplomicina, la porfiromicina, la puomicina, la quelamicina, la rodorrubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la tubercidina, el ubenimex, la cinostatina y la zorrubicina); los antimetabolitos como el metotrexato y el 5-

20 fluorouracilo (5-FU); los análogos del ácido fólico como la denopterina, el metotrexato, la teropterina y el trimetrexato; los análogos de la purina como la fludarabina, la 6-mercaptopurina, la tiamiprina y la tioguanina; los análogos de la pirimidina como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carmofur, la citarabina, la didesoxiuridina, la doxifluridina, la enocitabina y la floxuridina; los andrógenos como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitioestano, el mepitiostano, la testolactona los

25 antiadrenérgicos como la aminoglutetimida, el mitotano y el trilostano; un reabastecedor del ácido fólico como el ácido folínico; la aceglatona; el glucósido aldofosfamida; el ácido aminolevulínico; el eniluracilo; la amsacrina; el bestrabucil; el bisantreno; el edatraxato; la defofamina; la demecolcina; la diaziquona; la elfornitina; el acetato de eliptinio; una epotilona; el etoglúcido; el nitrato de galio; la hidroxiurea; el lentinan; la lonidainina; los maitansinoides como la maitansina y las ansamitocinas; la mitoguazona; la

30 mitoxantrona; el mopidanmol; la nitraerina; la pentostatina; el fenamet; la pirarrubicina; la losoxantrona; la 2-etilhidracida; la procarbicina; el complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); el razoxano; la rizoxina; el sizofiran; el espirogermanio; el ácido tenuazónico; la triaciquona; la 2,2',2"-triclorotrietilamina; los tricotecenos (especialmente la toxina T-2, el verracurín A, el roridín A y la anguidina); el uretano; la vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); la dacarbicina; la manomustina; el

35 mitobronitol; el mitolactol; el pipobromán; la gacitosina; la arabinosida ("Ara-C"); la tiotepa; los taxoides,

por ejemplo, el paclitaxel (TAXOL®) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), la formulación de nanopartículas de paclitaxel mediante ingeniería de albúmina libre de Cremofor (ABRAXANE™) (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y el docetaxel (TAXOTERE®) (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); el clorambucil; la gemcitabina (GEMZAR®); la 6-tioguanina; la mercaptopurina; el metatrexato; los análogos de platino como el cisplatino y el carboplatino; la vinblastina (VELBAN®); el platino; el etopóido (VP-16); la ifosfamida; la mitoxantrona; la vincristina (ONCOVIN®); el oxaliplatino; la leucovovina; la vinorelbina (NAVELBINE®); la novantrona; el edatrexato; la daunomicina; la aminopterina; el ibandronato; el inhibidor RFS 2000 de la topoisomerasa; la difluorometilornitina (DMFO); los retinoides como el ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores, así como las combinaciones de una o más de las sustancias anteriores como la CHOP, la abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y la FOLFOX, la abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

[0216] También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que regulan, reducen, bloquean o inhiben los efectos de las hormonas que pueden fomentar el crecimiento del cáncer y se presentan a menudo en la forma de un tratamiento sistémico o que afecta a todo el cuerpo. Estos agentes podrán ser hormonas. Como ejemplos se incluyen los antiestrógenos y los moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, el tamoxifeno (también el tamoxifeno NOLVADEX®), el raloxifeno (EVISTA®), el droloxifeno, el 4-hidroxitamoxifeno, el trioxifeno, el keoxifeno, el LY117018, la onapristona y el toremifeno (FARESTON®); las antiprogesteronas; los reguladores a la baja de los receptores de estrógenos (ERD); los agentes que oprimen o cierran los ovarios, por ejemplo, los agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) como el acetato de leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), el acetato de goserelina, el acetato de buserelina y la tripterelina; otros antiandrógenos como la flutamida, la nilutamida y la bicalutamida y los inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, encargada de regular la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, como, por ejemplo, las 4(5)-imidazolas, la aminoglutetimida, el acetato de megestrol (MEGASE®), el exemestano (AROMASIN®), la formestania, la fadrozola, la vorozola (RIVISOR®), el letrozol (FEMARA®) y la anastrozola (ARIMIDEX®). Además, esta definición de los agentes quimioterapéuticos incluye los bisfosfonatos como el clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), el etidronato (DIDROCAL®), el NE-58095, el ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), el alendronato (FOSAMAX®), el pamidronato (AREDIA®), el tiludronato (SKELID®) o el risedronato (ACTONEL®), así como la troxacitabina (un análogo de la citosina nucleósida 1,3-dioxolano); los oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión génica en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, como, por ejemplo, el PKC-alfa, el Raf, el H-Ras y el receptor del factor de

crecimiento epidérmico (EGF-R); las vacunas como THERATOPE® y las que se aplican para terapias génicas, por ejemplo, la ALLOVECTIN®, la LEUVECTIN® y la VAXID®; el inhibidor de la topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); el rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); el ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña doble tirosinasa del ErbB-2 y el EGFR conocido también como GW572016) y las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores.

[0217] En la presente memoria descriptiva, "agente inhibidor del crecimiento" se refiere, a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (como una célula que exprese STEAP-1) tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, el agente inhibidor del crecimiento puede reducir significativamente el porcentaje de células que expresen (como una célula que exprese STEAP-1) en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento serían los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto distinto de la fase S), como los agentes que inducen la detención de la G1 y la fase M. Entre los bloqueadores clásicos de la fase M se incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II como la doxorrubicina, la epirrubicina, la daunorrubicina, el etopósido y la bleomicina. Esos agentes que detienen la G1 también se desbordan en la detención de la fase S, por ejemplo, los agentes de alquilación del ADN como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbacina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y el ara-C. Puede encontrarse más información al respecto en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami y col., (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente en la pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son antineoplásicos derivados ambos del tejo del Pacífico. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven la unión de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos al evitar la despolimerización, que ocasiona la inhibición de mitosis en células.

[0218] Por "metabolito intracelular" se entiende un compuesto que se deriva de un proceso o reacción metabólicos que se produce en el interior de una célula en un conjugado de anticuerpos con fármacos (ADC). El proceso o reacción metabólico puede ser un proceso enzimático, como escisión proteolítica de un enlazador peptídico del ADC, o hidrólisis de un grupo funcional, como una hidrazona, un éster o una amida. Los metabolitos intracelulares incluyen anticuerpos y fármacos libres que han sufrido escisión intracelular tras entrada, difusión, absorción o transporte a una célula.

[0219] Por "escindido intracelularmente" y "escisión intracelular" se entiende un proceso o reacción metabólicos en el interior de una célula de un conjugado de anticuerpos con fármacos (ADC) donde se rompe el enlace covalente, es decir, el enlazador, entre el fragmento del fármaco (D) y el

anticuerpo (Ab), lo que da lugar a que el fármaco libre se disocie del anticuerpo en el interior de la célula. Los fragmentos escindidos del ADC son, por lo tanto, metabolitos intracelulares.

[0220] Por "biodisponibilidad" se entiende la disponibilidad sistémica (es decir, concentración en sangre/plasma) de una cantidad determinada de fármaco administrada a un paciente. El término
5 biodisponibilidad tiene un carácter absoluto e indica medición tanto del tiempo (velocidad) como de la cantidad total (alcance) del fármaco que alcanza la circulación general a partir de una dosis administrada.

[0221] Por "actividad citotóxica" se entenderá un efecto inhibidor del crecimiento, citostático o de destrucción celular de un conjugado de anticuerpos con fármacos o un metabolito intracelular de un conjugado de anticuerpos con fármacos. La actividad citotóxica se puede expresar como el valor de IC₅₀
10 que es la concentración (molar o masa) por unidad de volumen a la que sobreviven la mitad de las células.

[0222] "Alquilo" es hidrocarbano C₁-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos. Los ejemplos incluyen metilo (Me, -CH₃), etilo (Et, -CH₂CH₃), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, -CH₂CH₂CH₃), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, -CH(CH₃)₂), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, -CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, -CH₂CH(CH₃)₂), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, -CH(CH₃)CH₂CH₃), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, -C(CH₃)₃), 1-pentil (n-pentil, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-pentil (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃), 3-pentil (-CH(CH₂CH₃)₂), 2-metil-2-butilo (-C(CH₃)₂CH₂CH₃), 3-metil-2-butilo (-CH(CH₃)CH(CH₃)₂), 3-metil-1-butilo (-CH₂CH₂CH(CH₃)₂), 2-metil-1-butilo (-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 1-hexilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-hexilo (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃), 3-hexilo (-CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃)), 2-metil-2-pentilo (-C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃), 3-metil-2-pentilo (-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃), 4-metil-2-pentilo (-CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂), 3-metil-3-pentilo (-C(CH₃)(CH₂CH₃)₂), 2-metil-3-pentilo (-CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂), 2,3-dimetil-2-butilo (-C(CH₃)₂CH(CH₃)₂), 3,3-dimetil-2-butilo (-CH(CH₃)C(CH₃)₃).
15
20

[0223] En la presente memoria descriptiva, "C₁-C₈ alquilo" se refiere a un hidrocarbano de cadena recta o ramificada, saturado o no saturado, con 1 a 8 átomos de carbono. Entre los grupos "C₁-C₈ alquilo" representativos se incluyen -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo, -n-octilo, -n-nonilo y -n-decilo; mientras que los grupos C₁-C₈ alquilo incluyen -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -tert-butilo, -isopentilo, 2-metilbutilo; los grupos no saturados C₁-C₈ alquilo incluyen -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metilo-1-butenilo, -2-metilo-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, -acetilenilo, -propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo, -3-metil-1 butinilo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, isohexilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 2,3,4-trimetilpentilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilhexilo, 2,4-dimetilhexilo, 2,5-dimetilhexilo,
25
30

3,5-dimetilhexilo, 2,4-dimetilpentilo, 2-metilheptilo, 3-metilheptilo, *n*-heptilo, isoheptilo, *n*-octilo, e isooctilo. Un grupo C₁-C₈ alquilo se puede sustituir o no con uno o más grupos, incluidos, -C₁-C₈ alquilo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada

5 R' se selecciona independientemente entre H, -C₁-C₈ alquilo y arilo.

[0224] "Alquenil" es hidrocarbano C₂-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un enlace doble sp² carbono-carbono. Entre los ejemplos, están: etileno o vinilo (-CH=CH₂), alil (-CH₂CH=CH₂), ciclopentenil (-C₅H₇) y 5-hexenil (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH=CH₂)

10 [0225] "Alquinil" es hidrocarbano C₂-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un enlace triple sp carbono-carbono. Entre los ejemplos, están: acetilénico (-C≡CH) y propargil (-CH₂C≡CH),

[0226] Por "alquilenos" se entiende un radical hidrocarbano saturado, cíclico o de cadena recta o ramificada de 1 a 18 átomos de carbono, con dos centros radicales monovalentes derivados mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo o de dos átomos de carbono distintos de un

15 alcano padre. Entre los radicales alquilenos típicos, están: metileno (-CH₂-), 1,2-etil (-CH₂CH₂-), 1,3-propil (-CH₂CH₂CH₂-), 1,4-butilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂-), etc.

[0227] Un "C₁-C₁₀ alquilenos" es un grupo hidrocarbano saturado de cadena recta de la fórmula -(CH₂)₁₋₁₀-. Ejemplos de un C₁-C₁₀ alquilenos son metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno,

20 heptileno, octileno, nonileno y decaleno.

[0228] Por "alquenilenos" se entiende un radical hidrocarbano insaturado, cíclico o de cadena recta o ramificada de 2 a 18 átomos de carbono, con dos centros radicales monovalentes derivados mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo o de dos átomos de carbono distintos de un

25 alqueno padre. Entre los radicales alquenilenos típicos, están: 1,2-etileno (-CH=CH-).

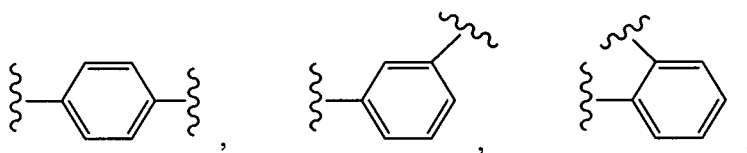
[0229] Por "alquinilenos" se entiende un radical hidrocarbano insaturado, cíclico o de cadena recta o ramificada de 2 a 18 átomos de carbono, con dos centros radicales monovalentes derivados mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo o de dos átomos de carbono distintos de un

30 alquino padre. Entre los radicales alquinilenos típicos, están: acetileno (-C≡C-), propargil (-CH₂C≡C-) y 4-pentinil (-CH₂CH₂CH₂C≡C-).

[0230] Por "arilo" se entiende un grupo aromático carbocíclico. Ejemplos de grupos arilo se incluyen, entre otros, fenilo, naftilo y antracenilo, entre otros. Un grupo aromático carbocíclico o un grupo aromático heterocíclico se puede sustituir o no con uno o más grupos, incluidos, -C₁-C₈ alquilo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R',

$-\text{SO}_3\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OH}$, -halógeno, $-\text{N}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{R}')$, $-\text{N}(\text{R}')_2$ y $-\text{CN}$; donde cada R' se selecciona independientemente entre H , $-\text{C}_1\text{-C}_8$ alquilo y arilo.

[0231] Un "arileno" es un grupo arilo que tiene dos enlaces covalentes y puede estar en configuraciones orto, meta o para, como se muestra en las estructuras siguientes:



en el que el grupo fenilo se puede sustituir o no con hasta cuatro grupos, incluidos, $-\text{C}_1\text{-C}_8$ alquilo, $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_8 \text{ alquilo})$, -arilo, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{SO}_3\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OH}$, -halógeno, $-\text{N}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{R}')$, $-\text{N}(\text{R}')_2$ y $-\text{CN}$; donde cada R' se selecciona independientemente entre H , $-\text{C}_1\text{-C}_8$ alquilo y arilo.

[0232] Por "arilalquilo" se entiende un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unido a un átomo de carbono, por lo general un átomo de carbono sp^3 o terminal, se sustituye por un radical arilo. Habitualmente, los grupos arilalquil incluyen benzil, 2-feniletan-1-il, 2-feniletan-1-il, naftilmetil, 2-naftiletan-1-il, 2-naftiletan-1-il, naftobenzil, 2-naftofeniletan-1-il y similares. El grupo arilalquil comprende de 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, la fracción alquilo, incluidos los grupos alcanil, alquenil o alquinil, del grupo arilalquil está formada por 1 a 6 átomos de carbono y la porción arilo tiene de 5 a 14 átomos de carbono.

[0233] Por "heteroarilalquil" se entiende un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unido a un átomo de carbono, por lo general un átomo de carbono sp^3 o terminal, se sustituye por un radical heteroaril. Los grupos heteroarilalquil típicos incluyen 2-benzimidazolilmetil, 2-furiletal y similares, entre otros. El grupo heteroarilalquil comprende de 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, la fracción alquilo, incluidos los grupos alcanil, alquenil o alquinil, del grupo heteroarilalquil contiene de 1 a 6 átomos de carbono y la fracción heteroaril tiene de 5 a 14 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N , O , P y S . La fracción heteroaril del grupo heteroarilalquil puede ser un monociclo que tenga de 3 a 7 anillos (2 a 6 átomos de carbono o un biciclo con 7 a 10 anillos (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N , O , P y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6].

[0234] Por "alquilo sustituido", "arilo sustituido" y "arilalquilo osustituido" se entienden alquilo, arilo y arilalquilo respectivamente, en los que uno o más átomos de hidrógeno son sustituidos independientemente por un sustituto. Entre los sustitutos típicos están, $-\text{X}$, $-\text{R}$, $-\text{O}^-$, $-\text{OR}$, $-\text{SR}$, $-\text{S}^-$, $-\text{NR}_2$, $-\text{NR}_3$, $=\text{NR}$, $-\text{CX}_3$, $-\text{CN}$, $-\text{OCN}$, $-\text{SCN}$, $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$, $-\text{NCS}$, $-\text{NO}$, $-\text{NO}_2$, $=\text{N}_2$, $-\text{N}_3$, $\text{NC}(=\text{O})\text{R}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_2$,

-SO₃⁻, -SO₃H, -S(=O)₂R, -OS(=O)₂OR, -S(=O)₂NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)₂, -P(=O)(OR)₂, -PO₃⁻, -PO₃H₂, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO₂R, -CO²⁻, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR₂, -C(=S)NR₂, -C(=NR)NR₂, entre otros, donde cada X es independientemente un halógeno: F, Cl, Br o I; y cada R es independientemente -H, C₂-C₁₈ alquilo, C₆-C₂₀ arilo, C₃-C₁₄ heterociclo, grupo protector o fracción de profármaco. Los grupos alquilenos, alquenilenos y alquinilenos descritos anteriormente también se pueden sustituir de forma similar.

[0235] Por "heteroaril" y "heterociclo" se entiende un sistema de anillos en el que uno o más átomos en anillo es un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y sulfuro. El radical heterociclo comprende de 1 a 20 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S. Un heterociclo puede ser un monociclo con 3 a 7 anillos (de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S) o un biciclo con 7 a 10 anillos (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6].

[0236] Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A.; *Principles of Modern Heterocyclic Chemistry* (W.A. Benjamin, New York, 1968), especialmente en los Capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley and Sons, New York, 1950 hasta hoy), en concreto en los Volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y *J. Am. Chem. Soc.* (1960) 82:5566.

[0237] Ejemplos de heterociclos son piridil, dihidropiridil, tetrahidropiridil (piperidil), tiazolil, tetrahidrotiofeno, tetrahidrotiofeno de azufre oxidado, pirimidinil, furanil, tienil, pirrolil, pirazolil, imidazolil, tetrazolil, benzofuranil, tianaftalenil, indolil, indolenil, quinolinil, isoquinolinil, benzimidazolil, piperidinil, 4-piperidonil, pirrolidinil, 2-pirrolidonil, pirrolinil, tetrahydrofuranil, bis-tetrahydrofuranil, tetrahidropirranil, bis-tetrahidropirranil, tetrahydroquinolinil, tetrahydroisoquinolinil, decahydroquinolinil, octahydroisoquinolinil, azocinil, triazinil, 6H-1,2,5-tiadiazinil, 2H,6H-1,5,2-ditiazinil, tienil, tiantrenil, piranil, isobenzofuranil, chromenil, xantenil, fenoxatinil, 2H-pirrolil, isotiazolil, isoxazolil, pirazinil, piridazinil, indolizininil, isoindolil, 3H-indolil, 1H-indazolil, purinil, 4H-quinolizininil, ftalazinil, naftiridinil, quinoxalinil, quinazolinil, cinnolinil, pteridinil, 4aH-carbazolil, carbazolil, β-carbolinil, fenantridinil, acridinil, pirimidinil, fenantrolinil, fenazinil, fenotiazinil, furazanil, fenoxazinil, isochromanil, chromanil, imidazolidinil, imidazolinil, pirazolidinil, pirazolinil, piperazinil, indolinil, isoindolinil, quinuclidinil, morfolinil, oxazolidinil, benzotriazolil, benzisoxazolil, oxindolil, benzoxazolinil e isatinoil.

[0238] A modo de ejemplo, los heterociclos con enlace a carbono se enlazan en la posición 2, 3, 4, 5 ó 6 de una piridina, posición 3, 4, 5 ó 6 de una piridazina, posición 2, 4, 5 ó 6 de una pirimidina, posición 2, 3, 5 ó 6 de una pirazina, posición 2, 3, 4 ó 5 de un furano, tetrahydrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, posición 2, 4 ó 5 de una oxazola, imidazola o tiazola, posición 3, 4 ó 5 de una isoxazola, pirazola o isotiazola, posición 2 ó 3 de una aziridina, posición 2, 3 ó 4 de una azetidina, posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una quinolina o posición 1, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una isoquinolina. Aún es más habitual que los

heterociclos con enlace a carbono incluyan 2-piridil, 3-piridil, 4-piridil, 5-piridil, 6-piridil, 3-piridazinil, 4-piridazinil, 5-piridazinil, 6-piridazinil, 2-pirimidinil, 4-pirimidinil, 5-pirimidinil, 6-pirimidinil, 2-pirazinil, 3-pirazinil, 5-pirazinil, 6-pirazinil, 2-tiazolil, 4-tiazolil o 5-tiazolil.

[0239] A modo de ejemplo, los heterociclos con enlace a nitrógenos están enlazados en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, posición 2 de un isoindol o isoindolina, posición 4 de una morfolina, y posición 9 de un carbazol o β -carbolina, entre otros. Aún es más típico que los heterociclos con enlace a nitrógeno incluyan 1-aziridil, 1-azeteditil, 1-pirrolil, 1-imidazolil, 1-pirazolil, y 1-piperidinil.

[0240] Por " C_3 - C_8 heterociclo" se entiende un C_3 - C_8 carbociclo aromático o no aromático en el que de uno a cuatro de los átomos de carbono en anillo son sustituidos independientemente por un heteroátomo del grupo formado por O, S y N. Ejemplos representativos de un C_3 - C_8 heterociclo incluyen benzofuranil, benzotiofeno, indolil, benzopirazolil, coumarinil, isoquinolinil, pirrolil, tiofenil, furanil, tiazolil, imidazolil, pirazolil, triazolil, quinolinil, pirimidinil, piridinil, piridonil, pirazinil, piridazinil, isotiazolil, isoxazolil y tetrazolil. Un C_3 - C_8 heterociclo se puede sustituir o no con hasta siete grupos, incluidos, $-C_1$ - C_8 alquilo, $-O$ -(C_1 - C_8 alquilo), $-arilo$, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $-halógeno$, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ y $-CN$; donde cada R' se selecciona independientemente entre H, $-C_1$ - C_8 alquilo y arilo.

[0241] Por " C_3 - C_8 heterociclo" se entiende un grupo C_3 - C_8 heterociclo como se define anteriormente, donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo heterociclo es sustituido por un enlace. Un C_3 - C_8 heterociclo se puede sustituir o no con hasta seis grupos, incluidos, $-C_1$ - C_8 alquilo, $-O$ -(C_1 - C_8 alquilo), $-arilo$, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $-halógeno$, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ y $-CN$; donde cada R' se selecciona independientemente entre H, $-C_1$ - C_8 alquilo y arilo.

[0242] Por "carbociclo" se entiende un anillo saturado o insaturado con 3 a 7 átomos de carbono como monociclo o 7 a 12 átomos de carbono como biciclo. Los carbociclos monocíclicos tienen de 3 a 6 átomos en anillo y aún con más frecuencia 5 ó 6 átomos en anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen de 7 a 12 átomos en anillo, por ejemplo, dispuestos como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6] o de 9 a 10 átomos en anillo dispuestos como un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. Ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropil, ciclobutil, ciclopentil, 1-ciclopent-1-enil, 1-ciclopent-2-enil, 1-ciclopent-3-enil, ciclohexil, 1-ciclohex-1-enil, 1-ciclohex-2-enil, 1-ciclohex-3-enil, cicloheptil y ciclooctil.

[0243] Un " C_3 - C_8 carbociclo" es un anillo carbocíclico no aromático, saturado o insaturado, de 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8- átomos. Entre los C_3 - C_8 carbociclos representativos están $-ciclopropil$, $-ciclobutil$, $-ciclopentil$,

-ciclopentadienil, -ciclohexil, -ciclohexenil, -1,3-ciclohexadienil, -1,4-ciclohexadienil, -cicloheptil, -1,3-cicloheptadienil, -1,3,5-cicloheptatrienil, -ciclooctil y -ciclooctadienil. Un grupo C₃-C₈ carbociclo se puede sustituir o no con uno o más grupos, incluidos, -C₁-C₈ alquilo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente entre H, -C₁-C₈ alquilo y arilo.

[0244] Por "C₃-C₈ carbociclo" se entiende un grupo C₃-C₈ carbociclo como se define anteriormente, donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo carbociclo es sustituido por un enlace.

[0245] Por "enlazador" se entiende una fracción química que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que unen covalentemente un anticuerpo a una fracción de un fármaco. En varias formas de realización, los enlazadores incluyen un radical divalente, como un alquildiil, un arildiil, un heteroarildiil, fracciones como: -(CR₂)_nO(CR₂)_n-, unidades repetidoras de alquiloxi (por ejemplo, polietilenoxi, PEG, polimetilenoxi) y alquilamino (por ejemplo, polietileneamino, Jeffamine™); y éster diácido y amidas como succinato, succinamida, diglicolato, malonato y caproamida.

[0246] Por "quiral" se entiende moléculas que tienen la propiedad de no superimposición de la molécula de enlace que constituye la contraimagen, mientras que por "aquiral" se entiende las moléculas que son superponibles a su contraimagen.

[0247] Por "estereoisómeros" se entienden los compuestos que tienen idéntica constitución química pero difieren en la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

[0248] Por "diastereómero" se entiende un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y con moléculas que no son contraímagenes la una de la otra. Los diastereómeros tienen propiedades físicas distintas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros se pueden separar mediante procedimientos analíticos de alta resolución, como electroforesis y cromatografía.

[0249] Por "enantiómeros" se entiende dos estereoisómeros de un compuesto que no se superponen como contraimagen el uno del otro.

[0250] Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en la presente memoria descriptiva siguen, por lo general, a S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; y Eliel, E. y Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Existen muchos compuestos orgánicos en formas ópticamente activas, es decir, con capacidad para rotar el plano a luz polarizada en el plano. Al describir un compuesto ópticamente activo, se utilizan los prefijos D y L, o R y S, para denotar la configuración absoluta de la molécula sobre su centro o sus centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el

signo de rotación de luz polarizada/plano por el compuesto, donde (-) o l significan que el compuesto es levorotatorio. Un compuesto con prefijo (+) o d es dextrorotatorio. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos, excepto que sean contraimagen el uno del otro. Un estereoisómero específico también se puede considerar un enantiómero y una mezcla de dichos isómeros se denomina con frecuencia una mezcla enantiomérica. Una mezcla de enantiómeros en una proporción 50:50 se considera una mezcla racémica o un racemato, que puede ocurrir cuando no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Por "mezcla racémica" o "racemato" se entiende una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovista de actividad óptica.

[0251] Por "grupo saliente" se entiende un grupo funcional que se puede sustituir por otro grupo funcional. Determinados grupos salientes son bien conocidos en el sector y entre los ejemplos están un halido (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), metanesulfonil (mesil), p-toluenesulfonil (tosil), trifluorometilsulfonil (triflato) y trifluorometilsulfonato.

Abreviaturas

[0252] COMPONENTES DEL ENLAZADOR:

MC = 6-maleimidocaprol

Val-Cit o "vc" = valina-citrulina (un dipéptido ejemplar en un enlazador escindible por una proteasa)

Citrulina = ácido 2-amino-5-ureido pentanóico

PAB = p-aminobenziloxycarbonilo (un ejemplo de un componente enlazador "autoinmolador")

Me-Val-Cit = N-metil-valina-citrulina (donde el enlace peptídico del enlazador se ha modificado para prevenir su escisión mediante catepsina B)

MC(PEG)6-OH = maleimidocaprol- polietilenglicol (se puede unir a cisteínas del anticuerpo).

SPP = N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato

SPDP = N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato

SMCC = succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato

IT = iminotiolano

FÁRMACOS CITOTÓXICOS:

[0253] MMAE = mono-metil auristatina E (MW 718)

MMAF = variante de la auristatina E (MMAE) con una fenilalanina en el extremo C-terminal del fármaco (MW 731.5)

MMAF-DMAEA = MMAF con DMAEA (dimetilaminoetilamina) en un enlace de amida a la fenilalanina en el extremo C-terminal (MW 801.5)

MMAF-TEG = MMAF con tetraetilenglicol esterificado a la fenilalanina

MMAF-NtBu = N-t-butilo, unido como una amida al extremo C-terminal de MMAF

DM1 = N(2')-deacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina

DM3 = N(2')-deacetil-N2-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina

DM4 = N(2')-deacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina

[0254] Otras abreviaturas son: AE es auristatina E, Boc es *N*-(*t*-butoxicarbonil), cit es citrulina, dap is dolaproina, DCC es 1,3-diciclohexilcarbodiimida, DCM es diclorometano, DEA es dietilamina, DEAD es dietilazodicarboxilato, DEPC es dietilfosforilcianidato, DIAD es diisopropilazodicarboxilato, DIEA es *N,N*-diisopropiletilamina, dil es dolaisoleucina, DMA es dimetilacetamida, DMAP es 4-dimetilaminopiridina, DME es etileneglicol dimetil éter (o 1,2-dimetoxietano), DMF es *N,N*-dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfoxido, doe es dolafenina, dov es *N,N*-dimetilvalina, DTNB es 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico), DTPA es ácido dietilenetriaminepentaacético, DTT es ditioneitol, EDCI es hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, EEDQ es 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, ES-MS es espectrometría de masas por electrospray, EtOAc es acetato de etilo, Fmoc es *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil), gly es glicina, HATU es *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronium hexafluorofosfato, HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, HPLC es cromatografía líquida de alta presión, ile es isoleucina, lys es lisina, MeCN (CH₃CN) es acetonitrilo, MeOH es metanol, Mtr es 4-anisildifenilmetil (o 4-metoxitritil), nor es (*1S*, *2R*)-(+)-norefedrina, PBS es solución salina fosfatada (pH 7,4), PEG es polietilenglicol, Ph es fenilo, Pnp es p-nitrofenilo, MC es 6-maleimidocaproil, phe es L-fenilalanina, PyBrop es bromo *tris*-pirrolidino fosfonium hexafluorofosfato, SEC es cromatografía por exclusión de tamaño, Su es succinimida, TFA es ácido trifluoroacético, TLC es cromatografía de capa fina, UV es ultravioleta y val es valina.

COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE LAS MISMAS

[0255] Se proporcionan anticuerpos que se unen a STEAP-1. Se proporcionan inmunoconjugados que comprenden anticuerpos anti-STEAP-1. Los anticuerpos e inmunoconjugados de la invención son útiles, como por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de trastornos asociados a una expresión alterada, como por ejemplo, una expresión aumentada, de STEAP-1. En determinadas formas de realización, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención son útiles para el diagnóstico o tratamiento de un trastorno de proliferación celular, como un cáncer.

Anticuerpos anti-STEAP-1

[0256] En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que se unen a STEAP-1. En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos que se unen a una forma madura del STEAP-1 de humanos y monos cinomolgus. En una de estas formas de realización, una forma madura del STEAP-1 humano tiene una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 1 (Figura 1). La STEAP-1 de mono tiene una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 3 (Figura 1). En algunas formas de realización, un anticuerpo de STEAP-1 se une a una forma madura de STEAP-1 expresado en una superficie celular. En algunas formas de realización, un anticuerpo que se une a una forma madura de

STEAP-1 expresada en la superficie celular inhibe el crecimiento de la célula. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-STEAP-1 se une a una forma madura de STEAP-1 expresada en la superficie celular e inhibe la proliferación celular. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-STEAP-1 se une a una forma madura de STEAP-1 expresada en la superficie celular e induce la muerte celular. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-STEAP-1 se une a una forma madura de STEAP-1 expresada en la superficie de células cancerosas. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-STEAP-1 se une a una forma madura de STEAP-1 que está sobreexpresada en la superficie de células cancerosas con respecto a células normales del mismo origen tisular. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-STEAP-1 se conjuga a una citotoxina o a una marca detectable y se une al STEAP-1 en una superficie celular. En algunas formas de realización, el conjugado de anticuerpo con toxina inhibe el crecimiento de la célula. En algunas formas de realización, el conjugado de anticuerpo con una marca detectable produce una célula que expresa STEAP-1 en su superficie para que sea detectable *in vitro* o *in vivo*.

[0257] En un aspecto, un anticuerpo anti-STEAP-1 es un anticuerpo monoclonal. En un aspecto, un anticuerpo anti-STEAP-1 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab, Fab' -SH, Fv, scFv o (Fab')₂. En un aspecto, un anticuerpo anti-STEAP-1 es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En un aspecto, cualquiera de los anticuerpos anti-STEAP-1 descritos en la presente memoria descriptiva está purificado.

[0258] En la presente memoria descriptiva se proporcionan anticuerpos monoclonales ejemplares derivados de una biblioteca de fagos. El antígeno que se utilizó para la detección de la biblioteca era un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 28 o identificador de secuencia n.º: 30, que correspondía a los dominios extracelulares (ECD) del STEAP-1 beta y alfa. Los anticuerpos que se obtienen de la detección de la biblioteca tienen una maduración de afinidad.

[0259] En un aspecto, se proporcionan anticuerpos monoclonales que compiten con el anticuerpo murino 120.545, injerto 120 y el humanizado 120v.24 para que se unan al STEAP-1. También se proporcionan anticuerpos monoclonales que se unen al mismo epítipo como el anticuerpo murino 120.545, 120, injerto 120 y el humanizado 120v.24.

[0260] En un aspecto de la invención, se proporcionan polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-STEAP-1. En ciertas formas de realización, se proporcionan vectores que comprenden polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-STEAP-1. En ciertas formas de realización, se proporcionan células hospederas que comprenden estos vectores. En otro aspecto de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden anticuerpos anti-STEAP-1 o polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-STEAP-1. En determinadas formas de realización, una composición de la invención es una

formulación farmacéutica para el tratamiento de un trastorno de proliferación celular, como los enumerados en la presente memoria descriptiva.

A continuación se incluye una descripción detallada de anticuerpos anti-STEAP-1 ejemplares:

1. Formas de realización específicas de anticuerpos anti-STEAP-1

5 [0261] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende un identificador de secuencia n.º: 9 ó 10 de la Figura 2B. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende un identificador de secuencia n.º: 6 de la Figura 2A.

10 [0262] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende una cadena pesada que comprende un identificador de secuencia n.º: 9 que tiene uno o más de los siguientes cambios de aminoácidos en la posición de Kabat indicada: A24V, V37I, V48M, F67I y L78F. En una realización, la cadena pesada comprende una región de estructura de cadena pesada de los identificadores de secuencia N.ºs. 25, 75, 76, 77, 78 y 79. Tal como se emplean en la presente memoria, las regiones de la estructura de la cadena pesada se designan "FR-H1-H4" o "HC-FR1-FR4", y las regiones de la estructura de la cadena ligera se designan "FR-L1-L4" o "LC-FR1-FR4". En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende una cadena ligera que comprende un identificador de secuencia n.º: 6.

 [0263] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 de las secuencias de la HVR del anticuerpo 120.v24 como se muestra en las Figuras 2A y 2B.

20 [0264] Un anticuerpo anti-STEAP-1 puede comprender cualquier secuencia de dominio variable de la estructura adecuada, siempre que el anticuerpo conserve la capacidad de unirse a STEAP-1. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-STEAP-1 de la invención comprenden una secuencia de consenso de la estructura de la cadena pesada del subgrupo III humano. En una forma de realización de estos anticuerpos, la secuencia de consenso de la estructura de la cadena pesada involucra sustituciones en la posición 24, 37, 48, 67, ó 78. En una forma de realización de estos anticuerpos, la posición 24 corresponde a A o V, la posición 37 corresponde a I o V, la posición 48 corresponde a M o V, la posición 67 corresponde a I o F, y/o la posición 78 corresponde a F o L. En una forma de realización, estos anticuerpos comprenden una secuencia de estructura de dominio variable de la cadena pesada de huMAb4D5-8, por ejemplo, el identificador de secuencia n.º: 21, 22, 23, y 24 (FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4, respectivamente). huMAb4D5-8 se conoce comercialmente como el anticuerpo anti-HER2

30 HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, Estados Unidos; también mencionado en las patentes de EE.UU N.º 6,407,213 y 5,821,337; y en Lee y col., *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93. En dicha forma de realización, estos anticuerpos además comprenden una secuencia de consenso de la

estructura de cadena ligera κ I humana. En una de esas formas de realización, estos anticuerpos comprenden una secuencia de la estructura de dominio variable de la cadena ligera de huMAb4D5-8, por ejemplo, el identificador de secuencia n.º: 17, 18, 19, y 20 (FR-L1, FR-L2, FR-L3, FR-L4, respectivamente).

5 **[0265]** En una forma de realización, un anticuerpo anti-STEAP-1 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de estructura y regiones hipervariables, en las que la secuencia de estructura comprende las secuencias FR-H1-FR-H4 del identificador de secuencia n.º: 21 ó 25 (FR-H1), 22 (FR-H2), 23 (FR-H3) y 24 (FR-H4) respectivamente; la HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 14; la HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos del
10 identificador de secuencia n.º: 15 y la HVR-H3 comprende una secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 16. En una forma de realización, un anticuerpo anti-STEAP-1 comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de estructura y regiones hipervariables, en las que la secuencia de estructura comprende las secuencias FR-L1-FR-L4 de los identificadores de frecuencia n.º: 17, 18, 19 y 20 respectivamente; la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del
15 identificador de secuencia n.º: 11, 12 y 13. En una forma de realización de estos anticuerpos, el dominio variable de cadena pesada comprende un identificador de secuencia n.º: 9 ó 10 y el dominio variable de cadena ligera comprende el identificador de secuencia n.º: 6.

[0266] En ciertas formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos con al
20 menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identificación de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 9 ó 10. En ciertas formas de realización, una secuencia de aminoácidos con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identificación de secuencia contiene sustituciones, inserciones o eliminaciones relativas a la secuencia de referencia; sin embargo, un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos
25 conserva la capacidad de unirse a STEAP-1. En ciertas formas de realización, un total de entre 1 y 10 aminoácidos se han sustituido, insertado o eliminado en una secuencia del identificador de secuencia n.º: 9, 10, 14, 15, 16, 21, 22, 23, 24, 25, 75, 76, 77, 78, y/o 79. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen en las regiones externas a las HVR (es decir, en las FR). En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-STEAP-1 comprende un dominio variable de cadena
30 pesada que contiene una secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 9 ó 10.

[0267] En ciertas formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende un dominio variable de cadena pesada, tal como se describe en la Figura 2B (Identificador de secuencia n.º 9 ó 10).

[0268] En ciertas formas de realización, las secuencias de la HVR y FR de cadena pesada comprenden los siguientes elementos:

HVR-H1 (GYSITSDYAWN, identificador de secuencia n.º: 14)

HVR-H2 (GYISNSGSTSYNPSLKS, identificador de secuencia n.º: 15)

5 HVR-H3 (ERNYDYDDYYAMDY, identificador de secuencia n.º: 16)

FR-H1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS, identificador de secuencia n.º: 21)

FR-H1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS, identificador de secuencia n.º: 25)

FR-H2 (WVRQAPGKGLEWV, identificador de secuencia n.º: 22)

FR-H2 (WIRQAPGKGLEWV, identificador de secuencia n.º: 75)

10 FR-H2 (WVRQAPGKGLEWM, identificador de secuencia n.º: 76)

FR-H2 (WIRQAPGKGLEWM, identificador de secuencia n.º: 77)

FR-H3 (RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR, identificador de secuencia n.º: 23)

FR-H3 (RITISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR, identificador de secuencia n.º: 78)

FR-H3 (RFTISRDNSKNTFYLYQMNSLRAEDTAVYYCAR, identificador de secuencia n.º: 79)

15 FR-H4 (WGQGTLVTVSS, identificador de secuencia n.º: 24)

[0269] En ciertas formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende un dominio variable de cadena ligera, tal como se describe en la Figura 2A (Identificador de secuencia n.º 6).

[0270] En ciertas formas de realización, las secuencias de la HVR de cadena ligera comprenden los siguientes elementos:

20

HVR-L1 (KSSQSLLYRSNQKNYLA, identificador de secuencia n.º: 11)

HVR-L2 (WASTRES, identificador de secuencia n.º: 12)

HVR-L3 (QQYYNYPRT, identificador de secuencia n.º: 13).

[0271] En ciertas formas de realización, las secuencias de la FR de cadena ligera comprenden los siguientes elementos:

25

FR-L1 (DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC, identificador de secuencia n.º: 17);

FR-L2 (WYQQKPGKAPKLLIY, identificador de secuencia n.º: 18);

FR-L3 (GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC, identificador de secuencia n.º: 19)

FR-L4 (FGQGTKVEIKR, identificador de secuencia n.º: 20).

[0272] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identificación de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 6. En ciertas formas de realización, una secuencia de aminoácidos con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identificación de secuencia contiene sustituciones, adiciones o eliminaciones relativas a la secuencia de

30

35

referencia; sin embargo, un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos conserva la capacidad de unirse a STEAP-1. En ciertas formas de realización, un total de entre 1 y 10 aminoácidos se han sustituido, insertado o eliminado en una secuencia seleccionada del identificador de secuencia n.º: 6, 11, 12, 13, 17, 18, 19, y 20. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen las regiones externas a las HVR (es decir, en las FR). En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-STEAP-1 comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 6.

[0273] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende (a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identificación de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 9 y 10 y (b) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identificación de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 6. En ciertas formas de realización, una secuencia de aminoácidos con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identificación de secuencia contiene sustituciones, adiciones o eliminaciones relativas a la secuencia de referencia; sin embargo, un anticuerpo que comprende esa secuencia de aminoácidos conserva la capacidad de unirse a STEAP-1. En ciertas formas de realización, un total de entre 1 y 10 aminoácidos se han sustituido, insertado o eliminado en la secuencia de referencia, incluyendo, entre otras, una secuencia seleccionada a partir del identificador de secuencia n.º 9, 10, 14, 15, 16, 21, 22, 23, 24, 25, 75, 76, 77, 78, 79. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen en regiones externas a las HVR (es decir, en las FR). En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-STEAP-1 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 9 y 10 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 6.

[0274] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende (a) una, dos o tres HVR de VH seleccionadas de las que se muestran en la Figura 2B o (b) una, dos o tres HVR de VL seleccionadas de las que se muestran en la Figura 2A. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende un dominio variable de cadena pesada seleccionado entre los que se muestran en la Figura 2B y un dominio variable de cadena ligera seleccionado entre los que se muestran en la Figura 2A.

2. Fragmentos de anticuerpos

[0275] La presente invención comprende fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden generar por métodos tradicionales, como digestión enzimática, o mediante técnicas

recombinantes. En determinadas circunstancias, resulta útil utilizar fragmentos de anticuerpos en vez de anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una rápida eliminación y puede brindar un mejor acceso a los tumores sólidos. Para obtener una revisión de determinados fragmentos de anticuerpos, véase Hudson y col. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

5 [0276] Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan y col., *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente mediante células hospederas recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv
10 pueden expresarse todos en *E. coli* y secretarse a partir de *E. coli*, lo que permite la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de fagos descritas anteriormente. De manera alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y unirse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col.,
15 *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Según otro método, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente desde cultivos de células hospederas recombinantes. El Fab y el fragmento F(ab')₂ con mayor semividua *in vivo* que comprende residuos de un epítipo de unión a receptor de rescate se describe en la patente de EE.UU. N.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán conocidas por los expertos en la materia. En ciertas formas de realización, un anticuerpo es un fragmento Fv de cadena única (scFv). Véase el documento WO 93/16185; la patente de EE.UU. N.º 5.571.894 y la
20 patente de EE.UU. N.º 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con puntos de combinación intactos que están privados de regiones constantes; por ello, pueden ser aptos para una unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Las proteínas de fusión scFv se pueden construir para obtener la fusión de una proteína efectora en el extremo carboxi terminal o amino terminal de un scFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, mencionado anteriormente. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo
25 lineal", por ejemplo, tal y como se describe en la patente de EE.UU. N.º 5.641.870. Estos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

3. Anticuerpos humanizados

[0277] La presente invención comprende anticuerpos humanizados. En la materia se conocen diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede
30 tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él desde una fuente que sea no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se conocen a menudo como residuos "importados", que generalmente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y sus colaboradores (Jones y col., (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann y col. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen y col. (1988) *Science* 239:1534-1536), sustituyendo las

secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. N° 4.816.567) en donde se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de especies no humanas. En la práctica, los anticuerpos humanizados son
5 generalmente anticuerpos humanos en los que los residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de la FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en los anticuerpos de roedores.

[0278] La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para realizar los anticuerpos humanizados puede ser muy importante para disminuir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método del "más apto", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de un roedor se
10 compara con toda la biblioteca conocida de secuencias de dominio variable de humanos. Entonces, se acepta la secuencia humana más parecida a la de los roedores como estructura humana para el anticuerpo humanizado (Sims y col. (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia y col. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. Otro método utiliza una estructura concreta derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de cadenas ligeras o pesadas. Esta misma estructura se puede usar
15 para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta y col. (1993) *J. Immunol.*, 151:2623.

[0279] Es deseable también, por lo general, que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, siguiendo uno de los métodos, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las
20 secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales por medio de modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Generalmente se dispone de modelos de inmunoglobulina tridimensional conocidos por los expertos en la materia. Existen programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidata. La inspección de estas visualizaciones posibilita el análisis de la función probable de los
25 residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de aquellos residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de la FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras y de importación para lograr la característica deseada del anticuerpo, como por ejemplo, una mayor afinidad para el/los antígeno/s diana. En general, los residuos de la región hipervariable están
30 directamente y más considerablemente involucrados en la influencia que se ejerce sobre la unión a antígeno.

4. Anticuerpos humanos

[0280] Los anticuerpos humanos anti-STEAP-1 de la invención se pueden construir combinando una o más secuencias de dominio variable Fv de clones seleccionadas de bibliotecas de representación en
35 imágenes de fagos derivados de humanos con una o más secuencias de dominio constante humanas, como

se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos anti-STEAP-1 monoclonales humanos de la invención se pueden producir mediante el método del hibridoma. Las líneas celulares del mieloma humano y heteromioma humano-murino también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) y Boerner y col., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

[0281] Actualmente es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, una vez inmunizados, de generar un repertorio completo de anticuerpos humanos cuando no exista producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión (JH) de la cadena pesada del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal ocasiona la inhibición total de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz de genes humanos de la inmunoglobulina de línea germinal en uno de estos ratones mutantes de línea germinal ocasionará la producción de anticuerpos humanos al actuar sobre el antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggermann y col., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

[0282] También se puede utilizar la combinación de genes para derivar anticuerpos humanos de no humanos, por ejemplo, anticuerpos de roedores, en los que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares a las del anticuerpo no humano de partida. Según este método, que también se denomina "impronta de epítomos", la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de representación en imágenes de fagos, como las descritas anteriormente, se sustituye por un repertorio de genes de dominio V humanos, lo que crea una población de quimeras Fab o scFv de cadena humana/cadena no humana. La selección con el antígeno da lugar al aislamiento de un Fab o scFV quimérico de cadena humana/cadena no humana, en el que la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido al eliminar la cadena no humana correspondiente del clon de representación de fagos primario; es decir, el epítipo rige (impregna) la elección de la molécula de la cadena humana. Cuando se repite el proceso para sustituir la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la tradicional humanización de anticuerpos no humanos mediante trasplante de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos que no tienen residuos de la FR o CDR de origen no humano.

5. Anticuerpos biespecíficos

[0283] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión con al menos dos antígenos diferentes. En ciertas formas de realización, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o humanizados. En ciertas formas de realización, una de las

especificidades de unión corresponde a STEAP-1 y la otra, a cualquier otro antígeno. En ciertas formas de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de STEAP-1. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos de las células que expresan el STEAP-1. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a STEAP-1 y un brazo que se une a un agente citotóxico, como por ejemplo, saporina, anti-interferón- α , alcaloide de la vinca, cadena de ricina A, metotrexato o hapteno con un isótopo radiactivo. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

[0284] Los procedimientos para realizar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la materia. La producción recombinante tradicional de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas tienen distintas especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina, estos hibridomas (células híbridas) producen una posible mezcla de 10 moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que generalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante complicada, y la cantidad de producto que se obtiene es baja. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993 y en Traunecker y col., *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

[0285] Según un método distinto, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (puntos de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con las secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se realiza, por ejemplo, con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. En ciertas formas de realización, la primera región constante de la cadena pesada (CH1), que contiene el lugar necesario para la unión de la cadena ligera, está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, de la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan a un organismo hospedero adecuado. Esto proporciona mayor flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en formas de realización en donde las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos utilizados en la construcción proporcionan rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación de dos o de las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos con proporciones iguales genera rendimientos altos o cuando las proporciones no tienen particular importancia.

[0286] En una forma de realización de este método, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un

par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una de las mitades de la molécula biespecífica proporciona una forma sencilla de separación. Este método se desveló en el documento WO 94/04690. Para obtener mayores detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh y col., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

[0287] Según otro método, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos se puede modificar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de un cultivo de células recombinantes. La interfaz comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpos. En este método, una o más cadenas laterales cortas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula del anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más largas (por ejemplo, tirosina o triptofano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) larga(s) se crean en la interfaz de la segunda molécula del anticuerpo al reemplazar las cadenas laterales largas de aminoácidos por cadenas más cortas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar la producción del heterodímero con relación a otros productos finales no deseados como los homodímeros.

[0288] Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulantes o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede unir a la avidina y el otro a la biotina. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para conseguir que las células del sistema inmunitario actúen sobre células no deseadas (patente de EE. UU. N.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección de VIH (documentos WO 91/00360 y WO 92/00373, y la patente europea EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden obtenerse utilizando cualquier método reticulante conveniente. Los agentes reticulantes adecuados se conocen bien en la materia y se desvelan en la patente de EE. UU. N.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

[0289] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar mediante un enlace químico. Brennan y col., *Science*, 229: 81 (1985) describe un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se separan proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia de arsenito de sodio del agente que forma complejos con el ditiol para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados posteriormente se convierten en derivados del tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados del Fab'-TNB posteriormente se reconvierte en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar de otro derivado del Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[0290] Descubrimientos actuales han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden unir químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a un emparejamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. Por lo tanto, el anticuerpo biespecífico formado era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor HER2 y las células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

[0291] También se han descrito varias técnicas para realizar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny y col., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos con cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se reoxidaron para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este método también se puede utilizar para producir los homodímeros del anticuerpo. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para realizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento se fuerzan para emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento; por lo tanto, forman dos sitios de unión al antígeno. También se ha informado de otra estrategia para realizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber y col., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

[0292] También se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt y col., *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

6. Anticuerpos multivalentes

[0293] Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que exprese un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son los que no pertenecen a la clase IgM) con tres o más sitios de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente mediante la expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptidos del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión al antígeno. En ciertas formas de realización, el dominio de dimerización

comprende (o está formado por) una región Fc o una región bisagra. En esta situación, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión amino-terminal del antígeno a la región Fc. En ciertas formas realización, un anticuerpo multivalente comprende (o está formado por) aproximadamente entre tres y ocho sitios de unión a antígeno. En una de estas formas de realización, un anticuerpo

- 5 multivalente comprende (o está formado por) cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena de polipéptidos (por ejemplo, dos cadenas de polipéptidos) en la que la(s) cadena(s) de polipéptidos comprende(n) dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptidos puede(n) comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptidos de una región Fc, X1 y X2
- 10 representan una aminoácido o polipéptido y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptidos puede(n) comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1- cadena de la región FC o VH-CH1-VH-CH1- cadena de la región Fc. El anticuerpo multivalente de la presente memoria descriptiva puede comprender, además, al menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente memoria descriptiva puede, por ejemplo, comprender entre dos y
- 15 ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera considerados en esta memoria descriptiva comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, un dominio CL.

7. Anticuerpos de dominio único

- [0294] En ciertas formas de realización, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de dominio
- 20 único. Un anticuerpo de dominio único es una única cadena polipeptídica que comprende la totalidad o parte del dominio variable de la cadena pesada o la totalidad o parte del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En ciertas formas de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo humano de dominio único (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, patente de EE. UU. N.º 6.248.516 B1). En una forma de realización, un anticuerpo de dominio único está formado por la totalidad
- 25 o parte del dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo.

8. Variantes de anticuerpos

- [0295] En ciertas formas de realización, se contemplan la(s) modificación(es) de la secuencia de aminoácidos descrita(s) en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, puede desearse mejorar la afinidad de unión u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de
- 30 aminoácidos del anticuerpo se pueden preparar mediante la introducción de cambios adecuados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante la síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de o inserciones dentro o sustituciones de residuos dentro de las secuencias del aminoácido del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que ésta posea las

características deseadas. Las alteraciones aminoacídicas pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del sujeto en el momento en que se realiza la secuencia.

[0296] Un método útil para la identificación de determinados residuos o regiones del anticuerpo que constituyen ubicaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanita", tal como se describe en Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En la presente memoria descriptiva, se identifica un residuo o grupo de residuos de dianas (por ejemplo, residuos cargados como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido con carga negativa o neutra (alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Estas localizaciones de los aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan al introducir más u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, a pesar de que el sitio donde se introducirá una variación de una secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación per se tenga un carácter predeterminado. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un lugar determinado, se realiza el barrido de alanina o mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las inmunoglobulinas expresadas se monitorizan para detectar la actividad deseada.

[0297] Las inserciones de la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones en los extremos amino o carboxi-terminal que abarcan desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones en la secuencia de uno o múltiples residuos de aminoácidos. Entre los ejemplos de inserciones terminales se encuentra un anticuerpo con un residuo metionil en el N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula del anticuerpo incluyen la fusión del N-terminal o C del anticuerpo con una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumente la semivida sérica del anticuerpo.

[0298] En ciertas formas de realización, un anticuerpo de la invención se altera para aumentar o reducir la glicosilación del anticuerpo. La glicosilación de los polipéptidos se realiza generalmente por enlace N u O. El enlace N se refiere a la unión de una fracción glucídica a la cadena lateral de un residuo de asparragina. Las secuencias de tripéptidos asparragina-X-serina y asparragina-X-treonina, en donde X equivale a cualquier aminoácido excepto la prolina, son las secuencias de reconocimiento para las uniones enzimáticas del residuo glucídico a la cadena lateral de asparragina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un lugar de glicosilación potencial. La glicosilación por enlace O hace referencia a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, a pesar de que también se puede utilizar 5-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina.

[0299] La adición o eliminación de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente al alterar la secuencia del aminoácido para que se cree o elimine una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos por enlace N). La alteración también se puede realizar mediante la adición de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo

original (para sitios de glicosilación unidos por enlace tipo O), o la eliminación de estos residuos o su sustitución.

[0300] Donde el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido al mismo. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidratos madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la Solicitud de patente de EE.UU. N.º 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también patente de EE.UU. N.º 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectriz en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo se describen en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet y col. y en la patente de EE.UU. N.º 6.602.684, Umaña y col. Los anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se describen en el documento WO 1997/30087, Patel y col. Véanse también los documentos WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.) con respecto a los anticuerpos con carbohidratos alterados unidos a la región Fc de los mismos. Véase también la patente de EE.UU. 2005/0123546 (Umana y col.) sobre moléculas de unión a antígeno con glicosilación modificada.

[0301] En ciertas formas de realización, una variante de glicosilación comprende una región Fc, en la que una estructura de carbohidratos anexa a la región Fc carece de fucosa. Estas variantes han mejorado la función de la ADCC. Opcionalmente, la región Fc también comprende una o más sustituciones de aminoácidos en la zona que mejora aún más la ADCC; por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 o 334, o todas ellas, de la región Fc (numeración Eu de residuos). Entre las publicaciones relacionadas con los anticuerpos "defucosilados" o "con déficit de fucosa" podríamos citar: la patente de EE.UU. N.º 2003/0157108; el documento WO 2000/61739; el documento WO 2001/29246; la patente de EE.UU. N.º 2003/0115614; la patente de EE.UU. N.º 2002/0164328; la patente de EE.UU. N.º 2004/0093621; la patente de EE.UU. N.º 2004/0132140; la patente de EE.UU. N.º 2004/0110704; la patente de EE.UU. N.º 2004/0110282; la patente de EE.UU. N.º 2004/0109865; el documento WO 2003/085119; el documento WO 2003/084570; el documento WO 2005/035586; el documento WO 2005/035778; el documento WO2005/053742; Okazaki y col. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki y col. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Entre los ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos defucosilados encontraríamos las células Lec13 de ovario de hámster chino (CHO) con déficit de fucosilación de proteínas (Ripka y col., *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); la Solicitud de patente de EE. UU. N.º US 2003/0157108 A1, Presta, L y el documento WO 2004/056312 A1, Adams y col, especialmente el ejemplo 11) y las líneas celulares bloqueadas, como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, el FUT8 y células de ovario de hámster chino (CHO) bloqueadas (Yamane-Ohnuki y col., *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

[0302] En una forma de realización, el anticuerpo se modifica para mejorar su semivida sérica. A fin de incrementar la semivida sérica del anticuerpo, se le puede incorporar un epítipo de unión a receptor de rescate (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la patente de EE.UU. N.º

5739277, por ejemplo. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "epítopo de unión a receptor de rescate" hace referencia a un epítopo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de incrementar la semivida sérica *in vivo* de la molécula de IgG (patente de EE.UU. N.º 2003/0190311, patente de EE.UU. N.º 6821505; patente de EE.UU. N.º 6165745; patente de EE.UU. N.º 5624821; patente de EE.UU. N.º 5648260; patente de EE.UU. N.º 6165745; patente de EE.UU. N.º 5834 597).

[0303] Otro tipo de variante es una variante de sustitución aminoacídica. Estas variantes reemplazan al menos un residuo de aminoácidos en la molécula del anticuerpo por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 en el título "sustituciones preferentes". Si dichas sustituciones ocasionan un cambio deseable en la actividad biológica, entonces los productos se pueden examinar y se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1, o como se describe con más detalle a continuación con referencia a las clases de aminoácidos.

TABLA 1

Residuo original	Sustituciones preferentes	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lis; Gln; Asn	Lis
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lis; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cis (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gli (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lis; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Fe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Fe	Ile
Lis (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Fe; Ile	Leu
Fe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tir	Tir
Pro (P)	Ala	Ala

172

Residuo original	Sustituciones preferentes	Sustituciones preferentes
Ser (S)	Tr	Tr
Tr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tir; Fe	Tir
Tir (Y)	Trp; Fe; Tr; Ser	Fe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Fe; Ala; Norleucina	Leu

[0304] Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la base del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación plana o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el lugar diana, o (c) el residuo de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en *Biochemistry*, segunda ed., págs. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

- (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

[0305] Alternativamente, los residuos que se obtienen naturalmente pueden dividirse en grupos en base a las propiedades comunes de las cadenas laterales:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutrales: Cis, Ser, Tr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que tiene influencia en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

[0306] Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Estos residuos sustituidos también se pueden introducir en sitios de sustitución conservadora o en los sitios restantes (no conservados).

[0307] Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Por lo general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para profundizar en su desarrollo tendrá(n) propiedades biológicas modificadas (es decir, mejoradas) con relación al anticuerpo parental desde el cual se generó (generaron). Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución implica la maduración de afinidad utilizando una presentación en fagos. De manera resumida, varios sitios de regiones hipervariables (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las sustituciones posibles de

17B

aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos así generados se representan a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones a, al menos, parte de una proteína de revestimiento de fagos (por ejemplo, con el producto del gen III de M13) que hay dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se monitorizan para detectar su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Para identificar los lugares de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede realizar mutagenia mediante barridos (por ejemplo, barridos de alanina) para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión a antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y los residuos adyacentes son candidatos a la sustitución de acuerdo con las técnicas conocidas en la materia, incluidas las explicadas en la presente memoria descriptiva. Una vez generadas dichas variantes, el panel de variantes está sujeto a examen utilizando técnicas conocidas en la materia, incluidas las descritas en la presente memoria descriptiva, y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes se pueden seleccionar para profundizar en su desarrollo.

[0308] Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante varios métodos conocidos en la materia. Estos métodos incluyen, entre otros, aislamiento desde una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos presentes en la naturaleza) o preparación mediante mutagénesis con mediación oligonucleótida (o controlada *in situ*), mutagénesis PCR y mutagénesis de módulo de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

[0309] Puede ser deseable introducir una o más modificaciones en los aminoácidos en la región Fc de anticuerpos de la invención, lo que genera una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas) que contenga una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos, incluida la de la cisteína bisagra.

[0310] Según esta descripción y los conocimientos en la materia, se contempla que en algunas realizaciones un anticuerpo de la invención pueda comprender una o más alteraciones, frente a su anticuerpo homólogo de tipo natural, por ejemplo, en la región Fc. No obstante, estos anticuerpos conservarán las mismas características necesarias para uso terapéutico, frente a su homólogo de tipo natural. Por ejemplo, se cree que se pueden realizar algunas alteraciones en la región Fc que daría como resultado una unión C1q alterada (ya sea mejorada o disminuida) o citotoxicidad dependiente de complementos (CDC), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan & Winter *Nature* 322:738-40 (1988); la patente de EE. UU. N.º 5.648.260; la patente de EE. UU. N.º 5.624.821 y el documento WO94/29351 que se refieren a otros ejemplos de variantes de regiones Fc.

Los documentos WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpos con capacidad de unión a los FcRs mejoradas o disminuidas. El contenido de estas publicaciones de patentes se incorpora específicamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Véase, además, Shields y col., *J. Biol. Chem.*, 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con un aumento de su semivida y una unión mejorada al receptor neonatal Fc (FcRn), que es responsable de la transmisión de las IgG maternas al feto (Guyer y col., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim y col., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en la patente de EE.UU. N.º 2005/0014934A1 (Hinton y col.). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la zona que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Las variantes polipeptídicas con secuencias aminoácidas de la región Fc alteradas y capacidad aumentada o disminuida de unión a Cq1 se describen en la patente de EE.UU. N.º 6.194.551B1 y el documento WO99/51642. El contenido de dichas publicaciones de patentes se incorpora específicamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Véase, además, Idusogie y col. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

[0311] En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en la interfaz de polipéptidos Fc que comprenden la región Fc, donde las modificaciones facilitan y/o fomentan la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido Fc y una cavidad en un segundo polipéptido Fc, donde la protuberancia se puede posicionar en la cavidad para que fomente la formación de complejos del primer y segundo polipéptido Fc. Los métodos de generación de anticuerpos con estas modificaciones se conocen en la materia, por ejemplo, los descritos en la patente de EE.UU. N.º 5.731.168.

9. Derivados del anticuerpo

[0312] Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse aún más a fin de que contengan fracciones no proteicas adicionales que son conocidas en la materia y se encuentran disponibles. Preferiblemente, las fracciones adecuadas para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de los polímeros solubles en agua incluyen los siguientes componentes: polietilenglicol (PEG), copolímero de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinilo, polivinilpirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero anhídrido etileno/maleico, poliaminoácidos (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, óxido de prolipropileno / copolímeros de óxido de etileno, polialcoholes polioxietilados (por ejemplo glicerol), alcohol polivinilo, y mezclas de los mismos. Es posible que el polietilenglicol propionaldehído ofrezca ventajas en la elaboración, dada su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no. La cantidad de polímeros adheridos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, los polímeros pueden ser las mismas o diferentes moléculas. Generalmente, la cantidad y/o tipo

de polímeros utilizados para la derivatización pueden determinarse en función de ciertas consideraciones, como las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el anticuerpo derivatizado será utilizado en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

[0313] En otra forma de realización, se proporcionan los conjugados del anticuerpo y la fracción no proteica que puede calentarse selectivamente mediante la exposición a radiación. En una forma de realización, la fracción no proteica es un nanotubo de carbono (Kam y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye una longitud de onda que no dañe las células comunes, pero que caliente las fracciones no proteicas hasta una temperatura en la cual se eliminen las células próximas a las fracciones no proteicas del anticuerpo.

Algunos métodos de elaboración de anticuerpos

1. Algunos métodos de hibridoma

[0314] Pueden conseguirse los anticuerpos monoclonales anti-STEAP-1 de la invención por el método del hibridoma, descrito por primera vez en Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975) o con el método del ADN recombinante (patente de EE. UU. N.º 4.816.567).

[0315] En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedero apropiado, como un hámster, se inmuniza para obtener linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Los anticuerpos anti-STEAP-1 se producen generalmente en animales mediante inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de STEAP-1 y un adyuvante. El STEAP-1 se puede preparar usando métodos bien conocidos en la materia, algunos de los cuales se describen con más detalle en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, el STEAP-1 se puede producir de forma recombinante. En una forma de realización, se inmuniza a los animales con un derivado de STEAP-1 que contiene una porción extracelular de STEAP-1 fusionado a la porción Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En una forma de realización, se inmuniza a los animales con una proteína de fusión STEAP-1-IgG1. En una forma de realización, se inmuniza a animales con derivados inmunogénicos de STEAP-1 en una solución con monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) y la solución se inyecta intradérmicamente en múltiples puntos. Dos semanas más tarde los animales reciben dosis de refuerzo. Entre siete y catorce días más tarde, se les extrae sangre a los animales y el suero se analiza para titular los anticuerpos anti-STEAP-1. Los animales reciben dosis de refuerzo hasta obtener los niveles adecuados de titulación.

[0316] De manera alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Después, los linfocitos se fusionan con las células de mieloma utilizando un agente fusionante adecuado, como por ejemplo

polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)).

[0317] Por lo tanto, las células de hibridoma preparadas se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio que contenga una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales no poseen la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas generalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células con déficit de HGPRT.

[0318] En ciertas formas de realización, las células de mieloma son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan altos niveles estables de producción de anticuerpos por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio como el medio HAT. Entre las células de mieloma ejemplares se encuentran, entre otras, las líneas de mieloma murino, como aquellas derivadas de los tumores de ratones MOPC-21 y MPC-11, disponibles en Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU., y las células SP-2 o X63-Ag8-653, disponibles en el American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[0319] El medio de cultivo en el cual las células de hibridoma crecen se analiza para la producción de anticuerpos monoclonales que se unan a STEAP-1. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma está determinada por la inmunoprecipitación o por un ensayo de unión, como el radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y col, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

[0320] Después de identificar que las células de hibridoma producen anticuerpos con la especificidad, afinidad o actividad deseada, o todos ellos, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y pueden crecer mediante métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* en un animal como tumores con ascitis. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, los fluidos ascíticos o el suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, como por ejemplo, la proteína-A-sefarosa, la cromatografía de hidroxilapatita, la electroforesis en gel, la diálisis o la cromatografía de afinidad.

2. Algunos métodos de detección de librerías

[0321] Los anticuerpos anti-STEAP-1 de la invención se pueden obtener utilizando bibliotecas combinatorias para detectar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conocen en la materia diversos métodos para generar bibliotecas de representación en imágenes de fagos y detectar dichas bibliotecas para anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Estos métodos se describen de forma general en Hoogenboom y col. (2001) en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien y col., ed., Human Press, Totowa, NJ), y en ciertas formas de realización, en Lee y col. (2004) *J. Mol. Biol.* 340:1073-1093.

[0322] En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan mediante la detección de bibliotecas de fagos que contienen fagos que representan diversos fragmentos de la región variable (Fv) de anticuerpos fusionados a proteína de revestimiento de fagos. Estas bibliotecas de fagos se criban mediante cromatografía de afinidad para detectar el antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado son adsorbidos al antígeno y, de este modo, separados de los clones de la biblioteca que no tienen capacidad de unión. Los clones con capacidad de unión se eluyen entonces del antígeno y pueden enriquecerse aún más mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígenos. Cualquiera de los anticuerpos anti-STEAP-1 de la invención se puede obtener diseñando un procedimiento apropiado de detección de antígenos para seleccionar el clon del fago de interés, seguido por la construcción de un clon del anticuerpo anti-STEAP-1 de longitud completa utilizando las secuencias de Fv del clon del fago de interés y secuencias de la región constante (Fc) adecuadas, descritas en Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

[0323] En determinadas formas de realización, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo está formado a partir de dos regiones variables (V) de unos 110 aminoácidos, una correspondiente a la cadena ligera (VL) y otra correspondiente a la cadena pesada (VH), que presentan en ambos casos tres bucles hipervariables (HVR) o regiones de determinación de complementariedad (CDR). Los dominios variables se pueden representar funcionalmente en el fago, ya sea como fragmentos de Fv de cadena única (scFv), en los que VH y VL están covalentemente enlazados por medio de un péptido corto y flexible, o como fragmentos Fab, en los que están fusionados a un dominio constante e interactúan no covalentemente, como se describe en Winter y col, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Como se usa en la presente memoria descriptiva, los clones de fagos que codifican scFv y los clones de fagos que codifican Fab se denominan colectivamente "clones de fagos Fv" o "clones Fv".

[0324] Los repertorios de genes de VH y VL se pueden clonar por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinar aleatoriamente en bibliotecas de fagos, en las que se puede buscar por clones de unión a antígeno, como se describe en Winter y col, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455

(1994). Las bibliotecas procedentes de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunógeno sin la necesidad de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio virgen se puede clonar para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos a una gran variedad de antígenos extraños y también de autoantígenos sin ninguna inmunización como se describe en Griffiths y col, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Por último, las bibliotecas nativas también se pueden producir sintéticamente mediante la clonación de segmentos de genes V no reorganizados procedentes de células madre y utilizando cebadores de la PCR que contenga secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para conseguir la reorganización *in vitro* como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

10 [0325] En determinadas formas de realización, el fago filamentoso se utiliza para representar fragmentos de anticuerpos mediante fusión a la proteína de revestimiento menor pIII. Los fragmentos de anticuerpos se pueden representar como fragmentos Fv de cadena única, en los que los dominios de VH y VL están conectados a la misma cadena polipeptídica mediante un separador de polipéptidos flexible, como se describe en Marks y col, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una
15 cadena se fusiona a pIII y la otra se segregan en el periplasma del hospedero celular bacteriano donde el ensamblaje de una estructura proteínica de revestimiento de Fab se representa en la superficie del fago mediante el desplazamiento de las proteínas de revestimiento de tipo natural, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom y col., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

[0326] En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpos se
20 obtienen a partir de inmunocitos recolectados de humanos o animales. Si se desea una biblioteca que presente un sesgo a favor de clones anti-STEAP-1, el sujeto se inmuniza con STEAP-1 para generar una respuesta a anticuerpos y las células esplénicas o los linfocitos B circulantes u otros linfocitos de la circulación periférica se recuperan para la construcción de la biblioteca. En una forma de realización preferente, una biblioteca de fragmentos de genes de anticuerpos humanos sesgada a favor de clones de
25 anti-STEAP-1 humano se obtiene al generar una respuesta a un anticuerpo anti-STEAP-1 en ratones transgénicos portadores de una matriz de genes humanos funcionales de la inmunoglobulina (y carentes de un sistema funcional de producción de anticuerpos endógenos), de forma que la inmunización con STEAP-1 da lugar a células B productoras de anticuerpos humanos anti-STEAP-1. La generación de ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos se describe más adelante.

30 [0327] El enriquecimiento adicional de poblaciones celulares reactivas a anti-STEAP-1 se puede obtener mediante un procedimiento de detección adecuado para aislar linfocitos B que expresen un anticuerpo unido a membrana específico de STEAP-1, por ejemplo, mediante separación celular con cromatografía de afinidad a STEAP-1 o adsorción de células a STEAP-1 marcada con flurocromo seguida de separación de células activadas por fluorescencia (FACS).

[0328] Alternativamente, el uso de células esplénicas y/o linfocitos B u otros PBL procedentes de un donante no inmunizado ofrece una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos usando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que STEAP-1 no es antigénico. En el caso de bibliotecas que incorporen construcción de genes de anticuerpos *in vitro*, las células madre se recolectan del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifiquen segmentos de genes de anticuerpos no organizados. Los inmunocitos de interés se pueden obtener de diversas especies animales, como humanos, ratón, rata, lagomorfa, luprina, canina, felina, porcina, bovina, equina y especies aviares, etc.

[0329] Los segmentos de regiones variables de genes anticuerpos que codifican ácidos nucleicos (incluidos los segmentos VH y VL) se recuperan a partir de las células de interés y se amplifican. En el caso de bibliotecas de genes de VH y VL reorganizadas, el ADN deseado se puede obtener aislando el ADN o el ARNm genómico de los linfocitos, seguido de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que se acoplen a los extremos 5' y 3' de los genes de la VH y la VL reorganizados, como se describe en Orlandi y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989), lo que permite obtener diversos repertorios de genes V para su expresión. Los genes V se pueden amplificar a partir del ADNc y del ADN genómico con cebadores reversos en el extremo 5' del exon que codifica el dominio V maduro y cebadores anversos dentro del segmento J como se describe en Orlandi y col. (1989) y en Ward y col., *Nature*, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar desde el ADNc, los cebadores reversos también se pueden situar en el exón líder, como se describe en Jones y col., *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), y los cebadores anversos dentro de la región constante, como se describe en Sastry y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar la degeneración en los cebadores como se describe en Orlandi y col. (1989) o Sastry y col. (1989). En ciertas formas de realización, la diversidad de bibliotecas se maximiza utilizando cebadores de la PCR dirigidos a cada familia de genes V para amplificar todas las organizaciones disponibles de VH y VL presentes en la muestra de ácidos nucleicos de inmunocitos, por ejemplo, como se describe en el método de Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) o como se describe en el método de Orum y col., *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión, se pueden introducir sitios de restricción poco habituales dentro del cebador de la PCR como una marca en un extremo, según se describe en Orlandi y col. (1989), o mediante una nueva amplificación de la PCR con un cebador marcado, como se describe en Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991).

[0330] De segmentos de genes V *in vitro* se pueden derivar repertorios de genes V sintéticamente reorganizados. La mayoría de los segmentos de genes VH humanos se han clonado y secuenciado (según Tomlinson y col. *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)), y mapeados (según Matsuda y col., *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993); estos segmentos clonados (incluidas todas las principales conformaciones del bucle H1 y H2)

se pueden utilizar para generar diversos repertorios de genes VH con cebadores de la PCR que codifican bucles de H3 de secuencia y longitud diversas, como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Los repertorios de VH también se pueden hacer con toda la diversidad de secuencias centrada en un bucle de H3 largo de una única longitud, como se describe en Barbas y col., *Proc. Natl.*

- 5 *Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos V_{κ} y V_{λ} humanos se han clonado y secuenciado (según se explica en Williams y Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) y se pueden utilizar para hacer repertorios sintéticos de la cadena ligera. Los repertorios de genes V sintéticos, basados en una gran variedad de dominios de VH y VL, y longitudes de L3 y H3, codificarán anticuerpos de considerable diversidad estructural. Tras la amplificación de los ADN codificadores de genes V, los segmentos de genes
- 10 V de línea germinal se pueden reorganizar *in vitro* según los procedimientos de Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

- [0331] Se pueden construir repertorios de fragmentos de anticuerpos mediante combinación de repertorios de genes de VH y VL juntos de varias formas. Cada repertorio se puede crear en vectores diferentes y los vectores se pueden recombinar *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe y col.,
- 15 *Gene*, 128: 119-126 (1993), o *in vivo* mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse y col., *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). El procedimiento de la recombinación *in vivo* se aprovecha de las dos cadenas de los fragmentos Fab para superar el límite en el tamaño de la biblioteca impuesto por la eficacia de transformación de *E. coli*. Los repertorios de VH y VL vírgenes se clonan por separado, uno en un fagémido y el otro en un vector fágico. Las dos bibliotecas se
- 20 combinan a continuación mediante infección fágica de bacterias que contienen fagémidos, de forma que cada célula contiene una combinación distinta y el tamaño de la biblioteca sólo está limitado por el número de células presente (unos 10^{12} clones). Los dos vectores contienen seales de recombinación *in vivo*, por lo que los genes VH y VL se recombinan en un único replicón y se introducen en viriones fágicos. Estas enormes bibliotecas proporcionan gran número de diversos anticuerpos con buena afinidad (K_d^{-1} de
- 25 aproximadamente 10^{-8} M).

- [0332] Alternativamente, los repertorios se pueden clonar secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), o ensamblar juntos mediante PCR y, posteriormente, clonarse, como se describe en Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991). El ensamblaje de la PCR también se puede utilizar para unir los ADN de la VH y la
- 30 VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv de cadena única (scFv). En otra técnica, "el ensamblaje de la PCR en el interior de la célula" se usa para combinar genes VH y VL dentro de linfocitos mediante PCR y, posteriormente, clonar repertorios de genes enlazados, como se describe en Embleton y col., *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

[0333] Los anticuerpos producidos por bibliotecas nativas (ya sea naturales o sintéticas) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M^{-1}), pero la maduración de la afinidad también se puede imitar *in vitro* mediante construcción y reelección a partir de bibliotecas secundarias, como se describe en Winter y col. (1994), mencionado anteriormente. Por ejemplo, la mutación se puede introducir aleatoriamente *in vitro* utilizando polimerasa con tendencia al error (explicado en Leung y col., *Technique*, 1: 11-15 (1989)) en el método de Hawkins y col., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) o en el método de Gram y col., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 3576-3580 (1992). Asimismo, la maduración de la afinidad se puede realizar mediante mutación aleatorizada de una o más CDR, por ejemplo, utilizando PCR con cebadores de secuencia aleatoria que abarquen la CDR de interés, en clones de Fv individuales seleccionados y detecten clones de afinidad más alta. El documento WO 9607754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describía un procedimiento para inducir la mutagenia en una región de determinación de complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulinas para crear una librería de genes de la cadena ligera. Otro método eficaz consiste en recombinar los dominios de VH o VL seleccionados por representación de fagos con repertorios de variantes de dominio V que se producen naturalmente obtenidos a partir de donantes no inmunizados y detectar los de mayor afinidad en varias series de nueva transposición de cadenas, como se describe en Marks y col., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpos con afinidades del orden de 10^{-9} M o menos.

[0334] La detección de las bibliotecas se puede lograr mediante diversas técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, se puede utilizar STEAP-1 para revestir los pocillos de placas de adsorción, expresado en hospederos celulares en placas de adsorción o utilizada en separación celular, o conjugada con biotina para captura con partículas revestidas de estreptavidina, o utilizadas en cualquier otro procedimiento conocido en la materia para detectar bibliotecas de representación de imágenes de fagos.

[0335] Las muestras de bibliotecas de fagos están en contacto con el STEAP-1 inmovilizado en condiciones aptas para la unión de al menos una porción de partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluido el pH, la concentración iónica, la temperatura y similares, se seleccionan de forma que imiten condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y, posteriormente, se eluyen mediante ácido, por ejemplo, como se describe en Barbas y col., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991), o mediante álcali, por ejemplo, como se describe en Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o mediante competición antigénica con STEAP-1, por ejemplo, en un procedimiento similar al procedimiento de competición antigénica de Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991). Los fagos se pueden enriquecer de 20 a 1.000 veces en una única serie de selección. Además, los fagos enriquecidos se pueden cultivar en cultivos bacterianos y estar sometidos a nuevas series de selección.

[0336] La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluida la cinética de la disociación durante el lavado y si múltiples fragmentos de anticuerpos de un único fago se pueden unir simultáneamente a antígeno. Los anticuerpos con rápida cinética de disociación (y afinidades de unión débiles) se pueden conservar mediante el uso de lavados cortos, representación de imágenes de fagos multivalente y densidad de revestimiento alta del antígeno en fase sólida. La densidad elevada no sólo estabiliza al fago durante las interacciones multivalentes, sino que, además, favorece la unión del fago disociado otra vez. La selección de anticuerpos con lenta cinética de disociación (y buenas afinidades de unión) se puede promover mediante el uso de largos lavados y representación de imágenes de fagos monovalentes, como se describe en Bass y col., *Proteins*, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de revestimiento del antígeno como se describe en Marks y col., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

[0337] Es posible seleccionar entre anticuerpos de fagos de distintas afinidades, incluso con afinidades que difirieren ligeramente, para STEAP-1. Sin embargo, la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, como la realizada en algunas de las técnicas de maduración de la afinidad) es probable que ocasione muchos mutantes, la mayoría de unión a antígeno, y unos cuantos con afinidad más alta. Con un STEAP-1 limitado, es raro que se pudieran completar fagos de alta afinidad. Para conservar todos los mutantes de afinidad más alta, los fagos se pueden incubar con una cantidad mayor de STEAP-1 biotinilado, pero con el STEAP-1 biotinilado a una concentración de molaridad menor de la constante de afinidad molar diana para STEAP-1. Los fagos con afinidad de unión más alta pueden, entonces, ser capturados por partículas paramagnéticas revestidas de estreptavidina. Esta "captura en equilibrio" permite seleccionar los anticuerpos según sus afinidades de unión, son una sensibilidad que permite aislar clones mutantes con una afinidad tan solo dos veces más elevada de la enorme cantidad de fagos con afinidad menor. Las condiciones usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también se pueden manipular para distinguirlos en función de la cinética de disociación.

[0338] Los clones anti-STEAP-1 se pueden seleccionar en función de la actividad. En ciertas formas de realización, la invención proporciona anticuerpos anti-STEAP-1 que se unen a células vivas que expresan naturalmente el STEAP-1. En una forma de realización, la invención proporciona anticuerpos anti-STEAP-1 que bloquean la unión entre un ligando de STEAP-1 y STEAP-1, pero no bloquean la unión entre un ligando de STEAP-1 y una segunda proteína. Los clones de Fv que corresponden a estos anticuerpos anti-STEAP-1 se pueden seleccionar (1) aislando clones anti-STEAP-1 de una biblioteca de fagos como se ha descrito antes y, opcionalmente, amplificando la población aislada de clones de fagos mediante el cultivo de la población en un hospedero bacteriano apropiado; (2) seleccionando STEAP-1 y una segunda proteína contra la que se desea una actividad bloqueante y no bloqueante, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones de fagos anti-STEAP-1 a STEAP-1 inmovilizado; (4) usando una mayor cantidad de

la segunda proteína para eluir los clones no deseados que reconocen los determinantes de unión a STEAP-1 que se solapan o se comparten con los determinantes de unión de la segunda proteína y (5) elución de los clones que todavía no se han adsorbido tras el paso (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades bloqueantes/no bloqueantes deseadas se pueden enriquecer también mediante repetición de los procedimientos de selección descritos en la presente memoria descriptiva una o más veces.

[0339] El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o los clones de Fv de la invención es rápidamente aislado y secuenciado utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando cebadores oligonucleóticos diseñados para amplificar específicamente las regiones que codifican las cadenas ligera y pesada de interés de plantillas de ADN de fagos o hibridoma). Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que después se transfectan en células anfitrión, como por ejemplo las células E. coli, las células COS de monos, las células de ovario de hámster chino (CHO) o las células de mieloma que, de otro modo, no producen la proteína de la inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células anfitrión recombinantes. Los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias del ADN que codifican el anticuerpo incluyen Skerra y col., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) y Pluckthun, *Immunol. Revs*, 130: 151 (1992).

[0340] El ADN que codifica los clones de Fv de la invención se pueden combinar con secuencias de ADN conocidas que codifican las regiones constantes de la cadena ligera y/o la cadena pesada (por ejemplo, las secuencias de ADN apropiadas se pueden obtener según Kabat y col., mencionado anteriormente) para formar clones que codifiquen cadenas ligeras y/o pesadas de longitud total o parcial. Se tendrá en cuenta que las regiones constantes de cualquier isótopo se pueden utilizar para este fin, incluidas las regiones constantes IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes se pueden obtener de cualquier especie animal o humana. Un clon de Fv se deriva del ADN del dominio variable de una especie animal (por ejemplo, un humano) y, luego, se fusiona al ADN de la región constante de otra especie animal para formar una o más secuencias de codificación, puesto que una cadena ligera y/o pesada de longitud completa e "híbrida" está incluida en la definición de anticuerpo "híbrido" y "quimérico" como se usa en la presente memoria descriptiva. En determinadas formas de realización, un clon de Fv derivado de ADN variable humano se fusiona con ADN de región constante humano para formar una o más secuencias de codificación para todas las cadenas ligeras y/o pesadas de longitud parcial o completa y humanas.

[0341] El ADN que codifica un anticuerpo anti-STEAP-1 derivado de un hibridoma de la invención también se puede modificar, por ejemplo, mediante sustitución de las secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma por la secuencia de codificación para los dominios constantes de la cadena ligera y pesada humanas (por ejemplo, como en el método de Morrison y col., *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado del clon de Fv o un hibridoma se puede modificar a su vez mediante el enlace covalente a la secuencia de codificación de la inmunoglobulina de la totalidad o parte de la secuencia de codificación de un polipéptido que no sea inmunoglobulina. De este modo, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tiene la especificidad de unión de los anticuerpos de la invención derivados del clon de hibridoma o del clon de Fv.

3. *Vectores, células hospederas y métodos recombinantes*

[0342] Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para la clonación subsiguiente (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleótidas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Hay muchos vectores disponibles. La elección del vector depende en parte del hospedero celular que se utilice. Por lo general, las células hospederas son de origen procariótico o eucariótico (por lo general, de mamíferos). Se tendrá en cuenta que las regiones constantes de cualquier isótopo se pueden utilizar para este fin, incluidas las regiones constantes IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes se pueden obtener de cualquier especie animal o humana.

Generación de anticuerpos usando células hospederas eucarióticas:

Construcción de vectores

[0343] Las secuencias de polinucleótidos que codifican los componentes de polipéptidos del anticuerpo de la invención se pueden obtener utilizando técnicas recombinantes estándar. Las secuencias deseadas de polinucleótidos se pueden aislar y secuenciar a partir de anticuerpos que producen células, como por ejemplo células de hibridoma. Alternativamente, los polinucleótidos se pueden sintetizar usando técnicas de PCR o sintetizador de nucleótidos. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en los hospederos procarióticos. Muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la materia se pueden utilizar para el fin de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se van a insertar en el vector y de la célula hospedera concreta que se transformará con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo o ambas) y su compatibilidad con la célula hospedera concreta en la que resida. Por lo general, los componentes del vector incluyen, entre otros: un origen de replicación, un gen marcador de la selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia de señal, la inserción del ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

[0344] En general, los vectores plásmidos que contienen secuencias de control y replicón que se derivan de especies compatibles con la célula hospedera se usan en conexión con estos hospederos. Por lo general, el vector lleva un sitio de replicación, así como secuencias de marcado, que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma

5 habitualmente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie *E. coli*. El pBR322 contiene genes que codifican la resistencia a la ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, de este modo, proporcionan una forma fácil de identificar células transformadas. El pBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos pueden contener también, o ser modificados para que contengan, promotores que pueden ser utilizados por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Ejemplos de
10 derivados del pBR322 usados para la expresión de anticuerpos concretos se describen en detalle en Carter y col., patente de EE.UU. N.º 5.648.237.

[0345] Además, los vectores fágicos que contienen secuencias de control y replicón que son compatibles con los microorganismos hospederos se pueden usar como vectores de transformación en relación con estos hospederos. Por ejemplo, un bacteriófago como λ GEM.TM.-11 se puede utilizar para
15 marcar un vector recombinante que se pueda utilizar para transformar células hospederas susceptibles como *E. coli* LE392.

[0346] El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotores de cistrón, que codifiquen cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida situada antes del extremo (5') del promotor en un cistrón que modula su
20 expresión. Los promotores procarióticos suelen pertenecer a dos clases: inducibles y constitutivos. El promotor inducible es aquel que inicia un aumento de los niveles de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en las condiciones del cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura.

[0347] Se conoce un gran número de promotores reconocidos por diversas células hospederas posibles. El promotor seleccionado puede enlazarse funcionalmente al ADN del cistrón que codifica la cadena pesada o ligera mediante eliminación del promotor del ADN fuente a través de digestión enzimática mediante restricción e inserción de la secuencia aislada del promotor en el vector de la invención. Tanto la
25 secuencia nativa del promotor como muchos promotores heterólogos se pueden utilizar para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas formas de realización, se utilizan promotores heterólogos, puesto que por lo general permiten una mayor transcripción y una mayor producción del gen
30 diana expresado, frente al promotor polipeptídico diana nativo.

[0348] Los promotores aptos para su uso con hospederos procarióticos incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de lactosa y β -galactamasa, un sistema promotor a base de triptofano (trp) y promotores híbridos como el promotor tac o el trc. Sin embargo, también son aptos otros promotores que

son funcionales en bacterias (como otros promotores de fagos o bacterianos conocidos). Se han publicado sus secuencias de nucleótidos, lo que permite que un experto pueda ligarlas a cistrones que codifiquen las cadenas pesada y ligera dianas (Siebenlist y col., (1980) *Cell* 20: 269) usando enlazadores o adaptadores que proporcionen sitios de restricción necesarios.

5 **[0349]** En un aspecto de la invención, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de la secuencia de señal de la secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados en una membrana. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia de señal seleccionada a efectos de esta invención es aquella que la célula hospedera reconoce y procesa (es decir, escindida por una peptidasa de señal). Para las células hospederas procarióticas que no reconocen ni procesan las secuencias de señal nativas a los polipéptidos heterólogos, la secuencia de señal se sustituye por una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, entre un grupo formado por fosfatasa alcalina, penicilasa, lpp o líderes de enterotoxina II termoestable (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una forma de realización de la invención, las secuencias de señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias de señal STII o variantes de las mismas.

15 **[0350]** En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas según la invención puede tener lugar en el citoplasma de la célula hospedera y, por lo tanto, no requiere la presencia de secuencias de señal de secreción dentro de cada cistrón. A este respecto, las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina se expresan, multiplican y ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma.

20 Determinadas cepas de hospederos (por ejemplo, las cepas de *E. coli* trxB) ofrecen condiciones citoplasmáticas que son favorables a la formación de uniones de disulfuros, lo que permite una multiplicación y ensamblaje correctos de las subunidades de las proteínas expresadas. Proba y Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

25 **[0351]** Los anticuerpos de la invención también se pueden producir usando un sistema de expresión en el que la relación cuantitativa de los componentes polipeptídicos expresados se pueda modular para maximizar la producción de anticuerpos secretados y debidamente ensamblados de la invención. Esta modulación se logra al menos en parte mediante modulación simultánea de concentraciones translacionales para los componentes polipeptídicos.

30 **[0352]** Una técnica para la modulación de la concentración translacional se divulga en Simmons y col., patente de EE.UU. N.º 5.840.523. Utiliza variantes de la región de iniciación translacional (TIR) dentro de un cistrón. Para una TIR dada, se puede crear una serie de variantes de secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos con un intervalo de concentraciones translacionales, lo que proporciona un medio conveniente mediante el cual ajustar este factor al nivel de expresión deseado de la cadena específica. Las variantes de la TIR se pueden generar mediante técnicas de mutagenia convencionales que

dan lugar a cambios en codones que pueden alterar la secuencia aminoacídica. En ciertas formas de realización, los cambios en la secuencia de nucleótidos son silenciosos. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o espaciado de secuencias de Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia de la señal. Un método para generar secuencias de señal mutantes es generar un "banco de codones" al inicio de una secuencia de codificación que no cambie la secuencia de aminoácidos de la secuencia de la señal (es decir, los cambios son silenciosos). Esto se puede conseguir cambiando la posición del tercer nucleótido de cada codón; además, algunos aminoácidos, como leucina, serina y arginina, tienen múltiples posiciones primera y segunda que pueden añadir complejidad para realizar el banco. Este método de mutagenia se describe en detalle en Yansura y col., (1992) *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4:151-158.

[0353] En una forma de realización, un conjunto de vectores se genera con un intervalo de concentraciones de TIR para cada cistrón en ellos. Este conjunto limitado permite una comparación de los niveles de expresión de cada cadena, así como la producción de los productos deseados de anticuerpos en varias combinaciones de concentraciones de TIR. Las concentraciones TIR se pueden determinar cuantificando el nivel de expresión de un gen indicador como se describe en detalle en Simmons y col., patente de EE.UU. N.º 5.840.523. En función de la comparación de las concentraciones translacionales, las TIR individuales se seleccionan para su combinación en los constructos del vector de expresión de la invención.

[0354] Las células hospederas procarióticas aptas para la expresión de anticuerpos de la invención incluyen Archaeobacteria y Eubacteria, como microorganismos grampositivos o gramnegativos. Entre los ejemplos de bacterias útiles se incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacilli* (por ejemplo, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, las especies *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En una forma de realización, se utilizan células gramnegativas. En una forma de realización, se utilizan células *E. coli* como hospederas para la invención. Entre los ejemplos de cepas *E. coli* se incluyen la cepa W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), págs. 1190-1219; depósito en la ATCC N.º 27.325) y derivados de las mismas, que incluyen la cepa 33D3 con el genotipo W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) $ptr3$ $lac Iq$ $lacL8$ $\Delta ompT$ $\Delta (nmpc-fepE)$ $degP41$ $kanR$ (patente de EE.UU. N.º 5.639.635). Otras cepas y derivados de las mismas, como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* λ 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) también están indicados. Estos ejemplos tienen carácter ilustrativo y no limitador. Los métodos para la construcción de derivados de cualquiera de las bacterias antes mencionadas con genotipos definidos son conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en Bass y col., *Proteins*, 8:309-314 (1990). Por lo general, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las

células de una bacteria. Por ejemplo, las especies *E. coli*, *Serratia* o *Salmonella* se pueden usar bien como hospederos cuando plásmidos bien conocidos como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 se utilizan para suministrar al replicón. Normalmente, en caso de que la célula hospedera deba secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas puede resultar conveniente incorporar al cultivo celular inhibidores adicionales de la proteasa.

Producción de anticuerpos

[0355] Las células hospederas se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados como es adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[0356] Transformación significa introducir ADN en el hospedero procariótico de forma que el ADN sea replicable, ya sea como elemento extracromosómico o como integrante cromosómico. Según la célula hospedera que se utilice, la transformación se realiza empleando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio se usa por lo general para células bacterianas que contienen barreras sustanciales en la pared celular. Otro método de transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica utilizada es la electroporación.

[0357] Las células procarióticas utilizadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en la materia y aptos para el cultivo de células hospederas seleccionadas. Ejemplos de medios apropiados son caldo de luria (LB) más nutrientes complementarios necesarios. En algunas formas de realización, los medios también contienen un agente de selección, elegido en función de la construcción del vector de expresión, para permitir el crecimiento selectivo de células procarióticas que contengan el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios de cultivo para el crecimiento de células que expresan un gen resistente a ampicilina.

[0358] Los anticuerpos necesarios aparte de carbono, nitrógeno y fuentes inorgánicas de fosfato también se pueden incluir a concentraciones apropiadas introducidas solas en una mezcla con otro suplemento o medio de cultivo como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados a partir del grupo formado por glutatona, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritriol y ditiotreitól.

[0359] Las células hospederas procarióticas se cultivan a temperaturas apropiadas. En algunas formas de realización, para el crecimiento de *E. coli*, las temperaturas oscilan entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 39 °C; entre aproximadamente 25 °C y aproximadamente 37 °C; o aproximadamente 30 °C. El pH del medio de cultivo puede ser cualquiera comprendido entre 5 y 9,

dependiendo principalmente del organismo hospedero. En ciertas formas de realización, el pH para *E. coli* puede oscilar entre 6,8 y 7,4 aproximadamente o 7,0 aproximadamente.

[0360] Si un promotor inducible se utiliza en el vector de expresión de la invención, la expresión de la proteína se induce en condiciones aptas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, los promotores PhoA se utilizan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Según esto, las células hospederas transformadas se cultivan en un medio limitador de fosfato para la inducción. En algunas formas de realización, el medio de cultivo limitador de fosfato es el C.R.A.P (véase, por ejemplo, Simmons y col., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Se pueden utilizar otros inductores diversos, según el constructo de vector empleado, como se sabe en la materia.

[0361] En una forma de realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan en el periplasma de las células hospederas y se recuperan allí. La recuperación de las proteínas generalmente supone la ruptura de los microorganismos, por lo general mediante choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez producida la ruptura de las células, los desechos celulares o células enteras se pueden eliminar mediante centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse más, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad con resina. De manera alternativa, pueden transportarse proteínas dentro de los medios de cultivo y aislarse en él. Las células pueden retirarse del cultivo, y el sobrenadante del cultivo puede filtrarse y concentrarse para proceder a la posterior purificación de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden volver a aislarse e identificarse mediante métodos comúnmente conocidos, como la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y ensayo Western blot.

[0362] En uno de los aspectos de la invención, la producción de anticuerpos se realiza en gran cantidad mediante proceso de fermentación. Existen varios procesos disponibles de fermentación de lotes alimentados a gran escala para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala se realizan en dispositivos de al menos 1.000 litros de capacidad y, en ciertas formas de realización, entre 1.000 y 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores utilizan agitadores de hélice para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente preferente de carbono/energía). La fermentación a pequeña escala hace referencia generalmente a la fermentación en fermentadores de aproximadamente no más de 100 litros de capacidad volumétrica, y pueden variar de 1 a 100 litros aproximadamente.

[0363] En un proceso de fermentación, la inducción de expresión proteica se inicia típicamente después de que las células hayan crecido en condiciones adecuadas hasta alcanzar la densidad deseada, por ejemplo una OD₅₅₀ de entre 180-220, momento en el cual las células se encuentran en la fase estacionaria temprana. Pueden usarse distintos inductores, de acuerdo con el constructo del vector utilizado, tal y como se conoce en la materia y como se ha descrito anteriormente. Las células pueden hacerse crecer durante períodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen normalmente durante unas 12-50 horas, aunque es posible utilizar tiempos de inducción más prolongados o más cortos.

[0364] Pueden modificarse distintas condiciones de fermentación para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje adecuado y el plegamiento de los polipéptidos de anticuerpos secretados, pueden utilizarse vectores adicionales que sobreexpresan la proteína chaperona, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidil-propil cis,trans-isomerasa con actividad chaperona) para co-transformar las células hospederas procarióticas. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan la solubilidad y el plegamiento adecuado de las proteínas heterólogas producidas en células bacterianas hospederas. Chen y col., (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605; Georgiou y col., patente de EE.UU. N.º 6.083.715; Georgiou y col., patente de EE.UU. N.º 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie y col., (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

[0365] Pueden utilizarse ciertas cepas hospederas con deficiencia de enzimas proteolíticas para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas (especialmente las que son sensibles desde el punto de vista proteolítico). Por ejemplo, las cepas de células hospederas pueden modificarse para efectuar mutaciones genéticas relativas a los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas, como la Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de éstas. Algunas cepas de *E. coli* con deficiencia de proteasas están disponibles, y descritas, por ejemplo en Joly y col. (1998), citado anteriormente; Georgiou y col., patente de EE.UU. N.º 5.264.365; Georgiou y col., patente de EE.UU. N.º 5.508.192; Hara y col., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

[0366] En una forma de realización, en el sistema de expresión de la invención se utilizan como células hospederas cepas de *E. coli* con deficiencia de enzimas proteolíticas transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas.

Purificación de anticuerpos

[0367] En una forma de realización, la proteína de anticuerpo que se produce mediante la invención descrita en la presente memoria se purifica más para obtener preparaciones que son substancialmente homogéneas para posteriores ensayos y usos. Pueden emplearse métodos estándar conocidos en la materia para la purificación de proteínas. Los siguientes procedimientos tienen carácter ejemplar en lo que se refiere a procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de intercambio iónico o de inmutaafinidad, precipitación en etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía en anhídrido silícico o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, precipitación en sulfato de amonio y filtrado en gel mediante, por ejemplo, Sephadex G-75.

[0368] En un aspecto, se utiliza Proteína A inmovilizada en una fase sólida para purificación por inmutaafinidad de los productos de anticuerpos de la invención. La proteína A es una proteína de pared celular de 41kD del *Staphylococcus aureus* que se une con gran afinidad por la región Fc de los

anticuerpos. Lindmark y col., (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. La fase sólida a la que se fija la Proteína A puede ser una columna que contenga una superficie de vidrio o anhídrido silícico, o una columna de ácido silícico o de vidrio poroso controlado. En ciertas aplicaciones, la columna se recubre con un reactivo, como el glicerol, para evitar una posible adherencia inespecífica de contaminantes.

- 5 [0369] Como primer paso de purificación, una preparación derivada del cultivo celular, según lo descrito anteriormente, puede aplicarse a una fase sólida de Proteína A inmovilizada para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la Proteína A. La fase sólida se lavaría a continuación, para eliminar los contaminantes unidos inespecíficamente a ella. Finalmente, el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida mediante elución.

10 Generación de anticuerpos usando células hospederas eucarióticas:

 [0370] Un vector para utilizar en una célula hospedera eucariótica incluye, por lo general, uno o más de los siguientes componentes no limitantes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un potenciador, un promotor y una secuencia de finalización de la transcripción.

Componente de secuencia de señal

- 15 [0371] Un vector para utilizar en una célula hospedera eucariótica puede contener también una secuencia de señal u otro polipéptido con una escisión específica en el N-terminal de la proteína madura o polipéptido de interés. La secuencia de señal heteróloga seleccionada puede ser aquella que la célula hospedera reconoce y procesa (es decir, escindida por una peptidasa de señal). En la expresión celular de los mamíferos, están disponibles las secuencias de señal de los mamíferos así como los líderes secretorios víricos, por ejemplo, la señal del herpes simplex gD. El ADN para la región de dicho precursor
- 20 está ligado en la estructura de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

Origen de la replicación

- [0372] Por lo general, no es necesario un componente origen de la replicación para los vectores de expresión en mamíferos. Por ejemplo, el origen SV40 se puede utilizar habitualmente sólo porque contiene el promotor precoz.
- 25

Componente gen de selección

- [0373] Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) otorgan resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b)
- 30 complementan las deficiencias auxotróficas, si procede o (c) suministran nutrientes básicos no disponibles a partir de medios complejos.

[0374] Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedera. Estas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que otorga resistencia al fármaco y, así, sobrevive a la estrategia de selección. Ejemplos de esta selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

5 [0375] Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son los que permiten la identificación de las células encargadas de absorber el ácido nucleico del anticuerpo, como DHFR, timidina cinasa, metalotioneína I y II, preferiblemente, genes de metalotioneína en primates, adenosina deaminasa, ornitina decarboxilasa, etc.

10 [0376] Por ejemplo, en algunas formas de realización, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero a través del cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo del DHFR. En algunas formas de realización, una célula hospedera adecuada cuando se utiliza el DHFR de tipo natural es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad del DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

15 [0377] Alternativamente, las células hospederas (en especial los hospederos naturales que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, la proteína DHFR natural y otro marcador seleccionable como la aminoglicosida 3'-fosfotransferasa (APH) puede seleccionarse mediante crecimiento celular en un medio que contenga un agente de selección para el marcador seleccionable, como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, canamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE.UU. N.º 4.965.199.

20 Componente promotor

[0378] Los vectores de expresión y clonación suelen contener un promotor que es reconocido por el organismo hospedero y está operativamente enlazado al ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo). Se conocen las secuencias de promotores para eucariotas. Por ejemplo, prácticamente todos los genes eucarióticos poseen una región rica en AT situada aproximadamente entre las bases 25 y 30 antes del extremo 5' del promotor desde donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada entre las bases 70 y 80 antes del extremo 5' del promotor desde el inicio de la transcripción de muchos genes es la región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos se encuentra una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli(A) al extremo 3' de la secuencia de codificación.

30 En ciertas formas de realización, la totalidad o algunas de estas secuencias se pueden insertar sin problemas en vectores de expresión eucarióticos.

[0379] La transcripción a partir de los vectores en células hospederas de mamíferos está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus como el poliomavirus,

el virus de la viruela de las aves de corral, el adenovirus (como el Adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviario, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y el Simian Virus 40 (SV40); a partir de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, o a partir de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de las células hospederas.

[0380] Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen fácilmente como un fragmento de restricción del SV40, que también contiene el origen viral de replicación del SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene fácilmente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para la expresión del ADN en hospederos de mamíferos que utilizan el virus del papiloma bovino como vector se da a conocer en la patente de EE.UU N.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE.UU N.º 4.601.978. Véase también Reyes y col., *Nature* 297:598-601 (1982) para la expresión del ADNc del interferón beta humano en células de ratón bajo el control de un promotor timidina cinasa del virus del herpes simplex. Alternativamente, la repetición del terminal largo del virus del sarcoma de Rous se puede utilizar como promotor.

Componente elemento potenciador

[0381] La transcripción de ADN que codifica un anticuerpo de esta invención a través de eucariotas más altas se aumenta con frecuencia al insertar la secuencia de un potenciador en el vector. Se conocen ya muchas secuencias de potenciadores de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, fetoproteína alfa e insulina). No obstante, lo habitual es que se utilice un potenciador procedente de un virus de células eucarióticas. Entre los ejemplos destacan el potenciador SV40 en el lado tardío del origen de la replicación (bp 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de la replicación y los potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982), que describe los elementos de potenciación para activar los promotores eucarióticos. El potenciador puede empalmarse en el vector en una posición 5' a 3' a la secuencia de codificación del polipéptido del anticuerpo, pero está situado generalmente en un sitio 5' desde el promotor.

Componente de finalización de la transcripción

[0382] Los vectores de expresión utilizados en células hospederas eucarióticas pueden también contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Estas secuencias están habitualmente disponibles desde las regiones no traducidas del extremo 5' y ocasionalmente el 3' de los ADN o ADNc virales o eucarióticos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de finalización de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión que se da a conocer en el mismo.

Selección y transformación de células hospederas

[0383] Entre las células hospederas apropiadas para clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente memoria descriptiva figuran las células eucariotas más altas, incluidas las células hospederas de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivos (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento habitual. Ejemplos de líneas celulares útiles de mamíferos son la línea CV1 de riñón del mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 ó 293 células subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de crías de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); células sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células caninas de riñón (MDCK, ATCC CCL 34); células de riñón de ratas búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células humanas de pulmón (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4 y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

[0384] Las células hospederas se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción del anticuerpo y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados como es adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Cultivo de células hospederas

[0385] Las células hospederas utilizadas para producir un anticuerpo de esta invención se pueden cultivar en diversos medios. Medios comercialmente disponibles como Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) son aptos para el cultivo de células hospederas. Además, cualquiera de los medios de cultivo descritos en Ham y col., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes y col., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), patentes de EE.UU. N.º 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, 4.560.655 ó 5.122.469; el documento WO 90/03430; el documento WO 87/00195; o la patente de EE.UU. Ref. 30.985 se pueden utilizar como medios de cultivo para células hospederas. Cualquiera de estos medios se puede complementar cuando sea necesario con hormonas y otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (como HEPES), nucleótidos (como adenosina y timidina), antibióticos (como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos de traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes por lo habitual en las concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También pueden incluirse otros

suplementos en las concentraciones adecuadas conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones del cultivo, tales como la temperatura o el pH, entre otras, son las utilizadas anteriormente con la célula hospedera seleccionada para la expresión y serán evidentes para los expertos.

Purificación del anticuerpo

5 **[0386]** Al utilizar técnicas recombinantes, se puede producir el anticuerpo intracelularmente o directamente secretado en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primer paso, los residuos de partículas, ya sean células hospederas o fragmentos lisados, se pueden eliminar, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltrado. Cuando el anticuerpo es secretado en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se pueden concentrar primero utilizando un filtro para concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo una unidad de ultrafiltrado Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de la proteasa como PMSF en cualquiera de las fases anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes casuales.

15 **[0387]** La composición del anticuerpo preparado a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad. Esta última es una técnica de purificación conveniente. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de las especies y del isotipo de cualquier dominio Fc de la inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ (Lindmark y col., *J. Immunol. Methods* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para la $\gamma 3$ humana (Guss y col., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que el ligando de afinidad se une puede ser agarosa, pero también están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, como vidrio poroso controlado o poli(estireno-divinil)benceno, permiten tasas de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, New Jersey) es útil para la purificación. También están disponibles, dependiendo del anticuerpo que quiera recuperarse, otras técnicas para la purificación de las proteínas, como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en anhídrido silícico, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio iónico o catiónico (como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE y precipitación en sulfato de amonio.

30 **[0388]** Siguiendo cualquiera de las fases preliminares de purificación, la mezcla que contiene el anticuerpo de interés y los contaminantes puede estar sujeta a nuevas etapas de purificación, por ejemplo, mediante cromatografía de interacción hidrófoba con pH bajo utilizando una solución de elución a un pH entre 2,5 y 4,5, generalmente a concentraciones bajas en sal (por ejemplo, entre 0-0,25M aproximadamente).

[0389] En general, están consolidados en la materia diversos métodos para la preparación de anticuerpos para uso en investigación, pruebas y uso clínico, son coherentes con todo lo anterior y/o se consideran apropiados por un experto en la materia para un anticuerpo concreto de interés.

Inmunos conjugados

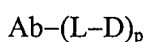
5 [0390] La invención también proporciona inmunos conjugados (también denominados "conjugados de anticuerpos con fármacos" o "ADC"), que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-STEAP-1 de la invención conjugado a uno o más agentes citotóxicos como por ejemplo un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, animal o vegetal, o fragmentos de la misma) o un
10 isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

[0391] En ciertas formas de realización, un inmunos conjugado comprende un anticuerpo anti-STEAP-1 y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunos conjugados se describen en la presente memoria descriptiva (por ejemplo, anteriormente). También se pueden utilizar toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas y se describen en la presente memoria descriptiva.
15

[0392] En ciertas formas de realización, un inmunos conjugado comprende un anticuerpo anti-STEAP-1 y una o más toxinas de molécula pequeña, incluyendo, entre otros, fármacos de molécula pequeña como caliqueamicina, maitansinoide, dolastatina, auristatina, tricoteceno y CC1065, así como los derivados de estos fármacos que tengan actividad citotóxica. A continuación, se describen detalladamente ejemplos de estos inmunos conjugados.
20

1. Inmunos conjugados ejemplares

[0393]. Un inmunos conjugado (o "conjugado de anticuerpo con fármacos" ("ADC")) de la invención puede ser la Fórmula I, que figura a continuación, donde un anticuerpo anti-STEAP-1 se conjuga (es decir, se une covalentemente) con una o más fracciones de fármaco (D) a través de un enlazador opcional (L).



Fórmula I

[0394]. Por consiguiente, el anticuerpo anti-STEAP-1 se puede conjugar con el fármaco ya sea directamente o mediante un enlazador. En la Fórmula I, p es el promedio de fracciones de fármaco por anticuerpo, que puede oscilar, por ejemplo, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20, fracciones de fármaco por anticuerpo y, en ciertas formas de realización, entre 1 y aproximadamente 8 fracciones de fármaco por anticuerpo.
30

Enlazadores ejemplares

[0395]. En la presente memoria descriptiva se detallan enlazadores y fracciones de fármacos ejemplares. Un enlazador puede comprender uno o más componentes enlazadores. Los componentes de enlace ejemplares incluyen: 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit" o "vc"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobensiloxycarbonil ("PAB"), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC"), N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"), y etileneoxi-CH₂CH₂O- como una o más unidades repetidoras ("EO" o "PEO"). Diversos componentes enlazadores son conocidos en la materia y algunos se describen más adelante.

[0396]. Un enlazador puede ser un "enlazador escindible", que facilite la liberación de un fármaco en la célula. Por ejemplo, puede utilizarse un enlazador lábil al ácido (por ejemplo, hidrazona), un enlazador sensible a la proteasa (por ejemplo, sensible a la peptidasa), un enlazador fotolábil, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contenga disulfuro (Chari y col., *Cancer Research* 52:127131 (1992); patente de EE.UU. N.º 5.208.020).

[0397]. En una forma de realización, el enlazador L de un ADC posee la fórmula:



en la que:

-A- es una unidad de extensión unida covalentemente a un tiol de cisteína del anticuerpo (Ab),

a es 0 ó 1,

cada -W- es independientemente una unidad de aminoácidos,

w es independientemente un número entero que oscila entre 0 y 12,

-Y- es una unidad espaciadora unida covalentemente a una fracción de fármaco e

y es 0, 1 ó 2.

Unidad de extensión

[0398]. La unidad de extension (-A-), cuando está presente, es capaz de unir una unidad de anticuerpos a una unidad de aminoácidos (-W-). Al respecto, un anticuerpo (Ab) posee un grupo tiol de cisteína libre que puede formar un enlace con un grupo electrofílico funcional de una unidad de extensión. Las unidades de extensión ejemplares en los conjugados de Fórmula I se describen en las Fórmulas II y III, en las que Ab-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se definió anteriormente y R¹⁷ es un radical divalente seleccionado de (CH₂)_r, C₃-C₈ carbociclilo, O-(CH₂)_r, arileno, (CH₂)_r-arileno, -arileno-(CH₂)_r-, (CH₂)_r-(C₃-C₈ carbociclilo), (C₃-C₈ carbociclilo)-(CH₂)_r, C₃-C₈ heterociclilo, (CH₂)_r-(C₃-C₈ heterociclilo), -(C₃-C₈ heterociclilo)-(CH₂)_r-, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-,

$-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-$, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$,
 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-$, $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ y
 $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r-$; donde R^b es H, C_1-C_6 alquilo, fenilo o bencilo y r es independientemente un número entero que oscila entre 1 y 10.

5 **[0399].** El arileno incluye radicales de hidrocarburo aromático divalente de entre 6 y 20 átomos de carbono derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del sistema del anillo aromático. Los grupos de arileno típicos incluyen, entre otros, radicales derivados del benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo, y similares.

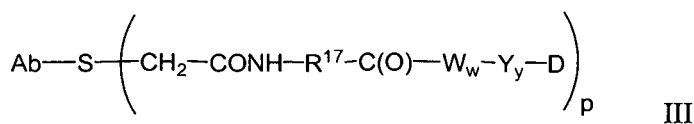
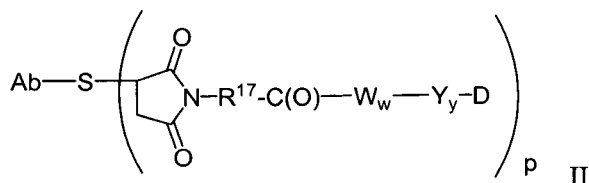
10 **[0400].** Los grupos heterociclilos incluyen un sistema de anillos en el que uno o más átomos en anillo es un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y sulfuro. El radical heterociclo comprende de 1 a 20 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S. Un heterociclo puede ser un monociclo con 3 a 7 anillos (de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S) o un biciclo con 7 a 10 anillos (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6]. Los
 15 heterociclos se describen en Paquette, Leo A.; *Principles of Modern Heterocyclic Chemistry* (W.A. Benjamin, New York, 1968), especialmente en los capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; *The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs* (John Wiley y Sons, New York, 1950 a nuestros días), particularmente en los volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y *J. Am. Chem. Soc.* (1960) 82:5566.

20 **[0401].** Ejemplos de heterociclos son piridil, dihidropiridil, tetrahidropiridil (piperidil), tiazolil, tetrahidrotiofeno, tetrahidrotiofeno de azufre oxidado, pirimidinil, furanil, tienil, pirrolil, pirazolil, imidazolil, tetrazolil, benzofuranil, tianaftalenil, indolil, indolenil, quinolinil, isoquinolinil, benzimidazolil, piperidinil, 4-piperidonil, pirrolidinil, 2-pirrolidonil, pirrolinil, tetrahidrofuranil, bis-tetrahidrofuranil, tetrahidropiraniil, bis-tetrahidropiraniil, tetrahidroquinolinil, tetrahidroisoquinolinil, decahidroquinolinil, octahidroisoquinolinil, azocinil, triazinil, 6H-1,2,5-tiadiazinil, 2H,6H-1,5,2-ditiazinil, tienil, tiantrenil,
 25 piranil, isobenzofuranil, chromenil, xantenil, fenoxatinil, 2H-pirrolil, isotiazolil, isoxazolil, pirazinil, piridazinil, indolizinil, isoindolil, 3H-indolil, 1H-indazolil, purinil, 4H-quinolizinil, ftalazinil, naftiridinil, quinoxalinil, quinazolinil, cinnolinil, pteridinil, 4Ah-carbazolil, carbazolil, β -carbolinil, fenantridinil, acridinil, pirimidinil, fenantrolinil, fenazinil, fenotiazinil, furazanil, fenoxazinil, isochromanil, chromanil, imidazolidinil, imidazolinil, pirazolidinil, pirazolinil, piperazinil, indolinil, isoindolinil, quinuclidinil,
 30 morfolinil, oxazolidinil, benzotriazolil, benzisoxazolil, oxindolil, benzoxazolinil e isatinoil, entre otros.

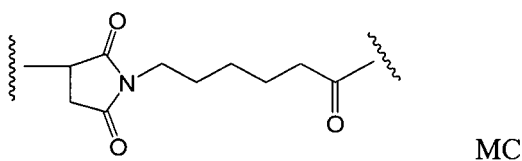
[0402]. Los grupos carbociclilos incluyen un anillo saturado o insaturado con entre 3 y 7 átomos de carbono como monociclo o entre 7 y 12 átomos de carbono como biciclo. Los carbociclos monociclicos tienen de 3 a 6 átomos en anillo y aún con más frecuencia 5 ó 6 átomos en anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen de 7 a 12 átomos en anillo, por ejemplo, dispuestos como un sistema biciclo

[4,5], [5,5], [5,6] o [6,6] o de 9 a 10 átomos en anillo dispuestos como un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. Ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropil, ciclobutil, ciclopentil, 1-ciclopent-1-enil, 1-ciclopent-2-enil, 1-ciclopent-3-enil, ciclohexil, 1-ciclohex-1-enil, 1-ciclohex-2-enil, 1-ciclohex-3-enil, cicloheptil y ciclooctil.

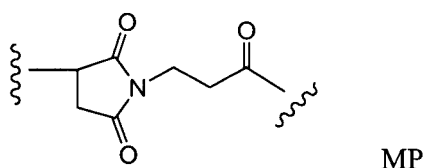
- 5 [0403]. Se debe comprender a partir de todas las formas de realización ejemplares de ADC de Fórmula I, como II-VI, que aún cuando no se lo denote expresamente, entre 1 y 4 fracciones de fármacos se unen a un anticuerpo ($p = 1-4$), dependiendo de la cantidad de residuos diseñados con cisteína.



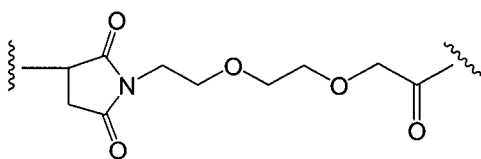
- 10 [0404]. Una unidad de extensión ilustrativa de Fórmula II deriva de maleimida-caproila (MC) donde R^{17} es $-(\text{CH}_2)_5-$:



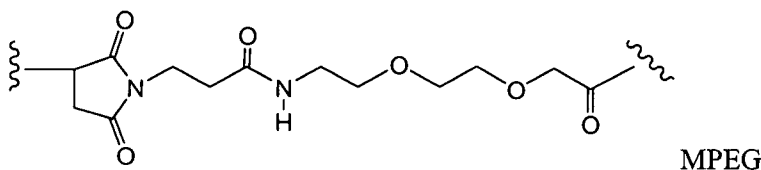
- [0405]. Una unidad de extensión ilustrativa de Fórmula II y deriva de maleimida-propanoilo (MP) donde R^{17} es $-(\text{CH}_2)_2-$:



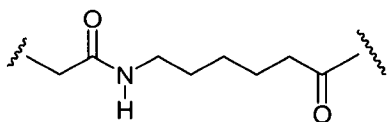
- [0406]. Otra unidad de extensión ilustrativa de Fórmula II en la que R^{17} es $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{-CH}_2-$ y r es 2:



- [0407]. Otra unidad de extensión ilustrativa de Fórmula II en la que R^{17} es $-(\text{CH}_2)_r\text{C(O)NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{-CH}_2-$ donde R^b es H y cada r es 2:

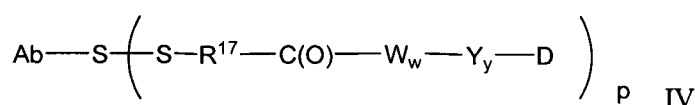


[0408]. Una unidad de extensión ilustrativa de Fórmula III en la que R^{17} es $-(CH_2)_5-$:

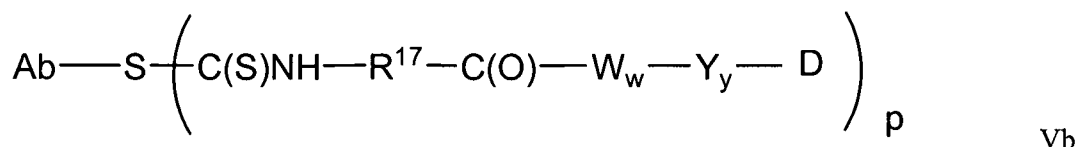
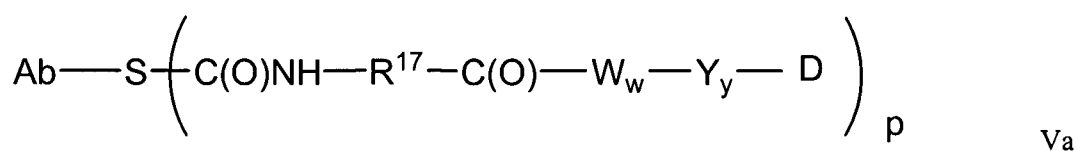


[0409]. En otra forma de realización, la unidad de extensión se une al anticuerpo anti-STEAP-

- 5 1 diseñado con cisteína mediante un enlace disulfuro entre el átomo de sulfuro diseñado con cisteína del anticuerpo y un átomo de sulfuro de la unidad de extensión. Una unidad de extensión representativa de esta forma de realización se describe en la Fórmula IV, en la que R^{17} , Ab-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal cual se definieron anteriormente.



- 10 [0410]. En otra forma de realización, el grupo reactivo de la unidad de extensión contiene un grupo funcional de reactivos de tiol que pueden formar un enlace con un tiol de cisteína libre de un anticuerpo. Entre los ejemplos de los grupos funcionales que reaccionan con el tiol se pueden mencionar, entre otros, la maleimida, α -haloacetil, éteres activados como los ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenil, ésteres de pentafluorofenil, ésteres de tetrafluorofenil, anhídridos, cloruros de ácidos, fluoruro
- 15 sulfonil, isocianatos e isotiocianatos. Unidades de extensión representativas de esta forma de realización se describen en la Fórmula Va y Vb en la que R^{17} , Ab-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal cual se definieron anteriormente.



- 20 [0411]. En otra forma de realización, el enlazador puede ser de tipo dendrítico para facilitar el enlace covalente de más de una fracción de fármacos a un anticuerpo mediante una fracción de enlazador multifuncional ramificado (Sun y col., (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215;

Sun y col., (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768; King (2002) *Tetrahedron Letters* 43:1987-1990). Los enlazadores dendríticos pueden incrementar la proporción molar de un fármaco a un anticuerpo, es decir, la concentración, que se relaciona con la potencia del ADC. Por lo tanto, cuando un conjugado de anticuerpos con fármacos sólo contiene un grupo de tioles de cisteína reactiva, se pueden unir

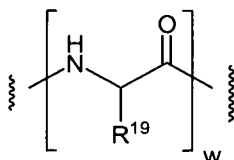
5 muchas fracciones de fármaco a través de un enlazador dendrítico.

Unidad de aminoácidos

[0412]. El enlazador puede incluir residuos de aminoácidos. La unidad de aminoácidos (-W_w-), cuando está presente, une el anticuerpo (Ab) con la fracción de fármaco (D) del conjugado de anticuerpo diseñado con cisteína con fármacos (ADC) de la invención.

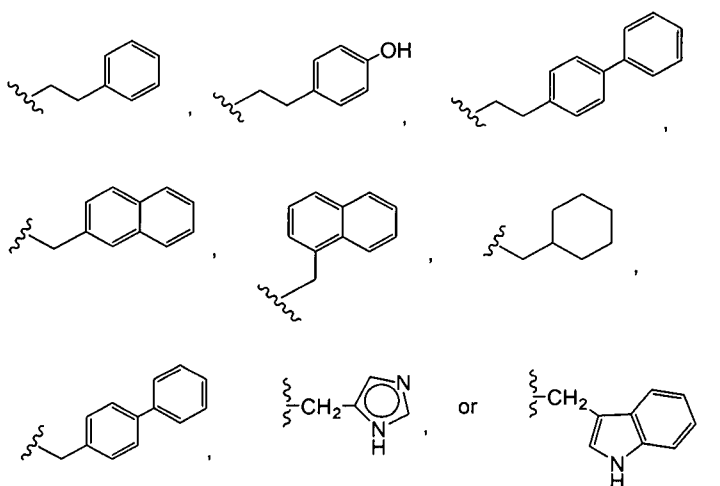
10 [0413]. -W_w- es una unidad dipéptida, tripéptida, tetrapéptida, pentapéptida, hexapéptida, heptapéptida, octapéptida, nonapéptida, decapeptida, undecapéptida o dodecapéptida. Los residuos de aminoácidos que comprenden la unidad de aminoácidos incluyen aquellos que se producen de forma natural, así como también los aminoácidos menores y los análogos de aminoácidos que no se producen de forma natural, como la citrulina. Cada unidad -W- tiene independientemente la fórmula que se muestra a

15 continuación entre corchetes; w es un número entero que oscila entre 0 y 12.



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

20



[0414]. Cuando R^{19} es otro elemento que no sea hidrógeno, el átomo de carbono al cual R^{19} se une es quiral. Cada átomo de carbono al cual R^{19} se une es independiente en la configuración (S) o (R) o una mezcla racémica. Por lo tanto, las unidades de aminoácidos pueden ser enantioméricamente puras, racémicas o diastereoméricas.

5 [0415]. Las unidades de aminoácidos $-W_w-$ ejemplares incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ejemplares incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos ejemplares incluyen: glicina-valina-citrulina (gli-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gli-gli-gli). Los residuos de aminoácidos que comprenden un componente enlazador de aminoácidos incluyen aquellos que se producen de forma natural, tales como los aminoácidos
10 menores y los análogos de aminoácidos que no se producen de forma natural, como la citrulina.

[0416]. La unidad de aminoácidos puede separarse enzimáticamente por una o más enzimas, incluyendo una proteasa asociada a un tumor, para liberar la fracción de fármaco (-D), que en una forma de realización se le incorpora un protón *in vivo* en la liberación para proporcionar un fármaco (D). Los componentes enlazadores de aminoácidos pueden designarse y optimizarse en su selectividad para la
15 escisión enzimática mediante una enzima específica, por ejemplo, una proteasa asociada a un tumor, cathepsina B, C y D o una proteasa plasmina.

Unidad espaciadora

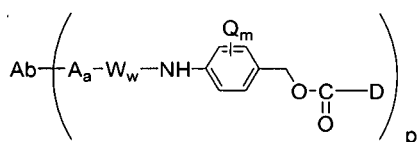
[0417]. La unidad espaciadora $(-Y_y-)$, cuando se encuentra presente ($y = 1$ ó 2), une una unidad de aminoácidos $(-W_w-)$ a una fracción de fármaco (D) cuando una unidad de aminoácidos se
20 encuentra presente ($w = 1-12$). Alternativamente, la unidad espaciadora une la unidad de extensión a la fracción de fármaco cuando la unidad de aminoácidos no está presente. La unidad espaciadora también une la fracción de fármaco a la unidad de anticuerpos cuando la unidad de aminoácidos y la unidad de extensión no están presentes ($w, y = 0$). Las unidades espaciadoras son de dos tipos generales: autoinmoladoras y no autoinmoladoras. Una unidad espaciadora no autoinmoladora es aquella en la que la totalidad o parte de la unidad espaciadora se mantiene unida a la fracción de fármaco después de la escisión, particularmente enzimática, de una unidad de aminoácidos del conjugado de anticuerpos con fármacos o del enlazador de fracciones de fármaco. Cuando un ADC con una unidad espaciadora de glicina-glicina o una unidad espaciadora de glicina sufre una escisión enzimática a través de una proteasa asociada a una célula tumoral, una proteasa asociada a una célula cancerosa o una proteasa asociada a un
30 linfocito, una fracción de fármaco de glicina-glicina o una fracción de fármaco de glicina se separa de $Ab-A_a-W_w-$. En una forma de realización, una reacción de hidrólisis independiente se produce dentro de la célula diana, lo cual separa el enlace de la fracción de fármaco de la glicina y libera el fármaco.

[0418]. En otra forma de realización, -Y_y- es una unidad de p-aminobencilcarbamoil (PAB) cuya porción de fenileno se sustituye por Q_m, donde Q es -C₁-C₈ alquilo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -halógeno, -nitro o -ciano y m es un número entero que oscila entre 0 y 4.

5 [0419]. Las formas de realización ejemplares de una unidad espaciadora no autoinmoladoras son: -Gly-Gly- ; -Gly- ; -Ala-Phe- ; -Val-Cit- .

[0420]. En una forma de realización, se proporciona un enlazador de fracciones de fármaco o un ADC en el que la unidad espaciadora está ausente (y=0) o está una de sus sales o disolventes farmacéuticamente aceptables.

10 [0421]. Alternativamente, un ADC que contiene una unidad espaciadora autoinmoladora puede liberar -D. En una forma de realización, -Y- es un grupo PAB unido a -W_w- a través del átomo de nitrógeno del amino del grupo PAB y está conectado directamente a -D a través de un carbonato, carbamato o grupo de éteres, donde el ADC posee la estructura ejemplar:



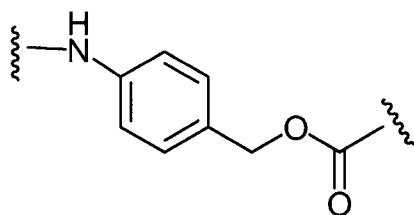
15 donde Q es -C₁-C₈ alquilo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que oscila entre 0 y 4, y p oscila entre 1 y 4.

[0422]. Otros ejemplos de espaciadores autoinmoladores incluyen, entre otros, compuestos aromáticos que se asemejan electrónicamente al grupo PAB, como los derivados del 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay y col., (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237), análogos de PAB heterocíclicos (patente de EE.UU. N.º 2005/0256030), beta-glucorónido (documento WO 2007/011968) y orto- o para-aminobencilacetales. Se pueden utilizar espaciadores que se sometan a ciclización tras hidrólisis de la unión amida, como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituido y no sustituido (Rodrigues y col., (1995) *Chemistry Biology* 2: 223); sistemas de anillo biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] sustituidos adecuadamente (Storm y col. (1972) *J. Amer. Chem. Soc.*, 94:5815) y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry y col., (1990) *J. Org. Chem.*, 55:5867). La eliminación de fármacos con aminas que se sustituyen en la glicina (Kingsbury y col. (1984) *J. Med. Chem.* 27:1447) también es un ejemplo de espaciadores autoinmoladores útiles en los ADC.

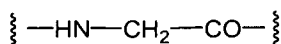
20

25

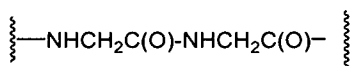
[0423]. Las Fórmulas X-XII representan las unidades espaciadoras ejemplares (-Y_y-).



X



XI

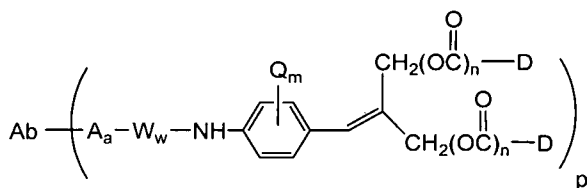


XII

Enlazadores dendríticos

- 5 [0424]. En otra forma de realización, el enlazador L puede ser de tipo dendrítico para facilitar el enlace covalente de más de una fracción de fármacos a un anticuerpo a través de una fracción de enlazador multifuncional ramificado (Sun y col., (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215; Sun y col., (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768). Los enlazadores dendríticos pueden incrementar la proporción molar de un fármaco a un anticuerpo, es decir, la
- 10 concentración, que se relaciona con la potencia del ADC. Por lo tanto, cuando un conjugado de anticuerpos con fármacos sólo contiene un grupo de tioles de cisteína reactiva, se pueden unir muchísimas fracciones de fármaco a través de un enlazador dendrítico. Entre las formas de realización ejemplares de enlazadores dendríticos ramificados se puede mencionar 2,6-bis(hidroximetil)-p-cresol y unidades de dendrímeros de 2,4,6-tris(hidroximetil)-fenol (documento WO 2004/01993; Szalai y col., (2003) *J. Amer. Chem. Soc.* 125:15688-15689; Shamis y col., (2004) *J. Amer. Chem. Soc.* 126:1726-1731; Amir y col., (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:4494-4499).
- 15

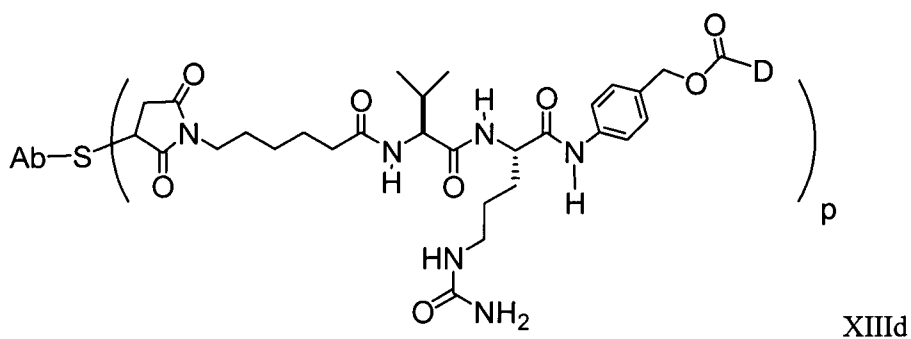
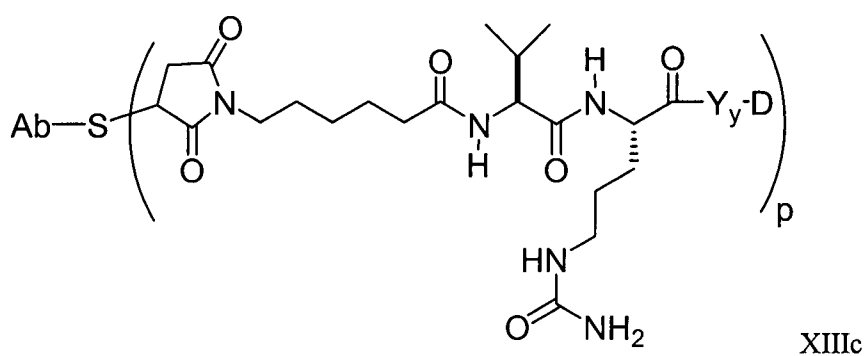
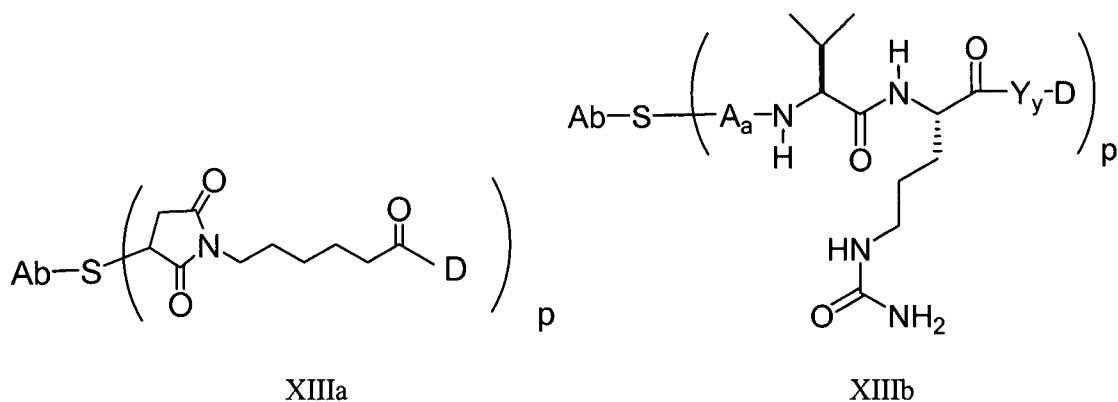
[0425]. En una forma de realización, una unidad espaciadora es una unidad ramificada de bis(hidroximetil)estireno (BHMS), que se puede utilizar para incorporar y liberar múltiples fármacos, que posean la siguiente estructura:



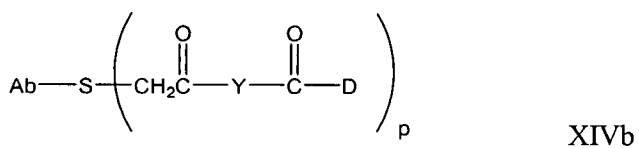
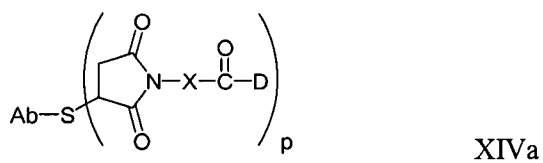
20

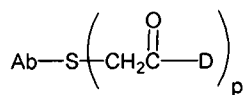
que compendia una unidad de dendrímeros de 2-(4-aminobencilideno)propano-1,3-diol (documento WO 2004/043493; de Groot y col., (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:4490-4494), donde Q es -C₁-C₈ alquilo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que oscila entre 0 y 4; n es 0 ó 1 y p oscila entre 1 y 4.

[0426]. Formas de realización ejemplares de los compuestos de conjugados de anticuerpos con fármacos de Fórmula I incluyen XIIIa (MC), XIIIb (val-cit), XIIIc (MC-val-cit) y XIId (MC-val-cit-PAB):

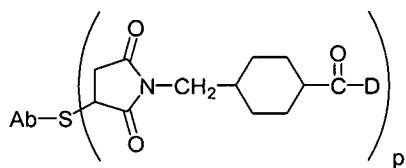


[0427]. Otras formas de realización ejemplares de los compuestos de conjugados de anticuerpos con fármacos de Fórmula Ia incluyen XIV a-e:

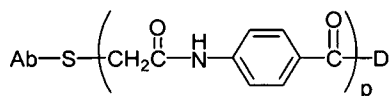




XIVc

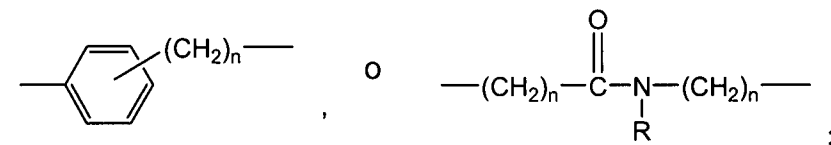
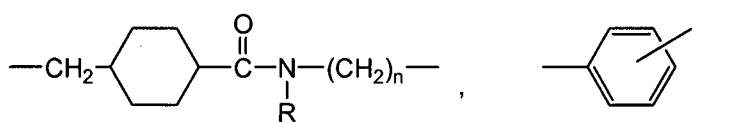
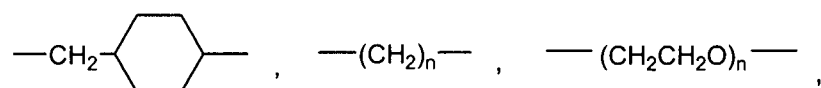


XIVd



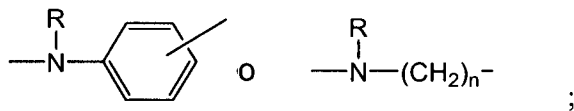
XIVe

donde X es:



5

Y es:



y R es independientemente H o C₁–C₆ alquilo y n oscila entre 1 y 12.

[0428]. En otra forma de realización, un enlazador posee un grupo funcional reactivo que posee un grupo nucleofílico reactivo a un grupo electrofílico presente en un anticuerpo. Algunos de los grupos electrofílicos útiles en un anticuerpo incluyen, entre otros, los grupos carbonilos de aldehídos y acetonas. El heteroátomo de un grupo nucleofílico de un enlazador puede reaccionar con un grupo electrofílico en un anticuerpo y formar un enlace covalente a una unidad de anticuerpos. Entre los grupos nucleofílicos útiles en un enlazador se puede mencionar la hidracida, oxima, amina, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y aril-hidracida. El grupo electrofílico en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión con un enlazador.

[0429]. Por lo general, los enlazadores tipo péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre uno o más aminoácidos o fragmentos de péptidos. Estos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis de fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke (1965) *The Peptides*, volumen 1, págs. 76-136, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los enlazadores intermedios pueden ensamblarse con cualquier combinación o secuencia de reacciones incluyendo unidades espaciadoras, de extensión y de aminoácidos. Las unidades espaciadoras, de extensión y de aminoácidos pueden utilizar grupos funcionales reactivos que sean de naturaleza electrofílicos, nucleofílicos o sin radicales. Los grupos funcionales reactivos incluyen, entre otros, los carboxilos, hidroxilos, para-nitrofenilcarbonato, isotiocianato y grupos salientes como O-mesil, O-tosil, -Cl, -Br, -I o maleimida.

[0430]. En otra forma de realización, el enlazador puede sustituirse con grupos que modularon la solubilidad o reactividad. Por ejemplo, un sustituto cargado, como el sulfonato ($-\text{SO}_3^-$) o amonio, puede incrementar la solubilidad en agua del reactivo y facilitar la reacción de unión del reactivo enlazador con el anticuerpo o la fracción de fármacos, o facilitar la reacción de unión de Ab-L (enlazador a anticuerpo intermedio) con D o D-L (enlazador a fármaco intermedio) con Ab, dependiendo de la ruta sintética empleada para preparar el ADC.

Fracciones de fármacos ejemplares

Maitansina y maitansinoides

[0431]. En algunas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con una o más moléculas de maitansinoides. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez a partir del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. n° 3896111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producían maitansinoides, como el maitansinol y los ésteres de C-3 maitansinol (patente de EE.UU. n° 4.151.042). El maitansinol sintético y sus derivados y análogos se detallan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N°s. 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663 y 4.371.533.

[0432]. Las fracciones de fármacos maitansinoides son fracciones de fármacos que resultan atractivas para la elaboración de conjugados de anticuerpos con fármacos por sus siguientes características: (i) son relativamente accesibles en lo que se refiere a su preparación mediante fermentación, modificación química o derivación de productos de fermentación, (ii) son fáciles de someter a derivación, con grupos funcionales adecuados para conjugación a través de los ligandos no disulfuro con anticuerpos, (iii) estabilidad en plasma, y (iv) resultan efectivos frente a distintas líneas celulares tumorales.

[0433]. Los compuestos de maitansina aptos para uso como fracciones de fármacos maitansinoides son bien conocidos en el sector y se pueden aislar de fuentes naturales según métodos conocidos o se pueden producir mediante técnicas de ingeniería genética (véase Yu y col. (2002) *PNAS* 99:7968-7973). El maitansinol y los análogos del maitansinol también se pueden preparar de forma sintética mediante métodos conocidos.

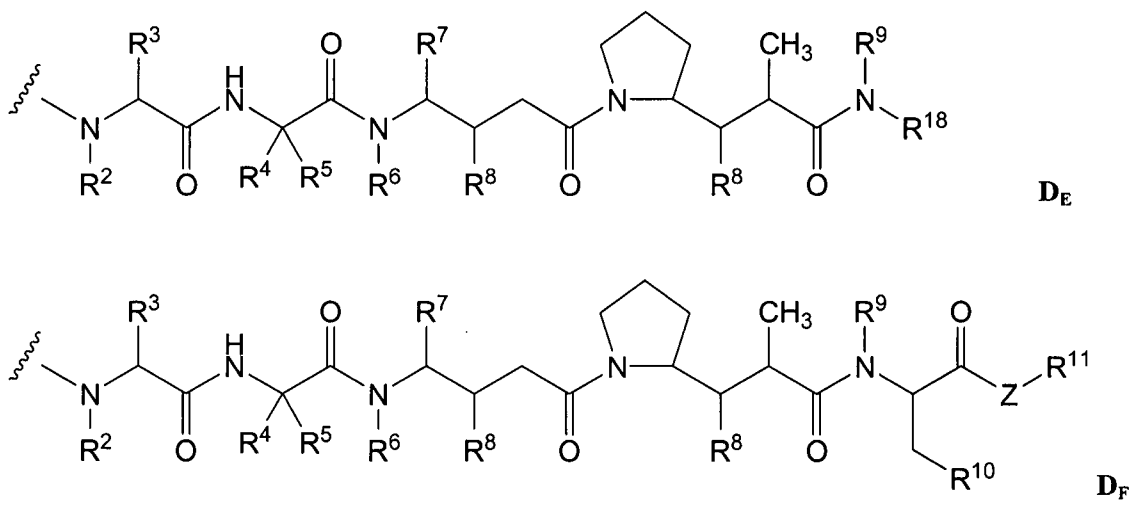
[0434]. A continuación se citan algunos ejemplos de formas de realización ejemplares de fracciones de fármacos maitansinoides: DM1; DM3; y DM4, tal como se describe en la presente memoria.

Auristatinas y dolastatinas

[0435]. En algunas formas de realización, un inmunocombinado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con dolastatina o un análogo o derivado peptídico de la dolastatina, por ejemplo, una auristatina (Patentes de EE.UU. núms. 5635483; 5780588). Se ha demostrado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, la hidrólisis GTP, y la división nuclear y celular (Woyke y col. (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) y tiene actividad antineoplásica (Patente de EE.UU. n.º5663149) y antifúngica (Pettit y col. (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). La porción del fármaco auristatina o dolastatina puede estar unida al anticuerpo a través de los extremos terminales N (amino) o C (carboxil) de la porción peptídica del fármaco (WO 02/088172).

[0436]. Entre las formas de realización ejemplares de auristatina están las fracciones DE y DF de fármacos de monometilauristatina enlazados al extremo N-terminal, descritas en Senter y col., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume 45, Abstract Number 623, presentada el 28 de marzo de 2004, cuyo contenido se incluye expresamente en su totalidad a modo de referencia.

[0437]. Una fracción peptídica de un fármaco puede seleccionarse entre las Fórmulas D_E and D_F siguientes:



donde la línea ondulada de D_E y D_F indica el punto de unión covalente a un anticuerpo o a un componente ligando-anticuerpo, e independientemente en cada ubicación:

R² se selecciona entre H y alquilo C₁-C₈;

5 R³ se selecciona entre H, C₁-C₈ alquilo, C₃-C₈ carbociclo, arilo, C₁-C₈ alquilo-arilo, C₁-C₈ alquilo-(C₃-C₈ carbociclo), C₃-C₈ heterociclo y C₁-C₈ alquilo-(C₃-C₈ heterociclo);

R⁴ se selecciona entre H, C₁-C₈ alquilo, C₃-C₈ carbociclo, arilo, C₁-C₈ alquilo-arilo, C₁-C₈ alquilo-(C₃-C₈ carbociclo), C₃-C₈ heterociclo y C₁-C₈ alquilo-(C₃-C₈ heterociclo);

R⁵ se selecciona entre H y metilo;

10 o R⁴ y R⁵ forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR^aR^b)_n- donde R^a y R^b se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁-C₈ y carbociclo C₃-C₈, y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6;

R⁶ se selecciona entre H y C₁-C₈ alquilo;

R⁷ se selecciona entre H, C₁-C₈ alquilo, C₃-C₈ carbociclo, arilo, C₁-C₈ alquilo-arilo, C₁-C₈ alquilo-(C₃-C₈ carbociclo), C₃-C₈ heterociclo y C₁-C₈ alquilo-(C₃-C₈ heterociclo);

15 cada R⁸ se selecciona independientemente entre H, OH, C₁-C₈ alquilo, C₃-C₈ carbociclo y O-(C₁-C₈ alquilo);

R⁹ se selecciona entre H y C₁-C₈ alquilo;

R¹⁰ se selecciona entre arilo o C₃-C₈ heterociclo;

Z es O, S, NH o NR¹², donde R¹² es C₁-C₈ alquilo;

20 R¹¹ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₂₀, arilo, heterociclo C₃-C₈, -(R¹³O)_m-R¹⁴, o -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂;

m es un entero comprendido entre 1 y 1.000;

R¹³ es C₂-C₈ alquilo;

R¹⁴ es H o C₁-C₈ alquilo;

25 cada R¹⁵ es independientemente H, COOH, -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, -(CH₂)_n-SO₃H, o -(CH₂)_n-SO₃-C₁-C₈ alquilo;

cada R¹⁶ es independientemente H, C₁-C₈ alquilo, o -(CH₂)_n-COOH;

R¹⁸ se selecciona entre -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-arilo, -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(C₃-C₈ heterociclo), y -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(C₃-C₈ carbociclo); y

30 n es un número entero comprendido entre 0 y 6.

[0438]. En una forma de realización R³, R⁴ y R⁷ son independientemente isopropilo o sec-butilo y R⁵ es -H o metilo. En una forma ejemplar de realización, R³ y R⁴ son isopropilo, R⁵ es -H, y R⁷ es sec-butilo.

[0439]. En otra forma de realización, R² y R⁶ son metilo y R⁹ es -H.

[0440]. En otra forma de realización, cada R^8 es $-OCH_3$.

[0441]. En una forma ejemplar de realización, R^3 y R^4 son isopropilo, R^2 y R^6 son metilo, R^5 es $-H$, R^7 es sec-butilo, cada R^8 es $-OCH_3$ y R^9 es $-H$.

[0442]. En una forma de realización, Z es $-O-$ o $-NH-$.

5 [0443]. En una forma de realización, R^{10} es arilo.

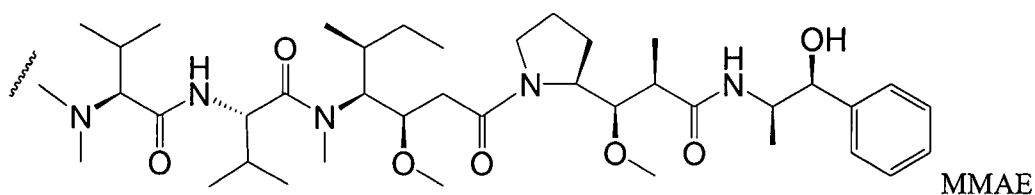
[0444]. En una forma ejemplar de realización, R^{10} es $-fenilo$.

[0445]. En una forma ejemplar de realización, cuando Z es $-O-$, R^{11} es $-H$, metilo o t -butilo.

[0446]. En una forma de realización, cuando Z es $-NH$, R^{11} es $-CH(R^{15})_2$, donde R^{15} es $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, y R^{16} es $-C_1-C_8$ alquilo o $-(CH_2)_n-COOH$.

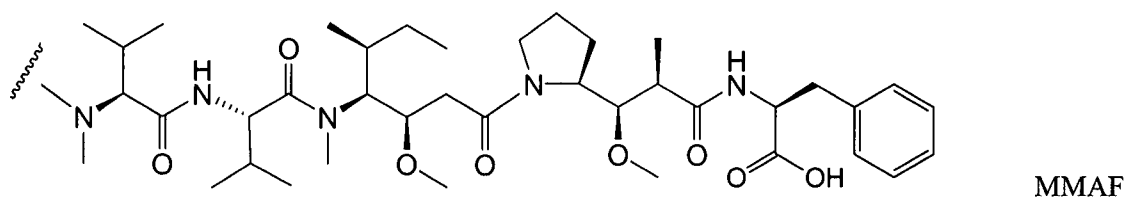
10 [0447]. En otra forma de realización, cuando Z es $-NH$, R^{11} es $-CH(R^{15})_2$, donde R^{15} es $-(CH_2)_n-SO_3H$.

[0448]. Una forma ejemplar de realización con auristatina de la fórmula D_E es MMAE, donde la línea ondulada indica el enlace covalente a un ligando (L) de un conjugado de anticuerpo con fármaco:



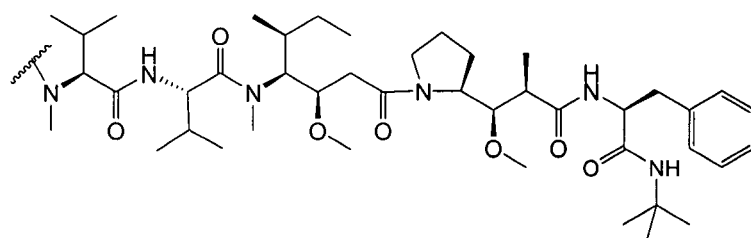
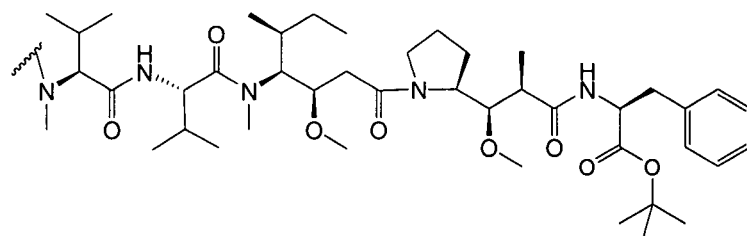
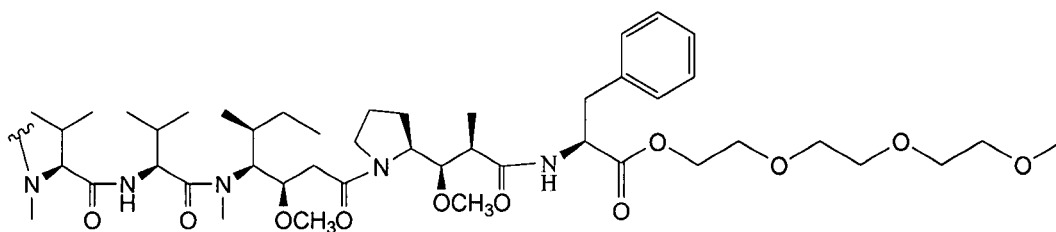
15

[0449]. Una forma ejemplar de realización con auristatina de la fórmula D_F es MMAF, donde la línea ondulada indica el enlace covalente a un ligando (L) de un conjugado de anticuerpo con fármaco (véase US 2005/0238649 y Doronina y col. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124):

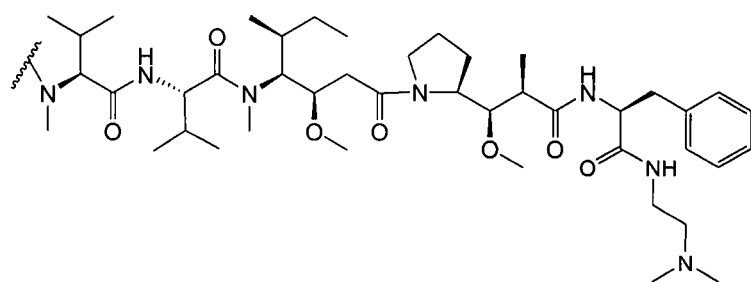
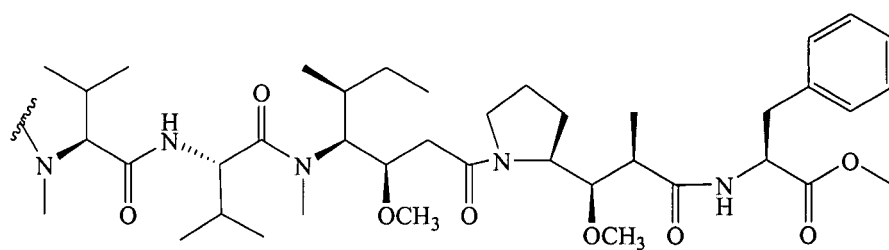


20

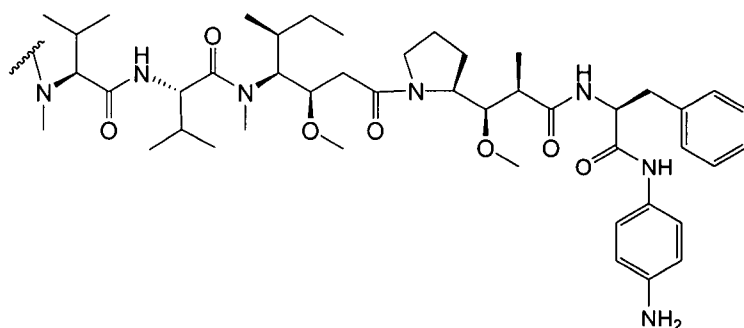
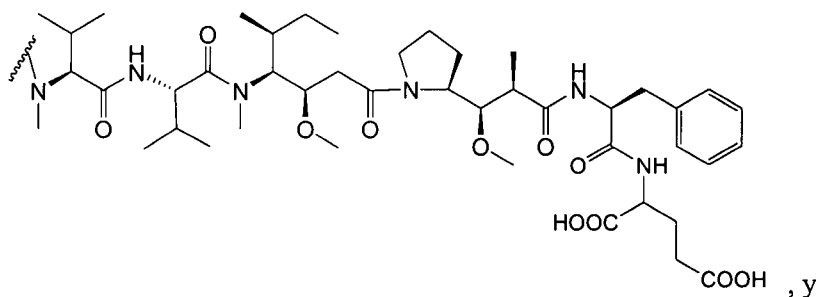
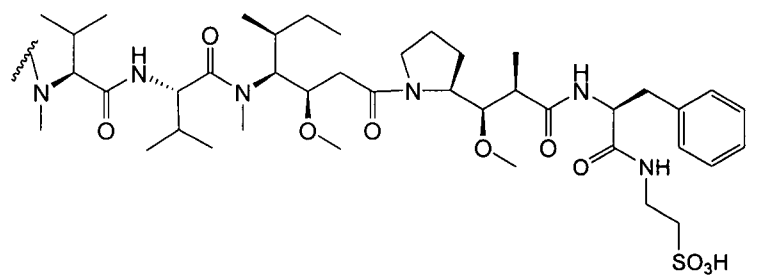
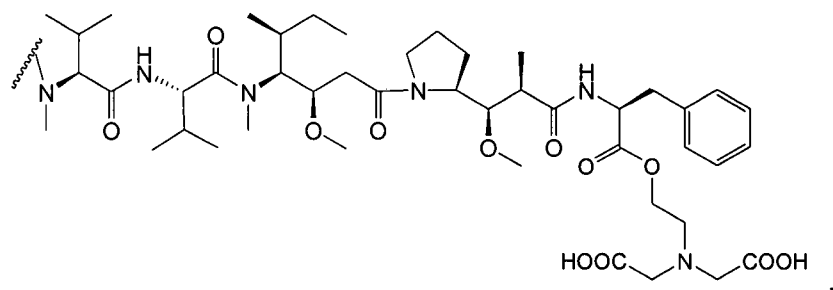
[0450]. Otras fracciones de fármaco incluyen los siguientes derivados de MMAF, donde la línea ondulada indica el enlace covalente a un ligando (L) de un conjugado de anticuerpo con fármaco:



5



10



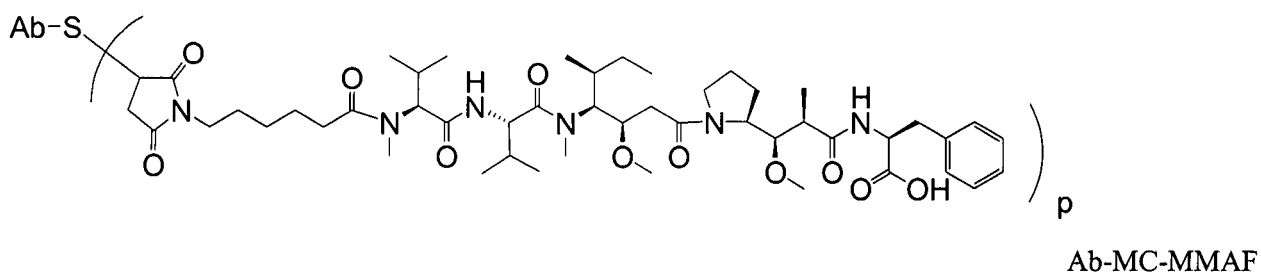
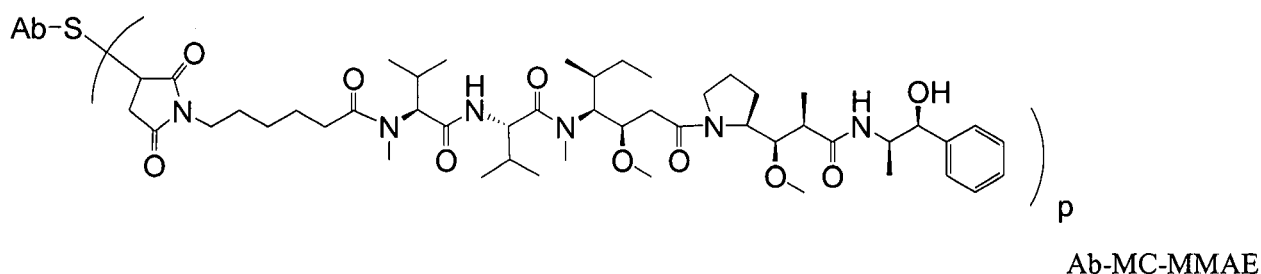
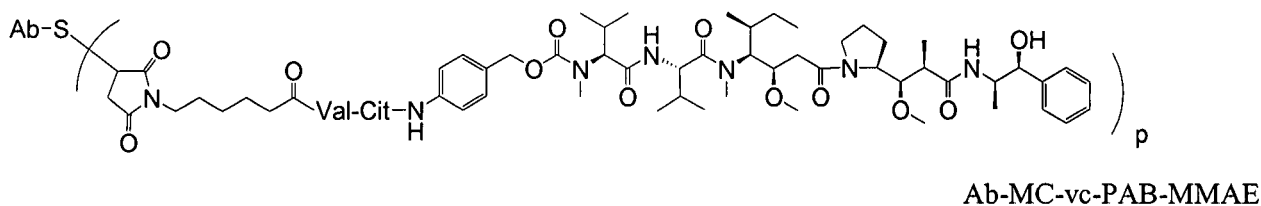
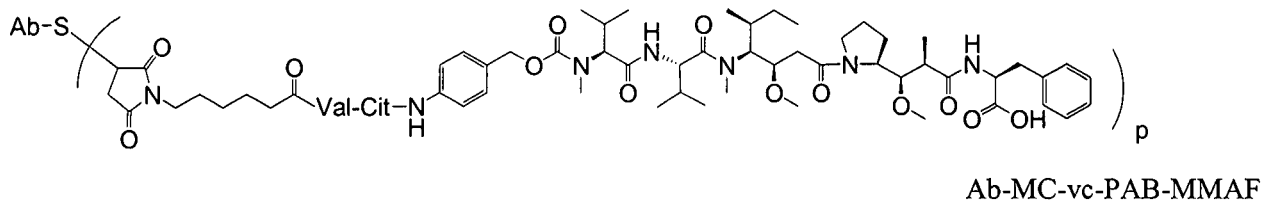
5

10

[0451]. En un aspecto, los grupos hidrofílicos que incluyen ésteres de glicol trietileno (TEG), como se muestra anteriormente, se pueden unir a la fracción del fármaco en R¹¹. Sin estar obligados por una teoría concreta, los grupos hidrofílicos ayudan a la internalización y no aglomeración de la fracción del fármaco.

[0452]. Las formas ejemplares de realización de los ADC de la Fórmula I que comprenden una auristatina/dolastatina o un derivado de la misma se describen en US 2005-0238649 A1 y Doronina y col.

(2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124, que se incluye expresamente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Formas ejemplares de realización de los ADC de Fórmula I que comprenden MMAE o MMAF y diversos componentes ligandos tienen las siguientes estructuras y abreviaciones (donde "Ab" es un anticuerpo; p está comprendido entre 1 y 8 aproximadamente, "Val-Cit" es un dipéptido valina-citrulina; y "S" es un átomo de azufre:



[0453]. Las formas de realización ejemplares de los ADC de la Fórmula I que comprenden MMAF y varios componentes ligandos incluyen, además, Ab-MC-PAB-MMAF y Ab-PAB-MMAF. Es interesante señalar que se ha demostrado que los inmunoconjugados que comprenden MMAF unido a un anticuerpo mediante un ligando que no sea proteolíticamente escindible poseen una actividad similar a la de los inmunoconjugados que comprenden MMAF unido a un anticuerpo mediante un ligando proteolíticamente escindible. Véase Doronina y col. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124. En estas

sustancias, se cree que la liberación del fármaco se efectúa mediante la degradación del anticuerpo en la célula.

[0454]. Por lo general, las porciones de fármacos basadas en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre uno o más aminoácidos y/o fragmentos de péptidos. Estos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis de fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volume 1, págs. 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Las porciones de fármacos auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos siguientes: US 2005-0238649 A1; Patente de EE.UU. n.º 5635483; Patente de EE.UU. n.º 5780588; Pettit y col. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit y col. (1998) *Anti-cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., y col. *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit y col (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863; y Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784.

[0455]. En concreto, las fracciones de fármacos auristatina/dolastatina de la fórmula D_F, como MMAF y derivados de la misma, se pueden preparar usando métodos descritos en US 2005-0238649 A1 y Doronina y col. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124. Las fracciones de fármacos auristatina/dolastatina de la fórmula D_E, como MMAE y derivados de las mismas, se pueden preparar usando métodos descritos en Doronina y col. (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784. Las fracciones de ligando-fármaco MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF y MC-vc-PAB-MMAE se pueden sintetizar fácilmente mediante métodos habituales, por ejemplo, como se describe en Doronina y col. (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784, y la publicación de la Solicitud de Patente n.º US 2005/0238649 A1, y luego conjugar con un anticuerpo de interés.

Concentración del fármaco

[0456]. La concentración del fármaco se representa mediante p y es el promedio de fracciones de fármaco por anticuerpo en una molécula de la Fórmula I. La concentración del fármaco puede oscilar entre 1 y 20 fracciones de fármaco (D) por anticuerpo. Los ADC de la Fórmula I incluyen conjuntos de anticuerpos conjugados con una variedad de fracciones de fármaco, de 1 a 20. El promedio de fracciones de fármaco por anticuerpo en preparaciones de ADC procedentes de reacciones de la conjugación se puede determinar mediante medios convencionales, como espectroscopía de masas, ensayo ELISA y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de ADC en función de p. En algunos ejemplos, la separación, purificación y determinación del ADC homogéneo, donde p es un valor determinado de ADC con otras concentraciones de fármaco, se puede lograr por métodos como HPLC de fase reversa o electroforesis.

[0457]. En el caso de algunos conjugados de anticuerpos con fármacos, p puede verse limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión es un tiol de la cisteína, como en las formas de realización ejemplares anteriores, puede que un anticuerpo sólo tenga uno o varios

grupos tiol de la cisteína, o puede tener sólo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales se puede unir un ligando. En algunas formas de realización, una concentración más alta de fármaco, por ejemplo, $p > 5$, puede causar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de permeabilidad celular de determinados conjugados de anticuerpos con fármacos. En determinadas formas de realización,

5 la concentración de fármaco para un ADC de la invención varía de 1 a aproximadamente 8; de aproximadamente 2 a aproximadamente 6; de aproximadamente 3 a aproximadamente 5; de aproximadamente 3 a aproximadamente 4; de aproximadamente 3,1 a aproximadamente 3,9; de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,8; de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,7; de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,6; de aproximadamente 3,3 a aproximadamente 3,8; de
10 aproximadamente 3,3 a aproximadamente 3,7. En realidad, se ha demostrado que para determinados ADC, la proporción óptima de fracciones de fármaco por anticuerpo puede ser inferior a 8, y puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 5. Véase 2005-0238649 A1 de EE.UU. (incluida aquí en su totalidad como referencia).

[0458]. En determinadas formas de realización, un número menor al máximo teórico de
15 fracciones de fármacos se conjuga con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, residuos de lisina que no reaccionan con el ligando-fármaco intermedio o el reactivo del ligando, como se señala más adelante. Por lo general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tioles de la cisteína libres y reactivos que se puedan unir a una fracción de fármaco; de hecho, la mayoría de los residuos tiol de la cisteína en anticuerpos están en forma de puentes disulfuro. En
20 determinadas formas de realización, un anticuerpo se puede reducir con un agente reductor como ditioneitol (DTT) o tricarboniletilfosfina (TCEP), en condiciones totales o parciales de reducción, para generar grupos tiol de cisteína reactivos. En determinadas formas de realización, un anticuerpo está sujeto a condiciones desnaturizantes para revelar grupos nucleofílicos reactivos como lisina o cisteína.

[0459]. La concentración (proporción fármaco/anticuerpo) de un ADC se puede controlar de
25 distintas formas, por ejemplo: (i) limitando el exceso molar del ligando-fármaco intermedio o reactivo ligando con respecto al anticuerpo, (ii) limitando el tiempo o la temperatura de la reacción de la conjugación, (iii) mediante condiciones reductivas parciales o limitadas para la modificación del tiol de la cisteína, (iv) diseñando mediante técnicas recombinantes la secuencia de aminoácido del anticuerpo de manera que se modifique la cantidad y la posición de residuos de cisteína para controlar el número y/o la
30 posición de los enlaces ligando-fármaco (como thioMab o thioFab preparado según se describe en la presente memoria y en WO2006/034488 (incluido aquí en su totalidad como referencia)).

[0460]. Debe entenderse que, cuando más de un grupo nucleofílico reacciona con un ligando-fármaco intermedio o a un reactivo ligando seguido por el reactivo de la fracción del fármaco, el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de una o más fracciones de fármaco
35 enlazadas a un anticuerpo. El promedio de fármacos por anticuerpo se puede calcular a partir de la mezcla

mediante un ensayo ELISA dual con anticuerpos, que sea específico para el anticuerpo y específico para el fármaco. Las moléculas de ADC individuales pueden identificarse en la mezcla mediante espectroscopía de masas y separarse mediante HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrófoba (véase, por ejemplo, Hamblett, K.J., y col., "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, Marzo 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, Marzo 2004; Alley, S.C., et al., "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, Marzo 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, Marzo 2004). En determinadas formas de realización, un ADC homogéneo con un único valor de concentración puede aislarse de la mezcla de la conjugación mediante electroforesis o cromatografía.

Algunos métodos de preparación de inmunoconjugados

[0461]. Un ADC de la fórmula I puede prepararse por varios medios empleando reacciones químicas orgánicas, condiciones y reactivos conocidos por los expertos, como: (1) una reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un agente ligando bivalente, para formar Ab-L, mediante una unión bivalente, seguida de la reacción con una fracción del fármaco D; y (2) una reacción de un grupo nucleofílico de una fracción del fármaco con un reactivo ligando bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de la reacción con un grupo nucleofílico de un anticuerpo. Los métodos ejemplares de preparación de un ADC de la Fórmula I por medio de la última vía se describen en 20050238649-0238649 A1 de EE.UU., que se incluye expresamente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

[0462]. Los grupos nucleofílicos en los anticuerpos incluyen, aunque sin limitarse a ellos: (i) grupos amino N-terminal, (ii) grupos amino de la cadena lateral, por ej. lisina, (iii) grupos tiol de la cadena lateral, por ej. cisteína, y (iv) grupos amino o hidroxilo de azúcares donde el anticuerpo es glicosilado. Los grupos amino, tiol e hidroxilo son nucleofílicos y son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en las fracciones del ligando y los reactivos ligandos, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos, y haluros de acilo; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos. Ciertos anticuerpos contienen bisulfuros de intercadena reducible, es decir, puentes de cisteína. Se puede hacer que los anticuerpos sean reactivos para la conjugación con reactivos del ligando mediante tratamiento con un agente reductor como DTT (ditiotreitól) o tricarboniletilfosfina (TCEP), de forma que el anticuerpo quede total o parcialmente reducido. Por lo tanto, cada puente de cisteína formará, en teoría, dos nucleófilos tiol reactivos. Los grupos nucleofílicos adicionales pueden introducirse en los anticuerpos a través de la modificación de las lisinas residuales, por ejemplo, mediante reacción de residuos de lisina con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), lo que da lugar a la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol

reactivos pueden ser introducidos en un anticuerpo (o un fragmento del mismo) mediante la introducción de uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ej. preparando variantes de anticuerpos que comprendan uno o más residuos de aminoácidos de cisteínas no nativas).

[0463]. Los conjugados de anticuerpos con fármacos de la invención también se pueden
5 producir mediante reacción entre un grupo electrofílico en un anticuerpo, como un grupo carbonilo cetona o aldehído, con un grupo nucleofílico en un fármaco o reactivo ligando. Entre los grupos nucleofílicos útiles en un reactivo ligando se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, hidracida, oxima, amina, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida. En una forma de realización, un anticuerpo se modifica para introducir fracciones electrofílicas que puedan reaccionar con sustituyentes nucleofílicos en
10 el fármaco o reactivo ligando. En otra forma de realización, los azúcares de los anticuerpos glicosilados pueden oxidarse, por ej. con reactivos oxidantes de periodato, a fin de formar grupos cetonas o aldehídos, los cuales pueden reaccionar con el grupo amina de los reactivos ligados o las fracciones del fármaco. Los grupos resultantes de imina base de Schiff pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ej. mediante los reactivos de hidruro de boro para formar enlaces amina estables. En una forma de realización,
15 la reacción de la porción carbohidratada de un anticuerpo glicosilado, ya sea con galactosa oxidasa o con metaperiodato de sodio, puede producir grupos carbonilo (aldehídos y cetonas) en el anticuerpo que pueden reaccionar con los grupos apropiados en el fármaco (técnicas de bioconjugado de Hermanson). En otra forma de realización, los anticuerpos que contienen residuos de serina o treonina N-terminal pueden reaccionar con metaperiodato de sodio, lo que da lugar a la producción de un aldehído en lugar del primer
20 aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; 5362852 de EE.UU.). Se puede hacer que este aldehído reaccione con una fracción de fármaco o un nucleófilo ligando.

[0464]. Los grupos nucleofílicos en una fracción del fármaco incluyen los siguientes compuestos, aunque sin limitarse a ellos: los grupos amino, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y aril-hidracida, capaces de reaccionar para formar enlaces
25 covalentes con grupos electrofílicos en las fracciones ligando y reactivos ligando, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos, y haluro de acilo; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos.

[0465]. Los compuestos de la invención contemplan expresamente el ADC preparado con los reactivos reticulares siguientes: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA,
30 SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (sucinimidil-(4-vinilsulfona)benzoata) que está comercializado (por ejemplo, por Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU; véanse páginas 467-498, 2003-2004 *Applications Handbook and Catalog*).

[0466]. Los inmunconjugados que comprenden un anticuerpo y un agente citotóxico también
35 pueden obtenerse utilizando una variedad de agentes de unión a proteína bifuncionales como por ejemplo

N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal como se describe en Vitetta y col., *Science*, 238:1098 (1987). El ácido triaminopentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

[0467]. Alternativamente, se puede realizar una fusión de proteínas que contengan un anticuerpo y un agente citotóxico, por ej. mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. Una molécula de ADN recombinante puede incluir regiones que codifiquen el anticuerpo y las porciones citotóxicas del conjugado, ya sea adyacente a otro o en forma separada por una región que codifica un péptido de enlace, el cual no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

[0468]. En otra forma de realización, un anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como la estreptavidina) y actuar previamente contra el tumor, donde se administra al paciente el conjugado receptor del anticuerpo, luego, se elimina de la circulación el conjugado no unido, utilizando un agente de eliminación, y posteriormente se administra un "ligando" (por ej. la avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ej. un radionucleótido).

Preparación de conjugados de anticuerpos anti-STEAP-1

[0469]. Los métodos de diseño, selección y preparación de la invención facilitan asimismo anticuerpos anti-STEAP-1 diseñados con cisteína que son reactivos con funcionalidad electrofílica. Estos métodos facilitan además compuestos de anticuerpos conjugados como compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) con moléculas de fármaco en puntos específicos, diseñados y selectivos. Los residuos de cisteína del reactivo sobre la superficie de un anticuerpo permiten conjugar específicamente una fracción de fármaco a través de un grupo tiol reactivo como maleimida o haloacetilo. La reactividad nucleofílica de la funcionalidad tiol de un residuo de cisteína con un grupo maleimido es aproximadamente 1.000 veces mayor en comparación con cualquier otra funcionalidad aminoácida en una proteína, como por ejemplo el grupo amino de residuos de lisina o el grupo amino N terminal. La funcionalidad tiol específica en los reactivos yodoacetil y maleimido puede reaccionar con grupos amina, pero se requieren tiempos de reacción mayores a pH (>9,0) y más prolongados (Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London). La cantidad de tiol libre en una proteína puede calcularse mediante el ensayo de Ellman estándar. La inmunoglobulina M es un ejemplo de pentámero enlazado con disulfuro,

mientras que la inmunoglobulina G es un ejemplo de una proteína con puentes de disulfuro internos que enlazan a las subunidades. En proteínas como éstas, se requiere la reducción de los enlaces de disulfuro con un reactivo como ditioneitol (DTT) o selenol (Singh y col. (2002) *Anal. Biochem.* 304:147-156) para generar el reactivo libre de tiol. Este enfoque puede dar como resultado la pérdida de la estructura terciaria del anticuerpo y de la especificidad de unión del antígeno.

[0470]. El Ensayo Pheselector (Ensayo ELISA de fagos para la selección de tioles reactivos) permite la detección de grupos de cisteína reactivos en anticuerpos en un formato ELISA en fagos, con lo cual contribuye al diseño de los anticuerpos diseñados con cisteína (WO 2006/034488). El anticuerpo diseñado con cisteína es revestido en las superficies de los pocillos, seguido por la incubación con partículas de fago, la adición de anticuerpo secundario etiquetado HRP y la detección de la absorbancia. Las proteínas mutantes que se expresan en el fago pueden analizarse mediante un método rápido, sólido y de alto rendimiento. Pueden generarse bibliotecas de anticuerpos diseñados con cisteína y someterlos a selección de unión utilizando el mismo enfoque para identificar adecuadamente los puntos reactivos de incorporación de cisteína libre a partir de bibliotecas aleatorias de proteína-fago de anticuerpos u otras proteínas. Esta técnica incluye la reacción de las proteínas mutantes con cisteína expresadas en el fago con un reactivo de afinidad o un grupo de indicadores que también es tiol reactivo.

[0471]. El ensayo PHESELECTOR permite analizar los grupos tiol específicos presentes en los anticuerpos. La identificación mediante este método de la variante A121C es ejemplar. Es posible buscar eficazmente la totalidad de la molécula Fab para identificar más variantes ThioFab con grupos tiol específicos. Para identificar y cuantificar la accesibilidad del disolvente a los residuos de aminoácido presentes en un polipéptido se emplea una accesibilidad superficial fraccional indicativa. La accesibilidad superficial puede expresarse como la zona de superficie ($\text{\AA}^2$) que puede contactarse mediante una molécula de disolvente, p.ej. agua. El espacio ocupado por el agua es aproximadamente igual al de una esfera con un radio de 1,4 $\text{\AA}$. Puede disponerse del software gratuitamente o bajo licencia (Oficina para CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom, Fax: (+44) 1925 603825 o por Internet: www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html) igual que el Paquete Integrado CCP4 de programas de cristalografía que emplea algoritmos para calcular la accesibilidad superficial de cada aminoácido de una proteína con coordenadas derivadas de cristalografía de rayos X conocidas ("El Paquete Integrado CCP4": Programas para cristalografía de proteínas" (1994) *Acta. Cryst.* D50:760-763). Dos módulos de software ejemplares que realizan cálculos de accesibilidad superficial son "AREAIMOL" y "SURFACE", basados en los algoritmos de B.Lee y F.M.Richards (1971) *J.Mol.Biol.* 55:379-400. AREAIMOL define la superficie accesible del disolvente de una proteína como el locus del centro de una esfera sonda (que representa una molécula de disolvente) mientras pasa por encima de la superficie de Van der Waals de la proteína. AREAIMOL calcula la zona superficial accesible del disolvente generando puntos superficiales en una esfera extendida sobre cada átomo (a una distancia del centro del átomo igual a la suma de los

radios del átomo y de la sonda) y eliminando aquellos que se encuentran dentro de las esferas equivalentes asociadas a los átomos adyacentes. AREAIMOL encuentra la zona de átomos accesible al disolvente en un archivo coordinado PDB y resume la zona accesible por residuo, por cadena y para la totalidad de la molécula. Las zonas accesibles (o diferencias de zona) para átomos individuales pueden escribirse en un archivo de salida pseudo-PDB. AREAIMOL atribuye un radio único para cada elemento y sólo reconoce un número limitado de elementos diferentes.

[0472]. AREAIMOL y SURFACE informan sobre las accesibilidades absolutas, es decir el número de Angstroms cuadrados ($\text{\AA}$). La accesibilidad superficial fraccional se calcula mediante referencia a un estado estándar aplicable a un aminoácido dentro de un polipéptido. El estado de referencia es un tripéptido Gli-X-Gli, donde X es el aminoácido de interés y el estado de referencia debería ser una conformación 'extendida', es decir similar a la de las hebras beta. La conformación extendida maximiza la accesibilidad de X. La zona accesible calculada se divide por la zona accesible en un estado de referencia de un tripéptido Gly-X-Gly e indica el cociente, que es la accesibilidad fraccional. El porcentaje de accesibilidad es la accesibilidad fraccional multiplicada por 100. Otro algoritmo ejemplar para el cálculo de la accesibilidad se basa en el módulo SOLV del programa xsae (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel) que calcula la accesibilidad fraccional de un residuo de aminoácido a una esfera de agua basándose en las coordenadas de rayos X del polipéptido. La accesibilidad superficial fraccional para cada aminoácido en un anticuerpo puede calcularse usando la información disponible sobre la estructura del cristal (Eigenbron y col. (1993) *J Mol Biol.* 229:969-995).

[0473]. El ADN que codifica los anticuerpos diseñados con cisteína se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente de este ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan a células hospederas, como por ejemplo las de *E. coli*, las COS de simios, las de ovario de hámster chino (CHO) o a células hospederas de otros mamíferos, como las células del mieloma (5807715 de EE.UU.; 2005/0048572 de EE.UU.; 2004/0229310 de EE.UU.), que no produzcan la proteína del anticuerpo de alguna otra manera, a fin de obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospederas recombinantes.

[0474]. Después del diseño y la selección, los anticuerpos diseñados con cisteína, p.ej. ThioFabs, pueden producirse con los residuos de cisteína independientes diseñados altamente reactivos mediante: (i) expresión en un sistema bacteriano, p.ej. *E. coli*, (Skerra y col. (1993) *Curr. Opinion in Immunol.* 5:256-262; Plückthun (1992) *Immunol. Revs.* 130:151-188) o un sistema de cultivo celular en mamíferos (WO 01/00245), p. ej. células de ovario de hamster chino (CHO); y (ii) purificación empleando

las técnicas comunes de purificación de proteínas (Lowman y col. (1991) *J. Biol. Chem.* 266(17):10982-10988).

[0475]. Los grupos tiol Cis diseñados reaccionan con los reactivos ligando electrofílicos y los ligando-fármaco intermedios para formar conjugados de fármaco y anticuerpo diseñados con cisteína y otros anticuerpo marcados diseñados con cisteína. Los residuos de cisteína de los anticuerpos diseñados con cisteína, presentes en los anticuerpos progenitores, que están apareados y forman enlaces disulfuro intercadena e intracadena no tienen ningún grupo tiol específico (a menos que sean tratados con un agente reductor) y no reaccionan con los reactivos ligando electrofílicos o los ligando-fármaco intermedios. Los residuos de cisteína recientemente diseñados pueden permanecer independientes y son capaces de reaccionar, es decir de conjugarse, con un reactivo ligando electrofílico o un ligando-fármaco intermedio, como por ejemplo un fármaco-maleimida. Los ligando-fármaco ejemplares intermedios incluyen: MC-MMAE, MC-MMAF, MC-vc-PAB-MMAE y MC-vc-PAB-MMAF. Las posiciones estructurales de los residuos de cisteína diseñados de las cadenas pesada y ligera se numeran de acuerdo con un sistema de numeración secuencial. Este sistema de numeración secuencial guarda correlación con el sistema de numeración de Kabat (Kabat y col., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) que comienza en el extremo terminal N y se diferencia del esquema de numeración de Kabat (hilera inferior) en las intercalaciones registradas como a, b y c. Con la utilización del sistema de numeración de Kabat, la secuencia lineal real de aminoácido puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que corresponden a un acortamiento o a una intercalación de un FR o CDR del dominio de la variable. Los lugares variables de la cadena pesada diseñada con cisteína son identificados mediante los esquemas de numeración secuencial y de Kabat.

[0476]. En una forma de realización, el anticuerpo anti-STEAP-1 diseñado con cisteína se prepara mediante un proceso que comprende:

- (a) la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti-STEAP-1 progenitor por cisteína; y
- (b) la determinación de la reactividad del tiol del anticuerpo anti-STEAP-1 diseñado con cisteína mediante la reacción del anticuerpo diseñado con cisteína con el reactivo tiol-específico.

[0477]. El anticuerpo diseñado con cisteína puede ser más reactivo que el anticuerpo progenitor con el reactivo tiol-específico.

[0478]. Los residuos de aminoácido de cisteína libre pueden localizarse en las cadenas pesadas o ligeras, o en los dominios constantes o variables. Los fragmentos de anticuerpos, p.ej. Fab, también pueden diseñarse con uno o más aminoácidos de cisteína que sustituyen a los aminoácidos del fragmento de anticuerpo para formar fragmentos de anticuerpo diseñados con cisteína.

[0479]. Otra realización de la invención ofrece un método para la preparación (producción) de un anticuerpo anti-STEAP-1 diseñado con cisteína, que comprende:

(a) la introducción de uno o más aminoácidos de cisteína en un anticuerpo anti-STEAP-1 progenitor con el objeto de generar el anticuerpo anti-STEAP-1 diseñado con cisteína; y

5 (b) la determinación de la reactividad del reactivo tiol-específico diseñado con cisteína con un reactivo tiol-específico;

donde el anticuerpo diseñado con cisteína es más reactivo que el anticuerpo progenitor con el reactivo tiol-específico.

10 [0480]. El Paso (a) del método de preparación de un anticuerpo diseñado con cisteína puede comprender:

(i) la mutagenización de una secuencia de ácido nucleico que codifica al anticuerpo diseñado con cisteína;

(ii) la expresión del anticuerpo diseñado con cisteína; y

(iii) el aislamiento y la purificación del anticuerpo diseñado con cisteína.

15 [0481]. El Paso (b) del método de preparación de un anticuerpo diseñado con cisteína puede comprender la expresión del anticuerpo diseñado con cisteína en una partícula viral seleccionada a partir de un fago o de una partícula fagémida.

[0482]. El Paso (b) del método de preparación de un anticuerpo diseñado con cisteína puede comprender:

20 (i) la reacción del anticuerpo diseñado con cisteína con un reactivo de afinidad tiol específico para generar un anticuerpo diseñado con cisteína de afinidad marcada; y

(ii) la medición de la unión del anticuerpo diseñado con cisteína de afinidad marcada a un medio de captura.

25 [0483]. Otra realización de la invención es un método de análisis de los anticuerpos diseñados con cisteína con aminoácidos de cisteína independientes altamente reactivos para reactividad del tiol que comprende:

(a) la introducción de uno o más aminoácidos en un anticuerpo progenitor con el objeto de generar un anticuerpo diseñado con cisteína;

30 (b) la reacción del anticuerpo diseñado con cisteína con un reactivo de afinidad tiol específico para generar un anticuerpo diseñado con cisteína de afinidad marcada; y

(c) la medición de la unión del anticuerpo diseñado con cisteína de afinidad marcada a un medio de captura; y

(d) la determinación de la reactividad del tiol del anticuerpo diseñado con cisteína con un reactivo tiol-específico.

5 [0484]. El Paso (a) del método de análisis de los anticuerpos diseñados con cisteína puede comprender:

(i) la mutagenización de una secuencia de ácido nucleico que codifica al anticuerpo diseñado con cisteína;

(ii) la expresión del anticuerpo diseñado con cisteína; y

10 (iii) el aislamiento y la purificación del anticuerpo diseñado con cisteína.

[0485]. El Paso (b) del método de análisis de anticuerpos diseñados con cisteína puede comprender la expresión del anticuerpo diseñado con cisteína en una partícula viral seleccionada a partir de un fago o de una partícula fagémida.

15 [0486]. El Paso (b) del método de análisis de los anticuerpos diseñados con cisteína también puede comprender:

(i) la reacción del anticuerpo diseñado con cisteína con un reactivo de afinidad tiol específico para generar un anticuerpo diseñado con cisteína de afinidad marcada; y

(ii) la medición de la unión del anticuerpo diseñado con cisteína de afinidad marcada a un medio de captura.

20 Anticuerpos anti-STEAP-1 marcados diseñados con cisteína

[0487]. Los anticuerpos anti-STEAP-1 diseñados con cisteína pueden ubicarse específicamente y acoplarse eficazmente con un reactivo tiol-específico. El reactivo tiol-específico puede ser un reactivo ligando multifuncional, un reactivo de captura marcado (p.ej. un reactivo de enlace con biotina), una marca de detección (p.ej. un reactivo fluoróforo), un reactivo de inmovilización de fase sólida (p.ej.

SEP HAROSE™, poliestireno o vidrio) o un ligando-fármaco intermedio. Un ejemplo de un reactivo tiol-específico es N-etil maleimida (NEM). En una realización ejemplar, la reacción de un ThioFab con un reactivo de enlace con biotina suministra un ThioFab biotinilado mediante el cual puede detectarse y medirse la presencia y la reactividad del residuo de cisteína diseñado. La reacción de un ThioFab con un reactivo ligando multifuncional suministra un ThioFab con un ligando funcionalizado que además puede 30 hacerse reaccionar con un reactivo de una reacción del fármaco u otro marcador. La reacción de un ThioFab con un ligando-fármaco intermedio suministra un conjugado de fármaco y ThioFab.

[0488]. En general, los métodos ejemplares descritos en esta memoria pueden aplicarse a la identificación y producción de anticuerpos, y más comúnmente a otras proteínas a través de la aplicación de los pasos de diseño y análisis aquí descritos.

[0489]. Dicho enfoque puede aplicarse a la conjugación de otros reactivos tiol-específicos en los que el grupo reactivo es, por ejemplo, un maleimido, una iodoacetamida, un piridil disulfuro u otra molécula de conjugación tiol reactiva (Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2;

- 5 Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Hermanson, G. en *Bioconjugate Techniques* (1996) Academic Press, San Diego, págs. 40-55, 643-671). El reactivo tiol-específico puede ser una fracción de fármaco, un fluoróforo como por ejemplo un tinte fluorescente como la fluoresceína o rodamina, un agente quelante para un diagnóstico por imágenes o un metal radioterapéutico, una marca peptidil o no peptidil o una marca de detección, o un
- 10 agente modificador de la eliminación, como por ejemplo diversos isómeros del polietilenglicol, un péptido que se une a un tercer componente, u otro carbohidrato o agente lipofílico.

Usos de anticuerpos anti-STEAP-1 diseñados con cisteína

- [0490]. Los anticuerpos anti-STEAP-1 diseñados con cisteína, y los conjugados de los mismos, pueden emplearse como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico. La presente invención ofrece
- 15 además métodos para prevenir, controlar, trata o mejorar uno o más síntomas asociados a un trastorno relacionado con STEAP-1. En particular, la presente invención ofrece métodos para prevenir, controlar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados al trastorno de proliferación celular, como un cáncer, p.ej., cáncer de próstata, de pulmón, de colon, de vejiga y de ovario, y el sarcoma de Ewing. La presente invención ofrece además métodos para el diagnóstico de un trastorno relacionado con STEAP-1 o la
- 20 predisposición a desarrollar dicho trastorno, así como métodos para identificar anticuerpos, y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, que preferentemente se unen a los polipéptidos STEAP-1 asociados a las células.

- [0491]. Otra forma de realización de la presente invención se orienta hacia el uso de un anticuerpo anti-STEAP-1 diseñado con cisteína para la preparación de un medicamento útil para el
- 25 tratamiento de un estado receptivo a un trastorno relacionado con STEAP-1.

Preparación de conjugados de fármaco con anticuerpos anti-STEAP-1 diseñados con cisteína

- [0492]. Los ADC de la formula I se pueden preparar por varios medios, empleando reacciones químicas orgánicas, condiciones y reactivos conocidos por los expertos, como: (1) una reacción de un grupo de cisteínas de un anticuerpo diseñado con cisteína con un agente enlazador, para formar un
- 30 enlazador a anticuerpo intermedio Ab-L, mediante un enlace covalente, seguida de la reacción con una fracción del fármaco D activado; y (2) una reacción de un grupo nucleofílico de una fracción del fármaco con un reactivo enlazador, para formar un enlazador a fármacos intermedio D-L, mediante un enlace covalente, seguido de la reacción con el grupo de cisteínas de un anticuerpo diseñado con cisteína. Los métodos de conjugación (1) y (2) pueden emplearse con una variedad de anticuerpos diseñados con

cisteína, fracciones de fármacos y enlazadores para preparar conjugados de anticuerpos con fármacos de Fórmula I.

[0493]. Los grupos tiol de cisteína del anticuerpo son nucleofílicos y son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en los reactivos enlazadores y los enlazadores a fármacos intermedios, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos, y (iv) disulfuros, incluyendo piridil disulfuros, mediante un intercambio de sulfuros. Los grupos nucleofílicos en una fracción del fármaco incluyen los siguientes compuestos: los grupos amino, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y aril-hidracida, capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en las fracciones enlazadoras y reactivos enlazadores.

[0494]. Los anticuerpos diseñados con cisteína pueden convertirse en reactivos para conjugarse con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor como DTT (reactivo de Cleland, ditiotreitól) o TCEP (tris(2-carboxietil)fosfino hidrocloreto; Getz y col., (1999) *Anal. Biochem.* Vol. 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA), seguido de reoxidación para reformar los enlaces disulfuros de la intercadena e intracadena (Ejemplo x). Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales diseñados con cisteína de longitud completa (ThioMab) expresados en las células CHO se reducen con un exceso de TCEP de aproximadamente 50 veces durante 3 horas a 37 °C para reducir los enlaces disulfuros en los aductos de cisteínas, que pueden formarse entre los residuos de cisteína introducidos recientemente y la cisteína presente en el medio de cultivo. El ThioMab reducido se diluye y se carga en la columna HiTrap S en acetato sódico 10 mM, pH 5, y se eluye con PBS que contiene cloruro de sodio 0,3 M. Los enlaces disulfuros se restablecieron entre los residuos de cisteína presentes en el Mab parental con sulfato de cobre (CuSO₄) acuoso diluido (200 nM) a temperatura ambiente, durante toda la noche. Alternativamente, el ácido dehidroascórbico (DHAA) es un oxidante eficaz para restablecer los grupos disulfuros de la intracadena del anticuerpo diseñado con cisteína después de reducir la escisión de aductos de cisteína. Se pueden utilizar otros oxidantes, es decir agentes oxidantes, y condiciones oxidantes, que son bien conocidos en la materia. La oxidación al aire del ambiente también es eficaz. Este paso de reoxidación leve y parcial forma eficazmente disulfuros de intracadenas con una alta fidelidad y conserva los grupos tiol de los residuos de cisteína introducidos recientemente. Se agregó y mezcló un exceso de aproximadamente 10 veces del enlazador a fármaco intermedio, como por ejemplo, MC-vc-PAB-MMAE, y se lo dejó reposar durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente para lograr una conjugación y formar el conjugado de anticuerpo con fármacos. La mezcla de conjugación se filtró en gel y se cargó y eluyó a través de una columna HiTrap S para eliminar el exceso del enlazador a fármaco intermedio y otras impurezas.

[0495]. La Figura 16 muestra el proceso general para preparar un anticuerpo diseñado con cisteína expresado desde el cultivo celular para la conjugación. Cuando el medio de cultivo celular contiene cisteína, los aductos de disulfuros pueden formarse entre los aminoácidos con cisteína introducidos recientemente y las cisteínas del medio. Estos aductos de cisteínas, que se muestran como un círculo en el ThioMab ejemplar (izquierda) en la Figura 12, deben reducirse para generar anticuerpos reactivos diseñados con cisteína para la conjugación. Los aductos de cisteínas, supuestamente junto con varios enlaces disulfuros de intercadenas, se escinden de manera reduccionista para obtener una forma reducida del anticuerpo con agentes reductores tal como TCEP. Los enlaces disulfuros de intercadenas entre residuos de cisteína emparejados se reforman bajo condiciones de oxidación parcial con sulfato de cobre, DHAA o con la exposición al oxígeno del ambiente. Los residuos de cisteína introducidos recientemente, diseñados e independientes permanecen disponibles para la reacción con los reactivos enlazadores o los enlazadores a fármacos intermedios para formar los conjugados de anticuerpos de la invención. Los ThioMab expresados en las líneas celulares de mamíferos dan lugar a cis conjugados externamente aducidos a un cis diseñado mediante una formación de unión -S-S-. Por lo tanto, los ThioMab purificados se tratan con los procedimientos de reducción y reoxidación, tal como se describen en el Ejemplo x, para producir ThioMab reactivos. Estos ThioMab se utilizan para conjugarse con fármacos citotóxicos que contienen maleimidos, con fluoróforos y con otras marcas.

[0496]. La Figura 15 muestra realizaciones de los conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC) anti-STEAP-1 diseñado con cisteína, donde la porción del fármaco auristatina se une a un grupo diseñado con cisteína en: la cadena ligera (LC-ADC); la cadena pesada (HC-ADC); y en la región Fc (Fc-ADC).

Formulaciones farmacéuticas

Administración de los conjugados de anticuerpos con fármacos

[0497]. Los conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC), de la invención pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada según la afección que deba tratarse. Por lo general, los ADC se administrarán parenteralmente, es decir, por infusión, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal o epidural.

[0498]. Para el tratamiento de cánceres de, por ejemplo, próstata, pulmón y/o colon, en una forma de realización, el conjugado de anticuerpo con fármacos se administra por infusión intravenosa. La dosis que se administra por infusión varía aproximadamente entre $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ y $10.000 \mu\text{g}/\text{m}^2$ por dosis, por lo general, una dosis semanal de un total de una, dos, tres o cuatro dosis. Alternativamente, el rango de dosis es aproximadamente de entre $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente $1000 \mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente $800 \mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente $600 \mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente $400 \mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente $500 \mu\text{g}/\text{m}^2$,

aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente 300 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, y aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ y 200 aproximadamente $\mu\text{g}/\text{m}^2$. La dosis puede administrarse una vez al día, una vez a la semana, varias veces a la semana, pero menos de una vez al día; varias veces al mes, pero menos de una vez al día; varias veces al mes, pero menos de una vez por semana; una vez al mes o intermitentemente para aliviar los síntomas de la enfermedad. La administración puede continuar en cualquiera de los intervalos mencionados anteriormente hasta lograr la remisión del tumor o los síntomas del linfoma de la leucemia que se trata. La administración puede continuar después de lograr la remisión o el alivio de los síntomas, siempre que dicha remisión o alivio se mantengan debido a la administración continua.

10 [0499]. La invención también proporciona un método de tratamiento de un cancer de próstata, pulmón y/o colon, y/o una metástasis de dicho cáncer, que comprende la administración al paciente que padezca de cáncer de próstata, pulmón o colon, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado 120v.24 de cualquiera de las formas de realización precedente dicho anticuerpo no está conjugado con una molécula citotóxica ni con una molécula detectable. Por lo general, el anticuerpo se
15 administrará con una dosis que varía entre 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente 1000 mg/m^2 .

[0500]. La invención también ofrece un método para el tratamiento de un cáncer de próstata, pulmón y/o colon, y/o una metástasis de dicho cáncer, que comprende la administración al paciente que sufre un cáncer de próstata, pulmón o colon de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo 120v.24 humanizado de cualquiera de una de las realizaciones anteriores, en la cual el anticuerpo está
20 conjugado con una molécula citotóxica o detectable. Por lo general, el anticuerpo se administrará en una dosis que varía de aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente 1.000 mg/m^2 .

[0501]. En un aspecto, la invención además proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo anti-STEAP-1 de la invención, al menos un inmunoconjugado de éste o al menos un conjugado de anticuerpo anti-STEAP-1 con fármacos de la invención, o todos los anteriores.
25 En algunas formas de realización, una formulación farmacéutica comprende 1) un anticuerpo anti-STEAP-1, un conjugado de anticuerpo anti-STEAP-1 con fármacos o un inmunoconjugado de éste, o todos los anteriores, y 2) un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, una formulación farmacéutica comprende 1) un anticuerpo anti-STEAP-1 o un inmunoconjugado de éste, o ambos, y opcionalmente 2) al menos un agente terapéutico adicional.

30 [0502]. Las formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, inmunoconjugado o un conjugado de anticuerpo anti-STEAP-1 con fármacos de la invención se preparan para su almacenamiento mezclando el anticuerpo o el conjugado de anticuerpo con fármacos que tenga el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales que sean fisiológicamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de

formulaciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones liofilizadas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en todas las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen soluciones tamponadas tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (como por ejemplo, cloruro amonio de octadecildimetilbencilo; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; alcohol bencilo, fenol o butilo benzil alcohol; alquilo parabeno como el metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); bajo peso molecular (menos de 10 residuos) polipéptidos; proteínas, como cera albúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidroilicos como la polivinilpirrolidone; aminoácidos como glicerina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes como la EDTA; azúcares como sucrosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones de formación salina como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensoactivos no surfactantes como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones farmacéuticas para administración *in vivo* deben ser, por lo general, estériles. Esto se logra mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0503]. Los principios activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16.^a edición, Oslo, A., Ed. (1980).

[0504]. Se pueden elaborar preparaciones de liberación controlada. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo o inmunoconjugado de la invención, cuyas matrices están en forma de elementos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación controlada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli-(2-hidroxietil-metacrilato), o poli-(vinilalcohol)), poliláctidos (patente de EE.UU. N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico e γ etil-L-glutamato, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido glicólico-ácido láctico como por ejemplo LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímeros de ácido glicólico-ácido láctico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros como el acetato de etilenvinilo y el ácido glicólico-ácido láctico permiten la liberación de moléculas por un período de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo menores. Cuando los anticuerpos o inmunoconjugados encapsulados permanecen en el organismo durante un largo periodo de tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la

humedad a 37 °C, resultando en una pérdida de la actividad biológica y en posibles cambios en la inmunogenicidad. Es posible concebir estrategias racionales para su estabilización dependiendo del mecanismo que intervenga. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es de formación de uniones intermoleculares S-S mediante el intercambio tio-disulfuro, se puede lograr la estabilización mediante la modificación de los residuos sulfhidrilos, liofilizando soluciones ácidas, controlando la humedad, utilizando aditivos adecuados y desarrollando composiciones de matrices de polímeros específicas.

Tratamientos de conjugados de anticuerpos con fármacos

[0505]. Se contempla que el conjugado de anticuerpo con fármacos (ADC) de la presente invención puede utilizarse para tratar diversas enfermedades o trastornos, como por ejemplo, aquellos caracterizados por la sobreexpresión de un antígeno tumoral. Las afecciones o trastornos hiperproliferativos ejemplares incluyen tumores benignos y malignos, leucemia y neoplasias linfoides. Otros incluyen trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos, glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales, blastocélulas, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, incluyendo los autoinmunes. Otros incluyen cánceres de próstata, pulmón y colon.

[0506]. Los componentes del ADC que se identifican en los modelos animales y ensayos con células pueden evaluarse en estudios clínicos de humanos y primates mayores con tumores. Se pueden diseñar estudios clínicos con humanos para evaluar la eficacia del anticuerpo monoclonal anti-STEAP-1 o el inmunoconjugado de la invención en pacientes con trastornos proliferativos de células de próstata, pulmón o colon, incluyendo, entre otros, cánceres de próstata, pulmón y colon y metástasis de dichos cánceres. El estudio clínico se puede diseñar para evaluar la eficacia de un ADC en combinación con regímenes terapéuticos conocidos, tales como la radiación o la quimioterapia, o ambas, que implican agentes quimioterapéuticos o citotóxicos conocidos.

[0507]. El cáncer puede comprender células que expresan STEAP-1 para que un ADC de la presente invención sea capaz de unirse a las células cancerosas. Existen diversos ensayos diagnósticos/prognósticos para determinar la expresión de STEAP-1 en el cáncer. En una forma de realización, la sobreexpresión de STEAP-1 puede analizarse mediante un ensayo inmunohistoquímico (IHC). Las secciones de tejido de una biopsia tumoral embebidas en parafina pueden someterse a un ensayo IHC y evaluarse según el criterio de intensidad de tinción proteínica de STEAP-1 con respecto al grado de tinción y la proporción de las células tumorales examinadas.

[0508]. Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada del ADC dependerá del tipo de enfermedad que se tratará, tal como se define anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, si la molécula se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico tratante. La molécula se

administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosis inicial candidata para la administración en un paciente es de aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de la molécula, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante una infusión continua. Una dosis diaria típica
5 podría oscilar entre aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Una dosis ejemplar de ADC que se administrará al paciente varía entre 0,1 y aproximadamente 10 mg/kg del peso del paciente.

[0509]. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que se produzca la supresión deseada de los síntomas de la
10 misma. Un ejemplo de la pauta posológica es la administración de una dosis inicial de carga de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg de un anticuerpo anti-STEAP-1. Otras pautas posológicas pueden ser útiles. El progreso de este tratamiento se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Terapia combinada

[0510]. Un conjugado de anticuerpo con fármacos (ADC) de la invención puede combinarse
15 en una formulación farmacéutica combinada o una pauta posológica como una terapia combinada, con un componente adicional, por lo menos, con propiedades antineoplásicas. Por lo menos, un compuesto adicional de la formulación farmacéutica combinada o la pauta posológica tiene preferentemente actividades complementarias al ADC de la combinación para que no se afecten de manera adversa entre sí.

[0511]. Un compuesto adicional, por lo menos, puede ser un agente quimioterapéutico, un
20 agente citotóxico, una citoquina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente antihormonal o un cardioprotector, o todos los anteriores. Dichas moléculas están presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin que se pretende. Una composición farmacéutica que contiene un ADC de la invención también puede tener una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico tal como un inhibidor que forma tubulina, un inhibidor de la topoisomerasa o un aglutinante a ADN.

[0512]. En un aspecto, el primer compuesto es un ADC anti-STEAP-1 de la invención y por lo
25 menos un compuesto adicional es un anticuerpo terapéutico aparte de un anti-STEAP-1 (anticuerpo desnudo o un ADC). En una forma de realización, por lo menos, el compuesto adicional es el anticuerpo anti-PSCA. En una forma de realización, por lo menos un compuesto adicional es el anticuerpo anti-HER2, trastuzumab (por ejemplo, Herceptin®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA). En una forma de
30 realización, por lo menos un compuesto adicional es el anticuerpo anti-HER2, pertuzumab (Omnitarg™, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, ver EE.UU. 6949245). En una realización, al menos un compuesto adicional es un anticuerpo anti-VEGF (p.ej. Avastin®, Genentech, Inc.). En cada caso, al menos un compuesto es un anticuerpo desnudo o un ADC. En una realización, al menos un compuesto adicional es

un anticuerpo (un anticuerpo desnudo o un ADC), y el anticuerpo adicional es un anticuerpo segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto o más, de manera que una combinación de anticuerpos segundos, terceros, cuartos, quintos, sextos o más (desnudos o como un ADC) resulta eficaz para el tratamiento de un trastorno de proliferación celular en un tejido que expresa STEAP-1.

5 [0513]. Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración de un agente antineoplásico identificado según esta invención, incluyendo, entre otros, la radioterapia, trasplantes de médula ósea o sangre periférica, un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento, o todos los anteriores. En una de estas formas de realización, un agente quimioterapéutico es un agente o una combinación de agentes, como por ejemplo, ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina, 10 adriamicina, doxorubicina, vincristina (Oncovin™), prednisolona, CHOP, CVP o COP, o inmunoterapéuticos tales como anti-PSCA, anti-HER2 (por ejemplo, Herceptin®, Omnitarg™) o anti-VEGF (por ejemplo, Avastin®). La terapia combinada puede administrarse como un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra de manera secuencial, la combinación puede administrarse en dos o más administraciones. La administración combinada incluye la coadministración, utilizando formulaciones 15 separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente exista un período en el cuál ambos (o todos los) agentes activos ejerzan simultáneamente sus actividades biológicas.

 [0514]. En una forma de realización, el tratamiento con un ADC supone la administración combinada de un agente antineoplásico identificado en la presente memoria descriptiva y uno o más 20 agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluida la coadministración de un cóctel de diferentes agentes quimioterapéuticos. Entre los agentes quimioterapéuticos están los taxanos (como paclitaxel y docetaxel) o antibióticos a base de antraciclina, o ambos. La preparación y programaciones de la dosis de dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o como lo determine empíricamente el médico cualificado. La preparación y programación de la 25 dosis para dicha quimioterapia también se describen en "*Chemotherapy Service*", (1992) Ed., M.C. Perry, Williams y Wilkins, Baltimore, Md.

 [0515]. Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados antes mencionados son aquellas que se utilizan actualmente y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente identificado recientemente y otros agentes o tratamientos quimioterapéuticos.

30 [0516]. La terapia combinada puede proporcionar "sinergia" y ser "sinérgico", es decir, el efecto que se logra cuando los ingredientes activos utilizados en conjunto es mayor a la suma de los efectos que se obtienen del uso de los componentes por separado. Se puede obtener un efecto sinérgico cuando los ingredientes activos se: (1) coformulan y administran simultáneamente en una formulación combinada de dosis unitaria; (2) se administran de manera alternada o paralela como formulaciones separadas; o (3)

mediante algún otro régimen. Cuando se administran en una terapia alterna, se puede obtener un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran secuencialmente, por ejemplo, mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia alternada, se administra una dosis eficaz de cada ingrediente activo de manera secuencial, es decir, en serie, mientras que en la terapia combinada, las dosis eficaces de dos o más ingredientes activos se administran juntas.

Metabolitos de los conjugados de anticuerpos con fármacos

[0517]. También se encuentran dentro del campo de esta invención los productos metabólicos *in vivo* de los compuestos de los ADC descritos en la presente memoria descriptiva, hasta el punto que estos productos son novedosos e imperceptibles hasta el momento. Dichos productos pueden originarse, por ejemplo, de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, esterificación, escisión enzimática, y similares, de los compuestos administrados. Por consiguiente, la invención incluye compuestos novedosos e imperceptibles producidos mediante un proceso que comprende establecer un contacto entre un compuesto de esta invención y un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para producir un producto metabólico de dicho compuesto.

[0518]. Por lo general, los productos metabolitos se identifican al preparar un ADC radiomarcado (por ejemplo, ^{14}C o ^3H) que se administra parenteralmente a un animal, como por ejemplo, una rata, un ratón, un cobaya, un mono, o a un humano en una dosis detectable (por ejemplo, mayor a 0,5 mg/kg aproximadamente) y permitir el tiempo suficiente para que se produzca el metabolismo (por lo general, aproximadamente entre 30 segundos y 30 horas) y aislar sus productos de conversión de la orina, sangre u otras muestras biológicas. Estos productos se aíslan fácilmente ya que están marcados (otros se aíslan mediante el uso de anticuerpos capaces de unir epítomos que sobreviven en el metabolito). Las estructuras de los metabolitos se determinan de manera convencional, por ejemplo, mediante espectrometría de masas (MS), cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS) o resonancia magnética nuclear (NMR). En general, el análisis de metabolitos se realiza de la misma manera que los estudios convencionales del metabolismo de fármacos que son bien conocidos por los expertos en la materia. Los productos de conversión, siempre que no se encuentren *in vivo*, son útiles en los ensayos de diagnóstico para establecer las dosis terapéuticas de los compuestos de ADC de la invención.

Otros métodos de utilización de anticuerpos anti-STEAP-1 e inmunoconjugados

Métodos diagnósticos y métodos de detección

[0519]. En un aspecto, los anticuerpos anti-STEAP-1 y los inmunoconjugados de la invención son útiles para detectar la presencia de STEAP-1 en una muestra biológica. Por "detectar" se entiende en la presente memoria descriptiva una detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas formas de realización, una muestra biológica comprende una célula o un tejido. En ciertas formas de realización, estos tejidos

incluyen tejidos normales o cancerosos, o ambos, que expresan STEAP-1 a niveles más altos que en otros tejidos, por ejemplo, próstata, pulmón o colon.

[0520]. En un aspecto, la invención proporciona un método de detección de la presencia de STEAP-1 en una muestra biológica. En ciertas formas de realización, el método comprende establecer un
5 contacto de la muestra biológica con un anticuerpo anti-STEAP-1 en condiciones que faciliten la unión del anticuerpo anti-STEAP-1 a STEAP-1 y detectar si se ha formado un complejo entre el anticuerpo anti-STEAP-1 y STEAP-1.

[0521]. En un aspecto, la invención proporciona un método para diagnosticar un trastorno asociado a un aumento de la expresión de STEAP-1. En ciertas formas de realización, el método supone
10 poner en contacto una célula de prueba con un anticuerpo anti-STEAP-1; determinar el nivel de expresión (bien cuantitativo o cualitativo) de STEAP-1 por la célula de prueba mediante la detección de la unión del anticuerpo anti-STEAP-1 a STEAP-1; y comparar el nivel de expresión de STEAP-1 por la célula de prueba con el nivel de expresión de STEAP-1 por una célula de control (por ejemplo, una célula normal del mismo origen tisular que la célula de prueba o una célula que exprese STEAP-1 a niveles similares a dicha
15 célula normal), donde un nivel más alto de expresión de STEAP-1 de la célula de prueba con respecto a la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado a un aumento de la expresión de STEAP-1. En ciertas formas de realización, la célula de prueba se obtiene a partir de un sujeto que se sospecha que tiene un trastorno asociado a un aumento de la expresión de STEAP-1. En ciertas formas de realización, el trastorno es un trastorno de proliferación celular, como un cáncer o un tumor.

[0522]. Los trastornos proliferativos celulares ejemplares que pueden diagnosticarse mediante un anticuerpo de la invención incluyen cánceres de próstata, pulmón y colon y metástasis de dichos cánceres.

[0523]. En ciertas formas de realización, un método de diagnóstico o detección, como los descritos anteriormente, comprende la detección de la unión de un anticuerpo anti-STEAP-1 a STEAP-1
20 expresado en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida de una célula que exprese STEAP-1 en su superficie. En ciertas formas de realización, el método comprende establecer un contacto de una célula con un anticuerpo anti-STEAP-1 en condiciones que faciliten la unión del anticuerpo anti-STEAP-1 a STEAP-1 y detectar si se ha formado un complejo entre el anticuerpo anti-STEAP-1 y STEAP-1 en la superficie celular. Un ensayo ejemplar para detectar la unión de un anticuerpo anti-
25 STEAP-1 a STEAP-1 que exprese STEAP-1 en la superficie de una célula es un ensayo "FACS".

[0524]. Se pueden utilizar otros métodos para detectar la unión de anticuerpos anti-STEAP-1 a STEAP-1. Estos métodos incluyen ensayos de unión a antígeno que son bien conocidos en la materia, como Western blot, radioinmunoensayos, ELISA (ensayos de inmunoabsorción enzimática),

inmunoensayos tipo "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A y ensayos inmunohistoquímicos (IHC).

[0525]. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-STEAP-1 están marcados. Las marcar incluyen marcas o fracciones que se detectan directamente (como etiquetas fluorescentes, cromofóricas, densas en electrones, quimioluminescentes y radioactivas), así como fracciones, como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, mediante una reacción enzimática o interacción molecular. Ejemplos de estos marcadores incluyen, entre otros, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos como algunos quelantes térreos raros o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansil, umbeliferon, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de la luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de EE.UU. N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas sacáridas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores rotatorios, marcadores bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

[0526]. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-STEAP-1 están inmovilizados en una matriz insoluble. La inmovilización supone separar el anticuerpo anti-STEAP-1 de cualquier STEAP-1 que permanezca libre en solución. Tradicionalmente, esto se consigue bien insolubilizando el anticuerpo anti-STEAP-1 antes del procedimiento de ensayo, o bien mediante adsorción en una superficie o matriz insoluble al agua (Bennich y col., patente de EE.UU. No. 3.720.760), o bien mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, usando reticulación con glutaraldehído), o bien mediante insolubilización del anticuerpo anti-STEAP-1 después de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-STEAP-1 y STEAP-1, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.

[0527]. Cualquiera de las formas de realización anteriores para diagnóstico o detección se pueden llevar a cabo utilizando un inmunoconjugado de la invención en lugar de un anticuerpo anti-STEAP-1 o en adición a él.

Métodos terapéuticos

[0528]. Un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención se pueden usar, por ejemplo, en métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir el crecimiento o la proliferación celular bien *in vivo* o *in vitro* y dicho método comprende la exposición de una célula a un anticuerpo anti-STEAP-1 o un inmunoconjugado del mismo en condiciones que faciliten la unión del inmunoconjugado a STEAP-1. "Inhibir el crecimiento o proliferación celular" supone reducir el crecimiento o proliferación de una célula en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% e incluye inducir la muerte celular. En ciertas formas de realización, la

célula es una célula tumoral. En ciertas formas de realización, la célula es una célula de próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario, o célula de sarcoma de Ewing. En ciertas formas de realización, la célula es un xenotrasplante, por ejemplo, como se ejemplifica en la presente memoria descriptiva.

5 [0529]. En un aspecto, un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención se usa para tratar o
prevenir un trastorno proliferativo de células de próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario, o célula de
sarcoma de Ewing. En ciertas formas de realización, el trastorno de proliferación celular se asocia a un
aumento de la expresión o actividad, o ambas, de STEAP-1. Por ejemplo, en ciertas formas de realización,
el trastorno proliferativo de células de próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario, o células de sarcoma de
10 Ewing se asocia a un aumento de la expresión de STEAP-1 en la superficie de una célula de próstata,
pulmón, colon, vejiga u ovario, o célula de sarcoma de Ewing. En ciertas formas de realización, el
trastorno proliferativo de células de próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario, o célula de sarcoma de Ewing
es un tumor o cáncer o metástasis de dicho cáncer.

15 [0530]. En un aspecto, la invención proporciona métodos para el tratamiento de un trastorno
proliferativo de células de próstata, pulmón o colon que comprende la administración a un sujeto de una
cantidad eficaz de un anticuerpo anti-STEAP-1 o un inmunoconjugado de éste. En ciertas formas de
realización, un método para el tratamiento de un trastorno proliferativo de células de próstata, pulmón o
colon supone la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que
comprenda un anticuerpo anti-STEAP-1 o inmunoconjugado anti-STEAP-1 y, opcionalmente, al menos un
agente terapéutico adicional, como los que se proporcionan en la presente memoria descriptiva.

20 [0531]. En un aspecto, al menos algunos de los anticuerpos o inmunoconjugados de la
invención se pueden unir a STEAP-1 de especies distintas a la humana. Por consiguiente, los anticuerpos o
inmunoconjugados de la invención pueden usarse para unirse a STEAP-1, por ejemplo, en un cultivo
celular que contenga STEAP-1, en humanos o en otros mamíferos que tengan un STEAP-1 con el que un
anticuerpo o inmunoconjugado de la invención reaccione (por ejemplo, chimpancé, babuino, tití, macaco de
25 Java y macaco de la India, perro, cerdo, rata o ratón). En una forma de realización, un anticuerpo anti-
STEAP-1 o inmunoconjugado puede utilizarse para que STEAP-1 actúe sobre las células de próstata,
pulmón o colon al poner en contacto un anticuerpo o inmunoconjugado con STEAP-1 para formar un
anticuerpo o complejo antígeno-inmunoconjugado, de manera que una citotoxina conjugada del
inmunoconjugado ingrese al interior de la célula. En una forma de realización, STEAP-1 a la cual se une el
30 anticuerpo anti-STEAP-1 es un STEAP-1 humano. En una forma de realización, STEAP-1 al cual se une el
anticuerpo anti-STEAP-1 es un STEAP-1 de mono cynomolgus. En una forma de realización, el anticuerpo
anti-STEAP-1 humanizado se unen al STEAP-1 humano y de mono cynomolgus.

[0532]. En una forma de realización, un anticuerpo anti-STEAP-1 o un inmunoconjugado se
puede utilizar en un método para unir STEAP-1 en un sujeto que padezca un trastorno asociado a un

aumento de la expresión y/o actividad de STEAP-1 y dicho método comprende la administración al sujeto del anticuerpo o inmunoconjugado de forma que, en el sujeto, se una el STEAP-1. En una forma de realización, el anticuerpo o inmunoconjugado unido se internaliza en las células de próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario o sarcoma de Ewing que expresan STEAP-1. En una forma de realización, STEAP-1 es

5 STEAP-1 humano y el sujeto es un humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que exprese STEAP-1 al que se une un anticuerpo anti-STEAP-1. Además, el sujeto puede ser un mamífero al que se le ha introducido STEAP-1 (por ejemplo, mediante la administración de STEAP-1 o mediante la expresión de un trasgén que codifique STEAP-1).

[0533]. Un anticuerpo anti-STEAP-1 o un inmunoconjugado puede administrarse a un humano

10 con fines terapéuticos. Además, un anticuerpo anti-STEAP-1 o un inmunoconjugado puede administrarse a mamíferos no humanos que expresan STEAP-1 con el que el anticuerpo reaccione (por ejemplo, primate, perro, cerdo, rata o ratón) para fines veterinarios o como modelo animal de una enfermedad humana. Sobre esto último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención (por ejemplo pruebas de dosis y periodos de

15 administración).

[0534]. Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se pueden usar solos o junto con otras composiciones en un tratamiento. Por ejemplo, un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención se puede administrar conjuntamente con al menos un agente terapéutico adicional y/o adyuvante. En ciertas formas de realización, un agente terapéutico adicional es un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico

20 o un agente inhibidor del crecimiento. En una de estas formas de realización, un agente quimioterapéutico es un agente o una combinación de agentes, como por ejemplo, ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina, adriamicina, doxorubicina, vincristina (Oncovin™), prednisolona, CHOP, CVP o COP, o inmunoterapéuticos tales como anti-PSCA (véase, por ejemplo, US6824780) o anti-VEGF (por ejemplo, Avastin®, Genentech, Inc.), anti-HER2 (p-ej., Herceptin®, Omnitarg™ Genentech, Inc.) o anti-HER2 en

25 combinación con Taxol® (véase, por ejemplo, BioWorld Today, 17 de Noviembre de 1999, página 1), donde la terapia de combinación es útil para el tratamiento de trastornos de proliferación celular, cánceres y/o metástasis de cánceres de próstata, pulmón y/o colon..

[0535]. Las terapias combinadas descritas anteriormente incluyen administración combinada (en la que los dos o más agentes se incluyen en la misma o en formulaciones separadas), y administración

30 separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo o inmunoconjugado de la invención puede ocurrir con anterioridad, simultáneamente y/o después de la administración de la terapia o terapias adicionales y/o complementarias. Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se pueden también usar en combinación con radioterapia.

[0536]. Un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención (y agente terapéutico adicional o complementario) puede administrarse por cualquier medio apto, incluyendo las vías parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, la vía intralesional. Las infusiones parentales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal y subcutánea. Además, el anticuerpo o inmunoconjugado se administra correctamente mediante infusión de efecto rápido con dosis del anticuerpo o inmunoconjugado cada vez menores. La dosificación puede realizarse mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones vía intravenosa o subcutánea, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

[0537]. La composición de anticuerpos o inmunoconjugados de la invención debería formularse, dosificarse y administrarse de una manera consistente empleando una práctica médica adecuada. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno específico sometido a tratamiento, el mamífero específico sometido a tratamiento, el estado clínico del paciente, la causa del trastorno, la localización de la administración del agente, el método de administración, la regulación de la administración y otros factores conocidos por los facultativos. El anticuerpo o inmunoconjugado puede formularse opcionalmente con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos agentes depende de la cantidad de anticuerpo o inmunoconjugado presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores ya abordados con anterioridad. Estos son generalmente usados en las mismas dosis y con las mismas vías de administración descritas en la presente memoria descriptiva o aproximadamente entre 1 y 99% de las dosis descritas en la misma, o en cualquier dosis y mediante cualquier vía empírica y clínicamente considerada apropiada.

[0538]. Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada de un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención (cuando se utiliza aislado o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales como los quimioterapéuticos) dependerá del tipo de enfermedad que se tratará, el tipo de anticuerpo o inmunoconjugado, la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el anticuerpo o inmunoconjugado se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo o inmunoconjugado y la discreción del médico tratante. El anticuerpo o inmunoconjugado se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosis inicial candidata para la administración en un paciente es de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (por ej. 0,1mg/kg-20mg/kg) de anticuerpo o inmunoconjugado, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante una infusión continua. Una dosis diaria normal puede oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores anteriormente mencionados. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantendría, por lo general, hasta que ocurriese una supresión deseada de los síntomas de la misma. Un ejemplo de dosis del

anticuerpo o inmunoconjugado se encontraría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, se puede administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) de anticuerpo o inmunoconjugado. Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente, por ejemplo, una vez por semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba aproximadamente de dos a veinte, o por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo o inmunoconjugado). Se puede administrar una mayor carga de dosis inicial seguida de una o más dosis menores. Un ejemplo de pauta posológica comprende la administración de una dosis inicial aproximada de 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. No obstante, también pueden ser útiles otras pautas posológicas. El progreso de este tratamiento se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Ensayos

[0539]. Los anticuerpos anti-STEAP-1 o inmunoconjugados de la invención pueden caracterizarse por sus propiedades físico-químicas o por sus actividades biológicas, o ambas, mediante varios ensayos conocidos en la especialidad.

Ensayos de actividad

[0540]. En un aspecto, se proporcionan ensayos para la identificación de anticuerpos anti-STEAP-1 o inmunoconjugados de los mismos con actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la capacidad de inhibir el crecimiento o proliferación celular (por ejemplo, actividad de "destrucción celular"), o la capacidad de inducir la muerte celular, incluida la muerte celular programada (apoptosis). También se proporcionan anticuerpos o inmunoconjugados con dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

[0541]. En ciertas formas de realización, se comprueba la capacidad de un anticuerpo anti-STEAP-1 o un inmunoconjugado de éste para inhibir el crecimiento o proliferación celular *in vitro*. Los ensayos para la inhibición del crecimiento o proliferación celular son bien conocidos en la materia. Determinados ensayos para la proliferación celular, ejemplificados mediante ensayos "de destrucción de células" descritos en la presente memoria descriptiva, miden la viabilidad celular. Uno de estos ensayos es el ensayo de viabilidad celular por luminiscencia CellTiter-Glo™, que está comercialmente disponible en Promega (Madison, WI). Este ensayo determina el número de células viables en cultivo basado en cuantificación de ATP presente, que indica las células activas metabólicamente. Véase Crouch y col., (1993) *J. Immunol. Meth.* 160:81-88, patente de EE.UU: N.º 6602677. El ensayo puede realizarse en un formato de 96 ó 384 pocillos, lo que hace posible su uso para detección automatizada de alto rendimiento (HTS). Véase Cree y col., (1995) *AntiCancer Drugs* 6:398-404. El procedimiento de este ensayo supone añadir un único reactivo (Reactivo CellTiter-Glo®) directamente a las células en el cultivo. Ello da lugar a

lisis celular y generación de una señal luminescente producida por una reacción con luciferasa. La señal luminescente es proporcional a la cantidad de ATP presente, que es directamente proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. Los datos se pueden registrar mediante un luminómetro o un dispositivo de captación de imágenes mediante cámara CCD. La producción de luminiscencia se expresa como unidades de luz relativas (RLU).

[0542]. Otro ensayo para la proliferación celular es el ensayo "MMT" un ensayo colorimétrico que mide la oxidación de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium a formazan mediante reductasa mitocondrial. Como el ensayo CellTiter-Glo™, este ensayo indica el número de células metabólicamente activas presentes en un citocultivo. Véase, por ejemplo, Mosmann (1983) *J. Immunol. Meth.* 65:55-63, y Zhang y col. (2005) *Cancer Res.* 65:3877-3882.

[0543]. En un aspecto, se comprueba la capacidad de un anticuerpo anti-STEAP-1 para inducir muerte celular *in vitro*. Los ensayos para la inducción de la muerte celular son bien conocidos en la materia. En algunas formas de realización, estos ensayos miden, por ejemplo, la pérdida de integridad de la membrana, como se indica mediante absorción de yoduro de propidio (PI), azul de tripan (véase Moore y col. (1995) *Cytotechnology*, 17:1-11), o 7AAD. En un ensayo ejemplar de absorción de PI, las células se cultivan en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM):Ham's F-12 (50:50) enriquecido con 10% de FBS inactivado por calor (Hyclone) y 2 mM de L-glutamina. De este modo, el ensayo se realiza en ausencia de complemento e inmunocitos efectores. Las células se siembran a una densidad de 3×10^6 por placa en placas de 100 x 20 mm y se deja que se emparejen durante la noche. Después el medio se retira y se reemplaza con un medio nuevo solo o que contenga diversas concentraciones del anticuerpo o inmunoconjugado. Las células se incuban durante 3 días. Tras el tratamiento, las monocapas se lavan con PBS y se separan mediante tripsinización. A continuación, las células se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C; el pellet se resuspende en 3 ml de solución tamponada fría de unión a Ca^{2+} (10 mM Hepes, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2) y se alicuotan en tubos de 35 mm con filtro de 12 x 75 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de la agregación celular. Los tubos reciben entonces el PI (10 µg/ml). Las muestras se analizan utilizando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Se identifican así los anticuerpos o inmunoconjugados que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular, como se determina mediante absorción de PI.

[0544]. En un aspecto, se comprueba la capacidad de un anticuerpo anti-STEAP-1 o inmunoconjugado para inducir la apoptosis (muerte celular programada) *in vitro*. Un ensayo ejemplar para anticuerpos o inmunoconjugados que inducen la apoptosis es un ensayo de unión a anexina. En un ensayo ejemplar de unión a anexina, las células se cultivan y se siembran en placas tal y como se describe en el párrafo anterior. Después el medio se retira y se reemplaza con un medio nuevo solo o que contenga de

0,001 a 10 µg/ml del anticuerpo o inmunoconjugado. Después de un período de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se separan por tripsinización. Después, las células se centrifugan, se resuspenden en un tampón de unión a Ca^{2+} y se alicuotan en tubos tal y como se describe anteriormente.

Después, se añade a los tubos la anexina marcada (por ejemplo, anexina V-FTIC) (1 µg/ml). Las muestras se analizan utilizando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (BD Biosciences). Se identifican así los anticuerpos o inmunoconjugados que inducen niveles estadísticamente significativos de unión a anexina con respecto a controles. Otro ensayo ejemplar para anticuerpos o inmunoconjugados que inducen apoptosis es un ensayo colorimétrico ELISA con complejos ADN-histonas para la detección de degradación internucleosomal de ADN genómico. Este ensayo se puede llevar a cabo utilizando, por ejemplo, el Kit ELISA de detección de muerte celular (Roche, Palo Alto, CA).

[0545]. Las células para uso en cualquiera de los ensayos *in vitro* anteriores incluyen células o líneas celulares que expresan naturalmente STEAP-1 o que se han diseñado para expresar STEAP-1. Estas células incluyen células tumorales que sobreexpresan STEAP-1 con respecto a células normales del mismo origen tisular. Estas células también incluyen líneas celulares (incluidas líneas celulares tumorales) que expresan STEAP-1 y líneas celulares que normalmente no expresan STEAP-1 pero han sido transfectadas con ácido nucleico que codifica STEAP-1.

[0546]. En un aspecto, se comprueba la capacidad de un anticuerpo anti-STEAP-1 o un inmunoconjugado del mismo para inhibir el crecimiento o proliferación celular *in vivo*. En ciertas formas de realización, se comprueba la capacidad de un anticuerpo anti-STEAP-1 o un inmunoconjugado del mismo para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*. Los sistemas de modelos *in vivo*, como modelos xenotrasplantados, se pueden utilizar para estas pruebas. En un sistema xenotrasplantado ejemplar, las células tumorales humanas se introducen en un animal no humano inmunodeprimido apto, por ejemplo, un ratón SCID. Se administra al animal un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención. Se mide la capacidad del anticuerpo o inmunoconjugado para inhibir o reducir el crecimiento tumoral. En ciertas formas de realización del sistema xenotrasplantado anterior, las células tumorales humanas son células tumorales procedentes de un paciente humano. Dichas células útiles para la preparación de modelos xenotrasplantados incluyen líneas celulares de tumor de próstata, pulmón o colon humano, que comprenden, aunque sin limitarse a ellas, las células PC3 que expresan STEAP-1 exógeno, y células que expresan naturalmente STEAP-1 que incluyen, sin limitación, las células LnCAP (Southern Research Institute, Birmingham, AL), las células LuCAP 77 y las células LuCAP35V (University of Washington, Seattle, WA). En ciertas formas de realización, las células tumorales humanas se introducen en un animal no humano debidamente inmunodeprimido mediante inyección subcutánea o mediante trasplante en un sitio apto, como panículos adiposos mamarios.

Ensayos de unión y otros ensayos

[0547]. En un aspecto, se prueba la actividad de unión de un anticuerpo anti-STEAP-1 al antígeno. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, se comprueba la capacidad de un anticuerpo anti-STEAP-1 para unirse a STEAP-1 exógeno o endógeno expresado en la superficie de una célula. Para realizar esta prueba puede utilizarse un ensayo FACS.

5 [0548]. En un aspecto, los ensayos de competición pueden utilizarse para identificar un anticuerpo monoclonal que compite con un injerto 120 o variantes de ellos humanizados, incluyendo, entre otros, un anticuerpo 120v.24 para que se unan a STEAP-1. En ciertas formas de realización, este anticuerpo competitivo se une al mismo epítipo (por ejemplo, un péptido del epítipo lineal o un epítipo conformacional formado por la expresión de STEAP-1 en una superficie celular) que se une mediante un anticuerpo del injerto 120, o un anticuerpo humanizado del injerto 120, incluyendo la variante anticuerpo humanizado 120v.24 anti-STEAP-1. Entre los ensayos de competición ejemplares se incluyen, entre otros, los ensayos habituales como los indicados en Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Métodos ejemplares detallados para el mapeo de un epítipo al que se une un anticuerpo se señalan en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Se dice que dos anticuerpos se unen al mismo epítipo si cada uno bloquea la unión del otro en un 50% o más.

[0549]. En un ensayo de competición ejemplar, un STEAP-1 inmovilizado se incuba en una solución que comprenda un primer anticuerpo marcado que se una a STEAP-1 (por ejemplo, un anticuerpo murino 120.545, un anticuerpo del injerto 120, o un anticuerpo humanizado 120v.24) y un segundo anticuerpo sin marcar del que se comprueba su capacidad para competir con el primero para su unión a STEAP-1. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba un STEAP-1 inmovilizado en una solución que contenga el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo no marcado. Tras la incubación en condiciones que favorezcan la unión del primer anticuerpo a STEAP-1, se elimina el anticuerpo no unido sobrante y se mide la cantidad de marcador asociada a STEAP-1 inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociada a STEAP-1 inmovilizado es sustancialmente reducida en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control, esto indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primero para la unión a STEAP-1. En ciertas formas de realización, un STEAP-1 inmovilizado está presente en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida a partir de una célula que exprese STEAP-1 en su superficie.

30 [0550]. En un aspecto, los anticuerpos purificados anti-STEAP-1 se pueden caracterizar además mediante una serie de ensayos que incluyen, entre otros, la secuenciación del extremo N-terminal, el análisis de aminoácidos, la cromatografía líquida de alta resolución no desnaturizante de exclusión por tamaño (HPLC), la espectrometría de masas, la cromatografía de intercambio iónico y la digestión con papaína.

[0551]. En una forma de realización, la invención contempla un anticuerpo alterado que tiene algunas, pero no la totalidad, de las funciones efectoras, lo que le convierte en un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, pero determinadas funciones efectoras (como complemento y ADCC) son innecesarias o dañinas. En ciertas formas de realización, se miden las actividades Fc del anticuerpo para asegurar que sólo se mantienen las propiedades deseadas. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de actividades de CDC o ADCC, o ambos. Por ejemplo, los ensayos de unión del receptor Fc (FcR) pueden realizarse para asegurar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por eso es probable que carezca de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, células NK, expresan sólo Fc(RIII, mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol*, 9:457-92 (1991). Se describe un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en la patente de EE.UU. N.º 5.500.362 ó 5.821.337. Entre las células efectoras útiles para tales ensayos se encuentran las células mononucleares de la circulación periférica (PBMC) y las células asesinas (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal como el que se desvela en Clynes y col., *PNAS (USA)*, 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo los ensayos de unión C1q para confirmar que el anticuerpo no puede unirse al C1q y por ello carece de actividad CDC. A fin de evaluar la activación del complemento, se puede efectuar un ensayo de CDC, por ejemplo, tal como se describe en Gazzano-Santoro y col., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996). También se pueden realizar la unión de FcRn y eliminación *in vivo*/determinaciones de semivida con el uso de métodos conocidos en la materia.

EJEMPLOS

[0552]. A continuación se muestran ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. A partir de la descripción general proporcionada anteriormente, se entiende que se pueden dar varias formas de realización.

Ejemplo 1: Preparación de anticuerpos anti-STEAP-1 humanizados

[0553]. Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican variantes de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo, fragmento de anticuerpo o dominios de la VL o VH se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la materia. Estos procedimientos incluyen el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de las secuencias de aminoácidos producidas de forma natural) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), la mutagénesis dirigida mediante PCR y la mutagénesis por inserción de un casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo, fragmento de anticuerpo o dominios de la VL o VH. Por ejemplo, se

pueden crear bibliotecas actuando sobre posiciones aminocídicas accesibles del VL en el VH, y opcionalmente en una o más CDR, para sustitución de aminoácidos por variantes de aminoácidos utilizando el método Kunkel. Véase, por ejemplo, Kunkel y col., *Methods Enzymol.* (1987), 154:367-382 y los ejemplos de la presente memoria descriptiva. La generación de secuencias aleatorizadas también se describe más adelante en los ejemplos.

[0554]. La secuencia de oligonucleótidos incluye uno o más de los conjuntos de codones diseñados para una posición concreta en una región CDR (HVR) o FR de un polipéptido de la invención. Un conjunto de codones es un grupo de distintas secuencias de tripletes de nucleótidos usados para codificar variantes de aminoácidos deseadas. Los conjuntos de codones se pueden representar mediante símbolos para designar a nucleótidos concretos o a mezclas equimolares de nucleótidos, como se muestra a continuación según el código IUB.

[0555]. CÓDIGOS IUB

G Guanina

A Adenina

T Timina

C Citosina

R (A o G)

Y (C o T)

M (A o C)

K (G o T)

S (C o G)

W (A o T)

H (A o C o T)

B (C o G o T)

V (A o C o G)

D (A o G o T)

N (A o C o G o T)

[0556]. Por ejemplo, en el conjunto de codones DVK, D puede ser los nucleótidos A o G o T; V puede ser A o G o C; y K puede ser G o T. Este conjunto de codones puede presentar 18 codones diferentes y puede codificar los aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly y Cys.

[0557]. Se pueden sintetizar conjuntos de cebadores u oligonucleótidos utilizando métodos estándar. Es posible sintetizar un conjunto de oligonucleótidos mediante síntesis durante la fase sólida, por ejemplo, que contiene secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de

nucleótidos proporcionadas por el conjunto de codones y que codificará el grupo deseado de aminoácidos. La síntesis de oligonucleótidos con "degeneración" de los nucleótidos seleccionados en determinadas posiciones es bien conocida en la materia. Estos conjuntos de nucleótidos con determinados conjuntos de codones pueden sintetizarse mediante sintetizadores de ácidos nucleicos comercializados (disponibles, por ejemplo, en Applied Biosystems, Foster City, CA) o se pueden adquirir (por ejemplo, a Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de oligonucleótidos sintetizados que tenga un conjunto concreto de codones incluirá habitualmente una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, y estas diferencias estarán establecidas por el conjunto de codones dentro de la secuencia total. Los oligonucleótidos, según se utilizan en la presente invención, tienen secuencias que permiten la hibridación de una plantilla de ácidos nucleicos de dominio variable y también pueden incluir sitios con enzimas de restricción para fines de clonación.

[0558]. En un método, se pueden crear secuencias de ácidos nucleicos que codifican variantes de aminoácidos mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos. Esta técnica es bien conocida en la materia y fue descrita por Zoller y col, 1987, *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504. Explicado brevemente, se crean secuencias de ácidos nucleicos que codifican variantes de ácidos nucleicos mediante hibridación de un conjunto de oligonucleótidos que codifican los conjuntos de codones necesarios con una plantilla de ADN, donde la plantilla es la forma de una única cadena del plásmido que contiene una secuencia de la plantilla de ácidos nucleicos de la región variable. Tras la hibridación, se utiliza ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena complementaria completa de la plantilla, que, de este modo, incorporará el cebador oligonucleótido y contendrá los conjuntos de codones proporcionados por el conjunto oligonucleótido.

[0559]. Por lo general, se utilizan oligonucleótidos de al menos 25 nucleótidos. Un oligonucleótido óptimo tendrá entre 12 y 15 nucleótidos que son completamente complementarios con respecto a la plantilla en cada lado de la codificación del nucleótido o nucleótidos para la mutación o mutaciones. Esto garantiza que la hibridación del oligonucleótido con la molécula de la plantilla de ADN de cadena única se llevará a cabo correctamente. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente utilizando técnicas bien conocidas en la materia, como la descrita por Crea y col., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978).

[0560]. La plantilla de ADN está bien generada por aquellos vectores que se derivan de los vectores bacteriófagos M13 (son adecuados los vectores M13mp18 y M13mp19 comercializados) bien por aquellos vectores que contienen un origen de replicación de fagos de cadena única, tal como se describe en Viera y col., *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). De este modo, el ADN que va a mutarse se puede insertar en uno de estos vectores con el fin de generar una plantilla de cadena única. La producción de la plantilla de cadena única se describe en los apartados 4.21-4.41 de Sambrook y col., mencionado anteriormente.

[0561]. Para alterar la secuencia de ADN nativo, el oligonucleótido se hibrida con la plantilla de cadena única en condiciones de hibridación apropiadas. A continuación, se añade una enzima polimerizadora del ADN, por lo general la ADN polimerasa T7 o el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, para sintetizar la cadena complementaria de la plantilla utilizando el oligonucleótido como
5 cebador para la síntesis. Por lo tanto, una molécula heterodúplex se forma de tal manera que una cadena de ADN codifica la forma mutada del gen 1 y otra cadena (la plantilla original) codifica la secuencia inalterada nativa del gen 1. Esta molécula heterodúplex se transforma en una célula hospedera apta, por lo general, una procariota tal como *E. coli* JM101. Tras cultivar las células, se colocan en placas de agarosa y se analizan utilizando el cebador oligonucleótido radiomarcado con 32-fosfato para identificar las colonias
10 bacterianas que contienen el ADN mutado.

[0562]. El método que se acaba de describir se puede modificar, de forma que se cree una molécula homodúplex en la que las dos cadenas del plásmido contengan la mutación o mutaciones. Las modificaciones son las siguientes: El oligonucleótido de cadena única es hibridado con la plantilla de cadena única como se ha descrito anteriormente. Se combina una mezcla de tres desoxirribonucleótidos, desoxirriboadenosina (dATP), desoxirriboguanosina (dGTP) y desoxirribotimidina (dTTP), con una
15 tiodesoxirribocitosina modificada denominada dCTP-(aS) (que se puede obtener de Amersham). Esta mezcla se añade al complejo formado por el oligonucleótido y la plantilla. Al añadir a la mezcla la ADN polimerasa, se genera una cadena de ADN idéntica a la plantilla, salvo por las bases mutadas. Además, esta nueva cadena de ADN contendrá dCTP-(aS) en vez de dCTP, que sirve para protegerla de la digestión por endonucleasa de restricción. Una vez que se hace una muesca en la cadena de la plantilla del
20 heterodúplex de doble cadena utilizando una enzima de restricción apropiada, la cadena de la plantilla se puede digerir con nucleasa ExoIII u otra nucleasa apropiada pasada la región que contiene el sitio o los sitios que se van a mutagenizar. A continuación, se detiene la reacción para dejar una molécula que sea sólo parcialmente de cadena única. Entonces, se forma un homodúplex de ADN de doble cadena completo
25 utilizando ADN polimerasa en presencia de los cuatro trifosfatos desoxirribonucleótidos, ATP y ADN ligasa. Esta molécula homodúplex se puede transformar entonces en una célula hospedera apropiada.

[0563]. Como se ha indicado anteriormente, la secuencia del conjunto de oligonucleótidos tiene longitud suficiente para hibridar con el ácido nucleico de la plantilla y también puede contener sitios de restricción, aunque no es necesario que lo haga. La plantilla de ADN se puede generar mediante
30 aquellos vectores que se derivan de los vectores bacteriófagos M13 o mediante aquellos vectores que contienen un origen de replicación del fago de cadena única, como se describe en Viera y col. ((1987) *Meth. Enzymol.*, 153:3). De este modo, el ADN que va a mutarse se debe insertar en uno de estos vectores con el fin de generar una plantilla de cadena única. La producción de la plantilla de cadena única se describe en los apartados 4.21-4.41 de Sambrook y col., mencionado anteriormente.

[0564]. Según otro método, se puede generar una biblioteca proporcionando conjuntos de oligonucleótidos situados antes del extremo 5' del promotor y después del extremo 3' del gen, de forma que cada conjunto tenga una pluralidad de oligonucleótidos con secuencias diferentes y las distintas secuencias establecidas por los conjuntos de codones estén dentro de la secuencia de los oligonucleótidos. Los
5 conjuntos de oligonucleótidos situados antes del extremo 5' del promotor y después del extremo 3' del gen, junto con una secuencia de ácidos nucleicos de la plantilla del dominio variable, se pueden utilizar en una reacción en cadena de la polimerasa para generar una "biblioteca" de productos obtenidos mediante PCR. Se puede hacer referencia a los productos obtenidos mediante PCR como "casetes de ácidos nucleicos", puesto que se pueden fusionar con otras secuencias de ácidos nucleicos afines o no afines, por ejemplo,
10 proteínas de la cápside de un virus y dominios de dimerización, utilizando técnicas reconocidas en biología molecular.

[0565]. Se pueden utilizar conjuntos de oligonucleótidos en una reacción en cadena de la polimerasa usando una secuencia de la plantilla de ácidos nucleicos de un dominio variable como la plantilla para crear casetes de ácidos nucleicos. La secuencia de la plantilla de ácidos nucleicos del
15 dominio variable puede ser cualquier porción de cadenas pesadas de inmunoglobulinas que contengan las secuencias de ácidos nucleicos diana (es decir, secuencias de ácidos nucleicos que codifican aminoácidos destinados a sustitución). La secuencia de la plantilla de ácidos nucleicos de la región variable es una porción de una molécula de ADN de doble cadena con una primera hebra de ácido nucleico y una segunda hebra complementaria de ácido nucleico. La secuencia de la plantilla de ácidos nucleicos del dominio
20 variable contiene al menos una porción de un dominio variable y tiene al menos una CDR. En algunos casos, la secuencia de la plantilla de ácidos nucleicos del dominio variable contiene más de una CDR. Una porción situada antes del extremo 5' y una porción situada después del extremo 3' de la secuencia de la plantilla de ácidos nucleicos del dominio variable puede destinarse a hibridación con miembros de un conjunto de oligonucleótidos situados antes del extremo 5' y de un conjunto de oligonucleótidos situados
25 después del extremo 3'.

[0566]. Se puede hibridar un primer oligonucleótido del conjunto de cebadores situados antes del extremo 5' con la primera cadena de ácido nucleico y un segundo oligonucleótido del conjunto de
cebadores situados después del extremo 3' con la segunda cadena de ácido nucleico. Los cebadores de oligonucleótidos pueden incluir uno o más conjuntos de codones y estar diseñados para hibridar con una
30 porción de la secuencia de la plantilla de ácidos nucleicos de la región variable. El uso de estos oligonucleótidos puede introducir dos o más conjuntos de codones en el producto obtenido mediante PCR (es decir, el casete de ácido nucleico) tras la PCR. El cebador oligonucleótido que hibrida con regiones de la secuencia de ácidos nucleicos que codifican el dominio variable de un anticuerpo incluye porciones que codifican residuos de la CDR que están destinados a sustitución de aminoácidos.

[0567]. También se pueden sintetizar los conjuntos de oligonucleótidos situados antes del extremo 5' y después del extremo 3' para incluir sitios de restricción dentro de la secuencia de oligonucleótidos. Estos sitios de restricción pueden facilitar la inserción de las casetes de ácido nucleico (es decir, los productos de la reacción PCR) en un vector de expresión que tenga una secuencia adicional de anticuerpos. En una forma de realización, los sitios de restricción están diseñados para facilitar la clonación de las casetes de ácido nucleico sin introducir secuencias de ácidos nucleicos externas ni eliminar las secuencias originales de ácidos nucleicos de regiones estructurales o CDR.

[0568]. Las casetes de ácido nucleico pueden clonarse para obtener cualquier vector apto para la expresión de una porción o la totalidad de la secuencia de la cadena pesada o ligera que contenga las sustituciones de aminoácidos dirigidas generadas mediante la reacción PCR. Según los métodos detallados en la invención, la casete de ácidos nucleicos se clona para formar un vector que facilite la producción de una porción o la totalidad de la secuencia de la cadena pesada o ligera fusionada con parte o la totalidad de una proteína de la cápside de un virus (es decir, creando una proteína de fusión) y representada en la superficie de una partícula o célula. Aunque están disponibles diversos tipos de vectores que se pueden utilizar para realizar prácticas de esta invención, los vectores fagémidos son los preferidos para uso en la presente memoria descriptiva, dado que se pueden construir con relativa sencillez y se pueden amplificar fácilmente. Los vectores fagémidos suelen contener diversos componentes, que incluyen promotores, secuencias de señal, genes de selección fenotípica, sitios de origen de la replicación y otros componentes necesarios, que son conocidos por los expertos en la materia.

[0569]. Cuando se desea expresar una combinación concreta de variantes de aminoácidos, la casete de ácidos nucleicos contiene una secuencia que puede codificar parte o la totalidad del dominio variable de la cadena ligera o pesada y puede codificar las combinaciones de las variantes de aminoácidos. Para la producción de anticuerpos que contengan estas variantes de aminoácidos o combinaciones de variantes de aminoácidos, como en una biblioteca, las casetes de ácidos nucleicos se pueden insertar en un vector de expresión que contenga una secuencia adicional de anticuerpos, por ejemplo, la totalidad o porciones de los dominios constante o variable de las regiones variables de la cadena pesada y ligera. Estas secuencias adicionales de anticuerpos también se pueden fusionar con otras secuencias de ácidos nucleicos, como secuencias que codifican proteínas de la cápside de un virus, y de este modo permitir la producción de una proteína de fusión.

[0570]. En la presente memoria se describe la humanización del anticuerpo STEAP-1 antihumano murino.

Materiales y métodos

[0571]. La numeración de los residuos se realiza de acuerdo con Kabat (Kabat y col., *Sequences of proteins of immunological interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of

Health, Bethesda, MD (1991)). Para las abreviaturas de los aminoácidos se usa una sola letra. Las degeneraciones de ADN se representan usando el código IUB (N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B = C/G/T, H = A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W = A/T, Y = C/T).

[0572]. Clonación de dominios variables 120 murinos y generación de un anticuerpo 120

5 **quimérico** – Se extrajo el ARN total de las células de hibridoma que producen M2-120.545 (designadas en esta memoria como "murino 120" o "mu120") usando métodos estándar. El dominio variable ligero (VL) y el dominio variable pesado (VH) se amplificaron usando RT-PCR con los cebadores degenerados de las cadenas ligera y pesada. Los cebadores anversos eran específicos para la secuencia de aminoácidos N-terminal de las regiones VL y VH. Los cebadores reversos de las cadenas ligera y pesada, respectivamente, 10 se diseñaron para hibridar en una región del dominio constante ligero (CL) y del dominio constante pesado 1(CH1), y que se conservan en gran medida entre las especies. Las VL y VH amplificadas se clonaron en vectores de expresión de mamífero. La secuencia de polinucleótidos en las inserciones se determinó mediante los métodos de secuenciación habituales. Las secuencias de aminoácidos M2-120.545 ("mu 120") VL y VH se muestran en las Figuras 2A y 2B, respectivamente.

15

[0573]. Generación de quimera murina 120 – Se preparó un anticuerpo anti-STEAP-1 quimérico mediante la fusión de regiones variables pesadas (VH) y variables ligeras (VL) murino 120 con los dominios constantes de un IgG humano. El anticuerpo resultante se designa en esta memoria como "120 quimera", "quimera 120", "IgG 120 quimérico" o "quimera Fc".

20

[0574]. Injertos directos de regiones hipervariables en estructura de consenso humana del aceptor – Las variantes construidas durante la humanización de murino 120 se evaluaron tanto como proteína en la forma de un IgG como de un Fab representado en un fago.

[0575]. El uso fagémido para este trabajo es un vector para representación de Fab-g3 monovalente y consiste en dos estructuras de lectura abierta bajo control del promotor phoA. La primera 25 estructura de lectura abierta consiste en una secuencia de señal StII fusionada con los dominios VL y CH1 de la cadena ligera del aceptor y la segunda consiste en la secuencia de señal stII fusionada con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada del aceptor seguida por la proteína de la cápside del fago menor P3.

30

[0576]. Los dominios VL y VH del murino 120 se alinearon con las secuencias de consenso de los subgrupos VH III humano (huIII) y kappa I VL humano (huKI). Para realizar los injertos CDR, se injertaron regiones hipervariables del anticuerpo murino 120 en las estructuras del aceptor huKI y huIII.

[0577]. Las regiones hipervariables del anticuerpo murino 120 (mu120) se diseñaron en la estructura de consenso humana del aceptor para generar el injerto CDR directo (designado en esta memoria como "120 injerto" o "injerto 120"). En el dominio VL de las siguientes regiones se injertaron al aceptor de

consenso humano: las posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3). En el dominio VH, se injertaron las posiciones 26-35a (H1), 49-65 (H2) y 95-102 (H3). Las secuencias de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del injerto 120 se muestran en las Figuras 2A-2B. Los CDR (también designados en esta memoria como HVR) se muestran en recuadros (Figuras 2A-2B). Estas definiciones CDR incluyen

5 posiciones definidas por su hipervariabilidad de secuencia (ref. Kabat), su localización estructural (ref. Chothia) y su implicación en los contactos antígeno-anticuerpo (MacCallum y col. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)).

[0578]. Las variantes de injerto directo expresadas como un Fab expresado en un fago o como un IgG se generaron mediante mutagénesis según el método de Kunkel usando un oligonucleótido separado

10 para cada región hipervariable. Los clones correctos se evaluaron mediante la secuenciación del ADN.

[0579]. **Generación de variantes de fago 120 humanizadas** – Las variantes 120 humanizadas se generaron como Fab expresado en un fago mediante mutagénesis según el método de Kunkle. Se añadió un oligonucleótido fosforilado a un molde de Kunkel de 300 ng en Tris 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM en un volumen final de 10 µl. La mezcla fue hibridada a 90°C durante 2 min., a 50°C durante 5 min. y después

15 enfriada sobre hielo. Luego se procedió a llenar el molde hibridado añadiendo 0,5 µl de ATP 10mM, 0,5 µl dNTPs 10mM (10mM cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl de DTT 100mM, 1 µl de 10X TM tampón (Tris 0,5 M pH 7,5, MgCl₂ 0,1 M), 80 U T4 ligasa, y 4 U T7 polimerasa en un volumen total de 20 µl durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, una vez llenado y ligado el producto se lo transformó en células azules XL1 (Stratagene). Los clones correctos se identificaron mediante la

20 secuenciación del ADN.

[0580]. Los clones de fago correctos se desarrollaron en 25 ml de 2YT conteniendo 50 µg/ml de carbenicilina y fago auxiliar M13/KO7 (MOI 10) durante toda la noche a 37 °C.

[0581]. **Evaluación de las variantes 120 humanizadas** – Las variantes humanizadas expresadas como IgG se evaluaron mediante análisis FACS utilizando líneas celulares positivas (293 Steap1 NT LB50) y negativas (293 vector S408) de STEAP-1.

25

[0582]. Las variantes humanizadas expresadas como Fab expresado en fago también se evaluaron mediante análisis FACS. Las variantes de Fab expresado en fago se evaluaron primero por su nivel de expresión de Fab usando un ensayo ELISA de fagos para detectar un señalizador fusionado a la cadena ligera del Fab. Las placas de microtitulación se cubrieron con anti-gD 1766 a 10 µg/ml en PBS

30 durante toda la noche y después se bloquearon con un bloqueante de caseína. Los fagos procedentes de los sobrenadantes del cultivo fueron diluidos serialmente en PBST conteniendo BSA al 0,5% en una placa de microtitulación de cultivo de tejido y transferidos a los pocillos recubiertos durante 1 hora para capturar el Fab expresado en fago. La placa se lavó con PBST y se añadió anti-M13 (Amersham Pharmacia Biotech) conjugado con HRP (1:5000 en PBST conteniendo BSA al 0,5 %) durante 40 minutos. La placa se lavó con

PBST y se desarrolló añadiendo sustrato de tetrametilbencidina (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Se usó la absorbancia a 405 nm como una estimación del nivel de expresión del Fab en la superficie del fago. Durante la expresión las preparaciones de fago se normalizaron mediante dilución. Para el análisis FACS se usaron fagos puros con baja expresión (p.ej. los quimera).

- 5 **[0583].** Para el análisis FACS de unión de fagos, se procedió a sacar las células de la placa usando EDTA 2 mM, a recogerlas en un tubo de base cónica de 15 ml y a granularlas mediante centrifugación. Se volvió a suspender las células (5×10^5 células por muestra) en 100 μ l de fago (normalizado por nivel de expresión) en tampón FACS (FBS al 1%, PBS con EDTA 2 mM) y se las incubó durante 1-2 horas sobre hielo. Las muestras fueron lavadas dos veces con tampón FACS mediante centrifugación. Se añadió un anticuerpo de control anti-M13 5G7 (Genentech, Inc. South San Francisco, CA) en 2 μ g/ml y se incubó sobre hielo durante un mínimo de 45 minutos. Las muestras fueron lavadas dos veces con tampón FACS mediante centrifugación. Se añadió una dilución 1:200 de PE antirrátón (fragmento IgG Fcy de antirrátón de cabra R-ficoeritrina, Jackson ImmunoResearch) y se incubó sobre hielo durante 30 minutos. Las muestras volvieron a lavarse dos veces con tampón FACS mediante centrifugación y fueron analizadas por el método FACS.

- 15 **[0584].** Para los análisis de IgG mediante FACS las muestras fueron preparadas como en el FACS de fagos. Se añadió cada IgG en 5 μ g/ml sobre hielo durante 1 hora. Las muestras fueron lavadas dos veces con tampón FACS mediante centrifugación y se añadieron en una dilución de 1:200 de conjugado PE antihumano (fragmento de IgG Fcy antihumano de cabra R-ficoeritrina, Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos. Las muestras volvieron a lavarse dos veces con tampón FACS mediante centrifugación y fueron analizadas por el método FACS.

- 20 **[0585].** *Producción de IgG y determinación de afinidad* – El IgG se purificó con cromatografía de afinidad proteína G. Las determinaciones de afinidad se realizaron mediante análisis Scatchard en células NT LB50 de STEAP-1 293.

25 Resultados y comentarios

- [0586].** *Secuencias de dominio variable murino 120 y diseño de injerto de asignación CDR* – La estructura del aceptor humano usado para la humanización de M2-120.545 se basa en el dominio VL kappa I humano de consenso y en el dominio VH del subgrupo III humano de consenso. Los dominios VL y VH de M2-120.545 murino fueron alineados con los dominios kappa I y subgrupo III humanos; cada región de complementariedad fue identificada e injertada en la estructura del aceptor humano para generar un injerto CDR que pudiese expresarse como un Fab en un fago y se expresase como un IgG. Las secuencias de las regiones variables versión 24 del anticuerpo anti-STEAP-1 humanizado se muestran en las Figuras 2A y 2B. La unión del Fab injerto 120 expresado en fago y del IgG injerto 120 a células que expresan STEAP-1 exógeno (293 STEAP-1 NT LB50) fue sometida a prueba mediante el análisis FACS. Aunque el IgG injerto 120 se unió específicamente a las células que expresan STEAP-1, las señales de

FACS observadas para el IgG injerto 120 fueron menores que las observadas para el IgG 120 quimérico, lo cual indica una pérdida en la afinidad de unión. La expresión de fago del Fab injerto 120 también generó una señal FACS que sólo se observó en las células que expresan STEAP-1. Este cambio fue inferior al observado para el 120 IgG quimérico. El análisis Scatchard del IgG injerto 120 también indicó una pérdida significativa (de aproximadamente 50 veces) en la afinidad de unión ($KD = 36 \text{ nM}$ para el 120v.78; $KD = 260 \text{ nM}$ para el injerto 120).

[0587]. **Humanización de M2-120.545** – Se han identificado aproximadamente 30 posiciones Vernier que influyen en la conformación CDR y en el empaquetado del dominio VL:VH y cuando se proceda a humanizar anticuerpos deben tenerse en cuenta los cambios en esas posiciones entre las estructuras del donante y las humanas (Foote, J. and Winter, G., J. Mol. Biol. 224(2):487-499 (1992)). Una evaluación de la alineación de M2-120.545 murino con el dominio VL kappa I humano de consenso y el dominio VH de consenso del subgrupo III humano reveló diferencias de secuencia en 6 posiciones Vernier clave en el dominio VH: 24, 37, 48, 67, 73, 78 (véase la Figura 2B). Para evaluar la influencia de esas posiciones, se introdujeron individualmente residuos murinos en el dominio VH del subgrupo III de consenso humano del Fab en fago. Esto implicó la realización de las siguientes mutaciones a los Fab injerto 120 expresados en fagos individualmente: A24V (120.v24), V37I (120.v37), V48M (120.v48), F67I (120.v67) y L78F (120.v78). N73T no fue sometido a prueba. Cada variante de fago fue normalizada mediante dilución a un nivel equivalente de expresión de Fab a través de titulación de una señal del epítipo fusionado con la cadena ligera expresada en el fago y después sometida a prueba de evaluación de unión a STEAP-1 mediante análisis de las células que expresan STEAP-1 (293 STEAP-1 NT LB50) y células que no lo expresan (vector 293 S408). El término "2º" se refiere al anticuerpo secundario presente en el análisis FACS. El término " α -120" se refiere al anticuerpo anti-STEAP-1 120 murino. El término " α -10H1" se refiere un anticuerpo de control. Los términos "Fago 24", "Fago 37" y similares se refieren a variantes del anti-STEAP-1 humanizado como se revela en la presente memoria expresadas en fago. "Fago 120 Qu" se refiere a la Quimera 120 expresada en fago y "Fago 120.injerto" se refiere al injerto 120 expresado en fago. (Figura 6). La importancia de la normalización de los clones de fago por su nivel de expresión de Fab se ilustra mediante un análisis FACS del injerto 120 en diferentes tituladores de fagos: 7×10^{12} fago/ml en la Figura 6 y 2×10^{11} fago/ml en la Figura 6. Así, la normalización de los diferentes clones de fago por su nivel de expresión fue un paso importante para la evaluación de sus diferencias de afinidad para STEAP-1.

[0588]. De acuerdo con la normalización por niveles de expresión de Fab, la variante del injerto 120 que contiene la mutación adicional A24V (120.v24) produjo un cambio de FACS superior al de otras variantes (Figura 6). Cuando se expresó como un IgG, 120.v24 produjo un cambio de FACS similar al anticuerpo 120 quimérico en todas las concentraciones sometidas a prueba. El ulterior análisis Scatchard de 120.v24 indicó un K_d de $2,2 \text{ nM}$ para la unión a células NT LB50 del STEAP-1 293, una mejora del doble respecto del quimera 120 y del M2-120.545 murino original (Tabla 2).

Tabla 2: Afinidad de unión del anticuerpo anti-STEAP-1 con el STEAP-1 de la superficie celular (Kd (nM))

Línea celular	Anti-STEAP-1 murino MAb 120.545 nM	Quimera 120	Anti-STEAP-1 humanizado 120v.24
PC3-PS5.4 (STEAP-1 exógeno)	17,5 nM 187.256 puntos por célula	9,9 nM 103.204 puntos por célula	---
293.LB50 (STEAP-1 exógeno)	4,7 nM 301.100 puntos por célula	4,9 nM 252.892 puntos por célula	2,2 nM 264.172 puntos por célula
LNCaP-BR (STEAP-1 endógeno)	1,5 nM 37.207 puntos por célula	0,9 nM 22.021 puntos por célula	---

[0589]. También se sometió a prueba la actividad de unión de anticuerpos desnudos anti-STEAP-1, murino 120 y quimera 120 usando análisis FACS. Se comparó la actividad de unión de STEAP-1 exógeno en NT LB50 STEAP-1 estable 293, PS5.4 STEAP-1 estable PC3 y STEAP-1 endógeno en células LNCaP. Los resultados se muestran también en las Figs. 7D-7F. Las células NT LB50 que expresan STEAP-1 humano exógeno en la superficie celular se prepararon transformando de manera estable células 293 (ATCC CRL-1573) con ADN de STEAP-1 humano. Las células PS5.4 que expresan STEAP-1 humano exógeno en la superficie celular se prepararon transformando de manera estable PC3 (ATCC CLL-1435) con ADN de STEAP-1 humano. Las células LNCaP (ATCC CRL-1740) expresan endógenamente a STEAP-1.

Ejemplo 2: Caracterización de anticuerpos anti-STEAP-1

[0590]. Los anticuerpos anti-STEAP-1 (anticuerpos desnudos y conjugados de fármaco con anticuerpo que se describen en la presente memoria) fueron caracterizados o pueden caracterizarse siguiendo métodos estándar.

[0591]. Ensayos basados en el método ELISA: El análisis del anticuerpo anti-STEAP-1 mediante el método ELISA se realizó de la manera siguiente, habiéndose efectuado todas las incubaciones a temperatura ambiente. Las placas de prueba (Nunc Immunoplate) se cubrieron durante dos horas con STEAP-1 purificado en una solución tampón de 50 mm de carbonato de sodio, pH 9,6, después se bloquearon con albúmina de suero bovino al 0,5% en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 30 minutos y a continuación se lavó cuatro veces con PBS conteniendo Tween 20 al 0,05% (PBST). Se añadieron supernadantes de anticuerpos de prueba y se incubaron durante dos horas sin dejar de

agitar y después se lavó cuatro veces con PBST. Las placas se desarrollaron añadiendo 100 µl/pocillo de una solución conteniendo 10 mg de dihidrocloruro de fenilendiamina (Sigma, N° P8287) y 10 µl de una solución de peróxido de hidrógeno al 30% en 25 ml de solución tampón de citrato-fosfato, pH 5,0, e incubando durante 15 minutos. La reacción se interrumpió añadiendo 100 µl/pocillo de ácido sulfúrico 2,5 M. Los datos se obtuvieron leyendo las placas en un lector de placas ELISA automático a una absorbancia de 490 nm.

Caracterización de la unión de anti-STEAP-1 mediante análisis Scatchard:

[0592]. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse mediante el análisis Scatchard descrito en Munson y col., Anal. Biochem., 107:220 (1980) usando las técnicas estándar conocidas en la especialidad. Véase también Scatchard, G., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660 (1947).

Ejemplo 3: Producción de conjugados de anticuerpos anti-STEAP-1 con fármacos

[0593]. Producción de ADC auristatinos anti STEAP-1. Los ADC anti-STEAP-1 se produjeron mediante conjugación de anticuerpos anti-STEAP-1 120.545 murino, quimera 120, injerto 120, y variantes de la estructura 120 humanizada con las siguientes fracciones del fármaco ligando: spp-DM1, smcc-DM1, MC-vc-PAB-MMAE; MC-vc-PAB-MMAF; MC-MMAE, MC-MMAF, vc-MMAE, y vc-MMAF, cuyas fracciones de fármacos y enlazadores y métodos de unión se describen en la presente memoria descriptiva, así como en el documento WO 2004/010957, publicado el 5 de febrero de 2004, en el documento WO2006/034488, publicado el 9 de septiembre de 2005, y en Doronina, S.O. y col., Nature Biotechnol. 21:778-784 (2003), (las referencias de cada documento se incorporan íntegramente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia). Antes de la conjugación, los anticuerpos se redujeron parcialmente con TCEP mediante métodos estándares según la metodología descrita en el documento WO 2004/010957. Los anticuerpos parcialmente reducidos se conjugaron con las fracciones de enlazadores de fármacos mencionadas anteriormente mediante métodos estándares según la metodología descrita en Doronina y col., (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784 y patente de EE.UU. N.º 2005/0238649 A1. Los anticuerpos parcialmente reducidos se combinaron con las fracciones del enlazador de fármacos para permitir la conjugación de las fracciones a residuos de cisteína. Las reacciones de la conjugación se absorben y los ADC se purifican. La concentración del fármaco (promedio de fracciones de fármaco por anticuerpo) para cada ADC se determinó mediante HPLC. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el componente ligando-fármaco de un ADC, "-MC-vc-PAB-MMAE" o "-MC-vc-PAB-MMAF" es abreviado, a veces, como "-vcMMAE" o "-vcMMAF", y el componente "-MC-MMAF" es abreviado, a veces, como "MCMMAF" o "mcMMAF".

[0594]. Producción de conjugados de fármaco con anticuerpos (CFA) maitansinoides anti-STEAP-1 – Los CFA anti-STEAP-1 se produjeron mediante la conjugación de anticuerpos anti-STEAP-1,

murino 120, quimera 120, injerto 120 y variantes de la estructura 120 humanizada con la fracción del fármaco ligando –smcc-DM1. Dicha conjugación puede realizarse de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2005/037992 para la conjugación del anticuerpo anti-HER2 Herceptin®.

Ejemplo 4: Ensayo de reducción del volumen del tumor in vivo

5 [0595]. Se empleó el siguiente protocolo para determinar la eficacia de los anticuerpos anti-STEAP-1 monoclonales no conjugados o conjugados con toxinas para poder reducir el volumen tumoral *in vivo e in vitro*.

10 [0596]. Líneas celulares de mamíferos y trasplantes de tumores humanos: 293 es una línea celular de riñón embrionario humano inmortalizado (ATCC referencia CRL1573), PC-3 es una línea celular de adenocarcinoma de próstata humano (ATCC referencia CRL1435) y LNCaP es una línea celular de carcinoma de próstata (ATCC CRL1740). Todas las células fueron desarrolladas en un medio Eagle modificado por Dulbecco 50/50 con alto contenido de glucosa, Ham F12 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina al 1% y cultivado a 37°C en CO₂ al 5%. Las líneas celulares estables 293 y PC-3 se generaron mediante transfección (Fugene, Roche) con un vector dirigido por citomegalovirus que codifica a STEAP-1 de longitud completa (LB50 y PS5.4, respectivamente) o a un vector vacío y seleccionado en 400 µg/ml G418 (Geneticin, Life Technologies). Los modelos de explantes de próstata humana, LuCAP 77 y LuCAP 35V, fueron facilitados por la Universidad de Seattle.

20 [0597]. La expresión del STEAP-1 exógeno y endógeno en la superficie celular se demostró mediante inmunohistoquímica (IHQ) y análisis FACS de la manera siguiente. Los anticuerpos anti-STEAP-1 de oveja y ratón (Agensys, Inc., Santa Monica, CA) se generaron contra un péptido aminoterminal intracelular de STEAP-1 (véase Hubert, R.S., Vivanco, I. y col., PNAS 25:14523-14528 (1999)). Los anticuerpos monoclonales contra los dominios extracelulares de STEAP-1 (Agensys Inc.) se generaron mediante inmunización de ratones con células 293T transfectadas transitoriamente con STEAP-1. En el análisis IHQ, para la detección se usó el anticuerpo anti-STEAP-1 primario de oveja. Para el análisis FACS, se desarrollaron las células a una confluencia del 90% y se sacaron de las placas usando EDTA 2 mM en PBS. Las células se lavaron y se volvieron a suspender en una solución tampón FACS (PBS con BSA al 1%) y se incubaron durante 60 minutos con anticuerpos anti-STEAP-1 a temperatura ambiente seguidos por 60 minutos con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con ficoeritrina. Se llevaron a cabo análisis en FACScan (BD Biosciences). Para la inmunofluorescencia, las células se desarrollaron en cámaras de cultivo durante toda la noche y después de incubaron con anticuerpo primario a 37°C durante 60 minutos. Las células se fijaron en paraformaldehído, se bloquearon en BSA al 1% y se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con fluoresceína.

[0598]. Se usaron modelos xenotrasplantados de cáncer de próstata *in vivo* para probar la eficacia de los ADC (conjugados fármaco y anticuerpo) anti-STEAP-1. Esos modelos incluyeron líneas celulares humanas LNCaP (ATCC CRL-1740 o Southern Research Institute, Birmingham, AL). Los modelos de explante de próstata incluyeron LuCaP 77 y LuCaP35V (Universidad de Washington, Seattle, WA). Cada modelo de explante de próstata se mantuvo mediante trasplante seriado en ratones beige SCID machos castrados (modelo andrógeno independiente, LuCAP 35V) o no castrados (modelo andrógeno dependiente, LuCAP 77) de Charles River Lab. Los ratones no castrados recibieron un granulado de testosterona antes de la implantación, mientras que la castración se efectuó al menos dos semanas antes de la implantación del tumor para impedir que los niveles de testosterona llegasen a su punto más bajo. Cuando los ratones donantes tuvieron tumores de entre 800-1.000 mm³, se extirpó asépticamente el tejido tumoral y se procedió a diseccionarlo en trozos pequeños (aproximadamente 20 mm³) aptos para el trasplante a los animales de estudio. Se colocó el tumor dentro de una bolsa en el lugar de implantación y se emplearon grapas para cerrar la piel. Para el modelo de línea celular LNCaP, las células LNCaP desarrolladas *in vitro* se inyectaron subcutáneamente a razón de 8-10 millones de células por ratón en Matrigel al 50% en ratones beige SCID machos que habían recibido un granulado de testosterona. Cuando el tamaño medio del tumor llegó a 100-200 mm³, los animales fueron distribuidos aleatoriamente en diez grupos de diez ratones cada uno y recibieron una única administración IV del ADC anticuerpo de prueba o del anticuerpo de control (desnudo o control). En algunos experimentos, se administraron dosis múltiples de anticuerpo de prueba o de control (véanse las Figuras 8A, 9 y 10). En algunos experimentos, se administró una dosis única del anticuerpo de prueba y de control, como puede verse en las Figuras 8B y 11. Donde el modelo de explante de próstata fue LuCap 77, se implantó en el ratón un granulado de testosterona aproximadamente 3-7 días antes del trasplante del tumor exógeno. Los tumores se midieron dos veces por semana durante 4 semanas y después una o dos veces por semana durante el tiempo restante del estudio, o una vez por semana a lo largo de todo el estudio. La reducción significativa del tamaño del tumor en los animales de prueba con el transcurso del tiempo se consideró una indicación de eficacia. En algunos casos, el volumen del tumor disminuyó significativamente en relación con el tamaño inicial y esa reducción se mantuvo a lo largo del estudio. Los resultados se representan gráficamente en las Figuras 8-11.

Los conjugados del fármaco auristatina anti-STEAP-1 reducen el volumen del tumor de próstata *in*

vivo

[0599]. La administración de 120-MC-vc-PAB-MMAE anti-STEAP murino en 3 mg/kg fue eficaz en un modelo xenotrasplantado (células LNCaP-Ner) de tumor de próstata. Como controles se usaron PBS y anti-gp120-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg). Las dosis se administraron en los días 0, 7 y 14. Véase la Figura 8A.

[0600]. La administración de anticuerpo 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg), 120v.24-MC-MMAF (6 mg/kg), 120v.24-MC-MMAF (12 mg/kg) anti-STEAP-1 humanizado, y de 120 MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) quimérico anti-STEAP-1 a ratones beige SCID trasplantados con tumor LNCap-Ner (tratados con un granulado de testosterona como se ha descrito en la presente memoria) demostró
5 resultar eficaz. Como controles se usaron vehículo, MC-vc-PAB-MMAE anti-artemisa (3 mg/kg) y MC-MMAF anti-artemisa (12 mg/kg). Las dosis se administraron en los días indicados en la Figura 8. Los resultados se grafican en la Figura 8B.

[0601]. La administración de anticuerpo 120 MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) quimérico anti-STEAP-1 y 120 MC-MMAF (6 mg/kg) quimérico anti-STEAP-1 demostró resultar eficaz en un modelo
10 xenotrasplantado de cáncer de próstata de ratones beige SCID trasplantados con células LNCaP. Se administraron a los ratones tres dosis aproximadamente en los días 15, 25 y 30 de 3 mg/kg (vcMMAE anti-STEAP) o 6 mg/kg (mcMMAF anti-STEAP). Como controles se usaron MC-vc-PAB-MMAE anti-artemisa (3 mg/kg) y MC-MMAF anti-artemisa (6 mg/kg). Véase la Figura 9.

[0602]. La administración del anticuerpo 120 MC-vc-PAB-MMAE quimérico anti-STEAP-1
15 (3 mg/kg) resultó eficaz en un modelo xenotrasplantado de cáncer de próstata de ratón macho beige SCID (andrógeno dependiente) trasplantado con células LuCap 77. Los controles fueron vehículos y MC-vc-PAB-MMAE anti-artemisa. Se administraron tres dosis en 3 mg/kg de anticuerpos de prueba y control. Véase la Figura 10.

[0603]. La administración del anticuerpo 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE humanizado anti-
20 STEAP-1 (3 mg/kg) y del anticuerpo 120v.24-MC-MMAF anti-STEAP-1 (6 mg/kg y 12 mg/kg) a ratón beige SCID castrado trasplantado con tumor de próstata LuCap35V resultó eficaz en relación con los controles. La concentración de fármaco fue de 3.1 por anticuerpo. Se administraron anticuerpos de control MC-MMAF anti-artemisa en 12 mg/kg y 120-MC-vc-PAB-MMAE anti-gp en 6 mg/kg. Véase la Figura 11.

Los conjugados del fármaco auristatina anti-STEAP-1 reducen el volumen del tumor de próstata *in vitro*
25

[0604]. Se realizaron ensayos de destrucción de células *in vitro* para evaluar la eficacia de los
conjugados de fármaco y anti-STEAP-1 para la inhibición del desarrollo y/o la destrucción de las células
con expresión de STEAP-1. En síntesis, las células con expresión de STEAP-1 fueron colocadas en placas
a razón de aproximadamente 2.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y tratadas 24 horas más tarde
30 por duplicado con conjugado de fármaco y anticuerpo. Las placas fueron incubadas durante 5-7 días a 37°C
y desarrolladas con el kit de ensayo luminiscente de viabilidad celular CellTiter-Glo® (Promega, Madison,
WI, EE.UU.). Las células de prueba incluyeron células PS5.4 (células PC3 con expresión de STEAP-1
exógeno), LB50 (células 293 con expresión de STEAP-1 exógeno), células PC3 transfectadas con un solo
vector, células 293 transfectadas con un solo vector y células LNCaP con expresión de STEAP-1 endógeno.
35 Los conjugados de fármaco y anticuerpo sometidos a prueba incluyeron anticuerpo de control MC-MMAF,

anticuerpo de control vc-MMAE, anticuerpo 120 vc-MMAE quimérico anti-STEAP-1, anticuerpo 120 MC-MMAF quimérico anti-STEAP-1 (dos lotes diferentes de material) y anticuerpo vc-MMAF quimérico anti-STEAP-1. Los resultados se muestran en las Figuras 14A-E.

Ejemplo 5: Preparación de anticuerpos anti-STEAP-1 diseñados con cisteína para conjugación mediante reducción y reoxidación.

[0605]. Los anticuerpos monoclonales anti-STEAP-1 diseñados con cisteína de longitud completa (ThioMabs) expresados en las células CHO se disuelven en 500 mM de borato de sodio y 500 mM de cloruro de sodio a pH 8,0 aproximadamente y se reducen con un exceso de TCEP de 1 mM equivalente a entre 50 y 100 veces (tris(2-carboxietil)fosfino hidrocloreto, Getz y col., (1999) *Anal. Biochem.* Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) durante 1 ó 2 horas a 37 °C. El ThioMab reducido se diluye y se carga en la columna HiTrap S en acetato sódico 10 mM, pH 5, y se eluye con PBS que contiene cloruro de sodio 0,3 M. El ThioMab reducido eluido se trata con 2 mM de ácido dehidroascórbico (dhAA) a pH 7 durante 3 horas o 2 mM de sulfato de cobre acuoso (CuSO₄) a temperatura ambiente durante la noche. La oxidación al aire del ambiente también puede ser eficaz. El tampón se cambia por medio de la elución con la resina Sephadex G25 y se eluye con PBS con un 1 mM de DTPA. Se controla el valor tiol/Ac mediante la determinación de la reducción de la concentración de anticuerpos a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol mediante la reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm.

Ejemplo 6: Preparación de conjugados de fármaco y anticuerpo anti-STEAP-1 diseñados con cisteína mediante conjugación de anticuerpos anti-STEAP-1 diseñados con cisteína y ligando-fármaco intermedios

[0606]. Después de los procedimientos de reducción y reoxidación del Ejemplo 5, el anticuerpo anti-STEAP-1 diseñado con cisteína se disuelve en un tampón de PBS (solución salina fosfatada) y se enfría en hielo. Aproximadamente, 1,5 equivalentes molares con respecto a las cisteínas diseñadas por anticuerpo de un enlazador intermedio a fármaco auristatina, como MC-MMAE (maleimidocaproilo-monometilo auristatina E), MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE o MC-val-cit-PAB-MMAF, con un grupo funcional de reactivos de tiol, como la maleimida, se disuelve en DMSO, diluye en acetonitrilo y agua, y añade al anticuerpo reoxidado, reducido y enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se agrega un exceso de maleimido para extinguir la reacción y cubrir cualquier anticuerpo del grupo tiol no reactivo. La mezcla de reacción se concentra mediante ultrafiltración centrífuga y el anticuerpo anti-STEAP-1 conjugado con fármacos y diseñado con cisteína se purifica y se desala por elución a través de la resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 µm en condiciones de esterilización y se congela para almacenarse.

[0607]. Mediante al procedimiento indicado anteriormente, se prepararon los siguientes conjugados de fármaco y anticuerpo anti-STEAP-1 diseñados con cisteína (donde la numeración de las variantes es la numeración de Kabat estandarizada para la cadena ligera y la numeración de la UE para la cadena pesada), como se indica en la presente memoria y en la Figura 17):

- 5 120-MC-MMAF humano tio mediante conjugación de la cadena ligera V205C tio-HC-10F4v3 hu 120 y MC-MMAF;
- 120-MC-MMAF humano tio por conjugación de la cadena pesada A118C tio hu 120 y MC-MMAF
- 120-MC-val-cit-PAB-MMAE humano tio por conjugación de cadena ligera V205C tio hu 120 y MC-val-cit-PAB-MMAE; y
- 10 120-MC-val-cit-PAB-MMAE humano tio por conjugación de cadena pesada A118C tio hu 120 y MC-val-cit-PAB-MMAE.

Ejemplo 7: Caracterización de los anticuerpos anti-STEAP-1 diseñados con cisteína

- [0608]. Los conjugados de fármaco y anticuerpo anti-STEAP-1 diseñados con cisteína (TDC) preparados como se ha descrito anteriormente fueron sometidos a ensayo para confirmar que mantienen la actividad del anticuerpo progenitor *in vitro*. Se valoraron los TDC anti-STEAP-1 120-vc-PAB-MMAE (LCV205C) humano tio (abreviado como huSteap1 TDC (L205C) vcE y 120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) humano tio (abreviado como huSteap1 TDC (HCA118C) vcE para comprobar la unión a STEAP-1 mediante análisis FACS en células con expresión de STEAP-1 (293 STEAP-1 NT LB50) y células sin expresión de STEAP-1 (293 vector S408). El término "sólo 2º" se refiere al anticuerpo secundario presente en el análisis FACS. Los controles TDC (vcE) y std ADC (vcE) son conjugados de fármaco y anticuerpos de control vc-PAB-MMAE tio y no tio, respectivamente. El ADC (std) huSteap-1 es un conjugado de fármaco y vc-PAB-MMAE derivado del anticuerpo progenitor humano anti-STEAP-1. Como queda demostrado, los TDC produjeron cambios FACS similares a los del ADC huSteap-1 progenitor.
- 15 20

- [0609]. También se realizaron ensayos de destrucción de células *in vitro* para evaluar la eficacia de los conjugados de fármaco y anticuerpo anti-STEAP-1 para la inhibición del desarrollo y/o la destrucción de las células con expresión de STEAP-1. En síntesis, las células con expresión de STEAP-1 fueron colocadas en placas a razón de aproximadamente 2.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y tratadas 24 horas más tarde por duplicado con conjugado de fármaco y anticuerpo. Las placas fueron incubadas durante 5-7 días a 37°C y desarrolladas con el kit de ensayo luminiscente de viabilidad celular CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Las células de prueba incluyeron PS5.4 (células PC3 con STEAP-1 de expresión exógena), LB50 (células 293 con STEAP-1 de expresión exógena y células LNCaP con STEAP-1 de expresión endógena. Los conjugados de fármaco y anticuerpo sometidos a prueba incluyeron anticuerpo de control vc-MMAE (control std ADC (vcE)), anticuerpo tio de control vc-MMAE
- 25 30

(control TDC (vcE)), los TDC anti-STEAP-1 humano tio 120-vc-PAB-MMAE (LCV205C) (abreviado como huSteap1 TDC (L205C) vcE y humano tio 120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (abreviado como huSteap1 TDC (HCA118C) vcE), y huSteap1 ADC (std), un conjugado de fármaco y vc-PAB-MMAE derivado del anticuerpo de progenitor humano anti-STEAP-1. Como se muestra en las Figuras 19A-C, los TCD anti-STEAP-1 mantienen la actividad del ADC progenitor *in vitro*.

Ejemplo 8: Ensayos de reducción del volumen del tumor *in vivo* para conjugados de fármaco y anticuerpo anti-STEAP-1 diseñados con cisteína

[0610]. Se usaron modelos xenotrasplantados de cáncer de próstata *in vivo* para probar la eficacia de los ADC (conjugados fármaco y anticuerpo) anti-STEAP-1 diseñados con cisteína. Estos modelos y los protocolos de ensayo empleados corresponden a los descritos en el Ejemplo 4.

[0611]. La administración del TDC 120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (abreviado como huSteap1 HC TDC vcE) humano tio anti-STEAP-1 (3 mg/kg) a ratones beige SCID trasplantados con tumor LNCap-Ner (tratados con un granulado de testosterona como se ha descrito en la presente memoria) demostró resultar eficaz. Como controles se emplearon vehículo (PBS), anticuerpo de control vc-MMAE (ADC std ctrl vcE) y anticuerpo de control tio vc-MMAE (TDC HC ctrl vcE). También se comparó el efecto del TDC anti-STEAP-1 con el anticuerpo 120-MC-vc-PAB-MMAE (hu Steap1 std ADC vcE) anti-STEAP-1 como un control positivo. Se administró una dosis única en el día 0. Todos los anticuerpos se administraron en 3 mg/kg. Los resultados se representan gráficamente en la Figura 20.

[0612]. La Figura 21 muestra que la administración de TDC anti-STEAP-1 120-vc-PAB-MMAE humano tio (HCA118C) (abreviado como hu Steap 1 HC TDC vcE) en 3 mg/kg y de TDC anti-STEAP-1 120-MC-MMAF humano tio (HCA118C) (abreviado como hu Steap1 HC TDC mcF) en 3 ó 6 mg/kg resultó eficaz en un modelo xenotrasplantado de cáncer de próstata de ratón beige SCID trasplantado con células LNCaP. Se administraron a los ratones dosis únicas en el día 0 en 0,3, 1 ó 3 mg/kg (huSteap1 HC TDC vcE) o 1, 3 ó 6 mg/kg (huSteap1 HC TDC mcF). Como controles se emplearon vehículo (PBS), anticuerpo de control vc-MMAE (ADC std ctrl vcE) y anticuerpo de control tio vc-MMAE (TDC HC ctrl vcE).

[0613]. La Figura 22 muestra que la administración de TDC anti-STEAP-1 120-vc-PAB-MMAE humano tio (HCA118C) (abreviado como hu Steap 1 HC TDC vcE) en 3 mg/kg y de TDC anti-STEAP-1 120-MC-MMAF humano tio (HCA118C) (abreviado como hu Steap1 HC TDC mcF) en 3 ó 6 mg/kg resultó eficaz en un modelo xenotrasplantado de cáncer de próstata de ratón macho beige SCID (andrógeno dependiente) trasplantado con células LuCap 35V. Se administraron a los ratones dosis únicas en el día 0 en 0,3, 1 ó 3 mg/kg (huSteap1 HC TDC vcE) o 1, 3 ó 6 mg/kg (huSteap1 HC TDC mcF). Como controles se emplearon vehículo (PBS), anticuerpo de control vc-MMAE (ADC std ctrl vcE) y anticuerpo de control tio vc-MMAE (TDC HC ctrl vcE).

OL
26+

2

2/5

Patente

DE Invención

09/34904

Ejemplo 9: Preparación y Caracterización de Anticuerpo SGIV anti-STEAP-1 a partir de Anticuerpo 120 variante 24

[0614]. Se preparó otra variante de anticuerpo LC anti-STEAP-1, en donde la cadena ligera y regiones de estructura, son además, modificadas para obtener niveles mejorados de expresión de anticuerpo.

Materiales y Métodos

[0615]. Los números residuales de conformidad con Kabat ((Kabat *et al.*, *Sequences of proteins of immunological interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Se usaron abreviaturas de aminoácido de una sola letra. Las degeneraciones de ADN son representadas usando el código IUB (N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B= C/G/T, H= A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W= A/T, Y = C/T).

[0616]. *Preparación de una Variante de Cadena Ligera Revisada*: Se generó y caracterizó una variante del anticuerpo 120v.24, designada "Simmons IV", o simplemente "SGIV". La secuencia de aminoácido de la cadena ligera SGIV se proporciona en la SEC ID NO:90. Esta secuencia, alineada con las regiones correspondientes del anticuerpo mu 120 (SEC ID NO:89) y el anticuerpo 120.v24 (SEC ID NO:91), se muestra en la Figura 23.

[0617]. *Valoración de variante SGIV comparada con la variante 120.v24* - Los anticuerpos SGIV y 120.v24, expresados como IgG, fueron expresados por análisis FACS usando las líneas de células positivas Steap1 establemente transformadas 293 Steap1 NT LB48, 293 Steap1 NT LB50, y 293 Steap1 NT LB53, así como también en células LNCaP, las cuales expresan STEAP-1 endógenas (Figura 28). Las células se prepararon como se describe en el Ejemplo 1. Cada IgG se agregó a 5 µg/ml en hielo por horas. Las muestras se lavaron dos veces con amortiguador FACS por centrifugación y se agregó por 30 minutos, una dilución 1:200 de conjugado PE anti-humano (Fragmento IgG Fcy anti-humano de cabra de R-ficoeritrina, Jackson Immunoresearch). Las muestras fueron nuevamente lavadas dos veces con amortiguador FACS por centrifugación y las muestras fueron analizadas por FACS.

[0618]. *Determinación de Afinidad a base de Scatchard de SGIV y 120.v24 que se enlaza a STEAP-1* - Las afinidades de los anticuerpos 120.v24 y Simmons IV ("SGIV") a STEAP-1, se determinaron usando el análisis Scatchard de conformidad con los métodos estándares. El IgG se purificó con cromatografía de afinidad de Proteína G. Las determinaciones de afinidad se realizaron por análisis Scatchard en células PC-3-PS5.4, 293-LB50 y LNCap-BR por duplicado. Los trazos Scatchard de 120.v24 y SGIV en células LNCaP BR y células 293.LB50 se muestran en las Figuras y 26, respectivamente. Se muestra en la Figura 27, una tabla que compara las afinidades de enlace promedio para mu 1789, mu 120,

quimera Fc, 120.v24 humanizado, tio-120.v24 y tio-SGIV en células 293-LB50 y LNCaP-BR, así como también en células 293 que expresan temporalmente STEAP-1-.

[0619]. *Mutagénesis Dirigida al Sitio de SGIV y 120.v24*: Variantes de anticuerpos SGIV y 120.v24 se prepararon usando protocolos de mutagénesis estándar como se describe anteriormente. La primera clase de variantes que resultan de la mutagénesis dirigida al sitio por medio de residuos particulares de Simmons IV ("SGIV"), fueron reemplazadas con el residuo correspondiente de 120.v24 para mejorar además, la afinidad de enlace. Las variantes específicas producidas, como se muestra en la Figura 24, fueron como sigue:

(1) LS.VLVH1, en donde los residuos 42 ("Q") y 43 ("P") fueron modificados a "K" y "A", respectivamente (SEC ID NO: 92).

(2) LS.VLVH2, en donde el residuo 3 ("V") se modificó a "Q", los residuos 42 ("Q") y 43 ("P"), se modificaron a "K" y "A", respectivamente, y el residuo 85 ("V"), se modificó a "T" (SEC ID NO:93).

(3) LS.Q, en donde el residuo 3 ("V") se modificó a "Q" (SEC ID NO:94).

(4) LS.CH1, en donde el residuo 15 ("L") se modificó a "V" y el residuo 83 ("V") se modificó a "F" (SEC ID NO:95).

[0620]. Se generó una segunda clase de variantes a través de mutagénesis dirigida al sitio, en donde residuos particulares de 120.v24, fueron reemplazados con el residuo correspondiente de Simmons IV (SIGV), en un intento por mejorar los niveles de expresión de anticuerpo. Las variantes específicas, como se muestra en la Figura 24, fueron como sigue:

(1) ED.FW1, en donde el residuo 3 ("Q") se modificó a "V"; el residuo 9 ("S") se modificó a "D"; el residuo 12 ("S") se modificó a "A"; el residuo 13 ("A") se modificó a "V"; el residuo 15 ("V") se modificó a "L"; el residuo 17 ("D") se modificó a "E"; el residuo 19 ("V") se modificó a "A"; y el residuo 22 ("T") se modificó a "N" (SEC ID NO:96).

(2) ED.FW2, en donde los residuos 42 ("K") y 43 ("A") de 120.v24, fueron modificados a "Q" y "P", respectivamente (SEC ID NO:97).

(3) ED.FW3, en donde el residuo 60 ("S") se modificó a "D"; el residuo 80 ("P") se modificó a "A"; el residuo 83 ("F") se modificó a "V"; y el residuo 85 ("T") se modificó a "V" (SEC ID NO:98).

(4) ED.all, en donde el residuo 3 ("Q") se modificó a "V"; el residuo 9 ("S") se modificó a "D"; el residuo 12 ("S") se modificó a "A"; el residuo 13 ("A") se modificó a "V"; el residuo 15 ("V") se

modificó a “L”; el residuo 17 (“D”) se modificó a “E”; el residuo 19 (“V”) se modificó a “A”; el residuo 22 (“T”) se modificó a “N”; los residuos 42 (“K”) y 43 (“A”) de 120.v24, fueron modificados a “Q” y “P”; el residuo 60 (“S”) se modificó a “D”; el residuo 80 (“P”) se modificó a “A”; el residuo 83 (“F”) se modificó a “V”; y el residuo 85 (“T”) se modificó a “V” (SEC ID NO:99).

5 (5) ED.Pro, en donde el residuo 43 (“A”) se modificó a “P” y el residuo 80 (“P”) se modificó a “A” (SEC ID NO:100) .

(6) ED.pl, en donde el residuo 9 (“S”) se modificó a “D”; el residuo 42 (“K”) se modificó a “Q” y el residuo 60 (“S”) se modificó a “D” (SEC ID NO:101).

10 Resultados y Discusión

[0621]. *Preparación de anticuerpo SGIV* – Las secuencias de la región variable versión 24 (120.v24) de anticuerpo anti-STEAP-1, se muestran en las Figuras 23 y 24 (SEC ID NO:91). Usando mutagénesis dirigida al sitio, se prepararon otras variantes llamadas “Simmons IV” o simplemente “SGIV”, usando protocolos de mutagénesis estándar, como se describe anteriormente. Las Figuras 23 y 24 muestran la secuencia de cadena ligera SGIV en alineamiento con aquella del anticuerpo mu 120 y 120.v24. Los tituladores de varias colectas de anticuerpo SGIV, se muestran en la Figura 29.

15 [0622]. *Comparación de Enlace de SGIV y 120.v24 a STEAP-1 usando FACs* – La capacidad de ambos anticuerpos, 120.v24 y SGIV, para enlazarse a STEAP-1 expresado en la superficie celular, fue medida usando FACS. El enlace de anticuerpo a las líneas celulares que expresan ya sea STEAP-1 exógeno (293 STEAP-1 LB48, 293 STEAP-1 LB50 y 293 STEAP-1 LB53) o STEAP-1 endógeno (LNCaP.Br), fueron medidas por duplicado; los resultados se resumen en la Figura 28. Como se muestra en la Figura 28, ambos anticuerpos fueron capaces de enlazarse a STEAP-1 en las cuatro líneas celulares.

25 [0623]. *Afinidad de enlace al anticuerpo SGIV a STEAP-1 y Comparación con 120.v24* – Las afinidades de enlace del SGIV y 120.v24 a STEAP-1, fueron examinadas usando análisis Scatchard. Los trazos Scatchard de 120.v24 y SGIV en células LNCaP BR y células 293.LB 50, se muestran en las Figuras 25 y 26, respectivamente. Una tabla que compara las afinidades de enlace promedio, para mu 1789, mu 120, quimera Fc, anticuerpos humanizados 120.v24, tio-120.v24 y tio-SGIV en células PC-3-PS5.4, 293-LB50 y LNCaP-BR, así como también en células 293 que expresan temporalmente STEAP-1, se muestra en la Figura 27. Los resultados indican que la afinidad de enlace del anticuerpo 120.v24 en células 293-LB50 y LNCaP.BR, es bruscamente 1.5 veces aquella de la variante SGIV.

30 [0624]. Aunque la anterior invención se ha descrito en detalle a modo de ejemplo a efectos de claridad y comprensión, las descripciones y ejemplos no se deben interpretar de forma que limiten el ámbito de la invención. El contenido de todas las patentes y documentos científicos citados en la presente memoria descriptiva quedan expresamente incorporados en la misma en su integridad a modo de referencia.

LAS REIVINDICACIONES SON:

1. Un anticuerpo que se une a STEAP-1, donde el anticuerpo comprende al menos una, dos o tres regiones hipervariables (HVR) de la cadena pesada (HC) seleccionadas entre:
 - 5 (1) una HVR-H1 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 14;
 - (2) una HVR-H2 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 15; y
 - (3) una HVR-H3 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 16.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende, además, al menos una, dos o tres regiones de estructuras (FRs) HC seleccionadas entre:
 - 10 (1) una HC-FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 25
 - (2) una HC-FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 22
 - (3) una HC-FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 75
 - (4) una HC-FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 76
 - (5) una HC-FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 23
 - 15 (6) una HC-FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 78
 - (7) una HC-FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 79; y
 - (8) una HC-FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 24
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, comprende, además, una cadena ligera (LC) de identificador de secuencia n.º: 6.
- 20 4. El anticuerpo de la reivindicación 2, comprende, además, una cadena ligera (LC) de identificador de secuencia n.º: 6.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde la HC tiene al menos un 90% de identificación de secuencia de los identificadores de secuencia n.º: 9 ó 10.
6. El anticuerpo de la reivindicación 2, donde la HC tiene al menos un 90% de identificación de secuencia de los identificadores de secuencia n.º: 9 ó 10.
- 25 7. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo es humanizado.
8. El anticuerpo de la reivindicación 2, donde el anticuerpo es humanizado.
9. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde STEAP-1 es un STEAP-1 mamífero.
10. El anticuerpo de la reivindicación 9, donde el STEAP-1 se selecciona del STEAP-1 de un roedor y el STEAP-1 de un primate.
- 30 11. El anticuerpo de la reivindicación 31, donde STEAP-1 es un STEAP-1 humano.
12. Un polinucleótido que codifica una HC que comprende, al menos, una, dos o tres HC-HVR seleccionadas a partir de:
 - (1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 14
 - 35 (2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 15; y

- (3) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 16
13. Un polinucleótido de la reivindicación 12 que comprende, al menos, una, dos, tres o cuatro HC-FR seleccionadas a partir de:
- 5 (1) una HC-FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 25
 (2) una HC-FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 22
 (3) una HC-FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 75
 (4) una HC-FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 76
 (5) una HC-FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 23
 (6) una HC-FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 78
 10 (7) una HC-FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 79 y
 (8) una HC-FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 24
14. Un vector que comprenda el polinucleótido de la reivindicación 12.
15. Una célula hospedera que comprende el vector de la reivindicación 12.
16. La célula hospedera de la reivindicación 15, donde la célula hospedera es una célula bacteriana, de
 15 levadura, de insecto o eucariótica. .
17. La célula hospedera de la reivindicación 42, donde la célula hospedera es una célula CHO.
18. Un método de fabricación de un anticuerpo anti-STEAP-1, en el que el método comprende a) el cultivo de la célula hospedera de la reivindicación 15 en condiciones aptas para la expresión del polinucleótido que codifica el anticuerpo, y b) el aislamiento del anticuerpo.
- 20 19. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que STEAP-1 se expresa en la superficie de una célula.
20. El anticuerpo de la reivindicación 19, en el que la célula es una célula de próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario o célula de sarcoma de Ewing.
21. El anticuerpo de la reivindicación 20, en el que la célula se asocia a un trastorno proliferativo.
22. El anticuerpo de la reivindicación 21, en el que el trastorno es un cáncer.
- 25 23. El anticuerpo de la reivindicación 22, en el que el cancer es una metástasis.
24. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
25. El anticuerpo de la reivindicación 24, donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre el fragmento Fab, Fab' -SH, Fv, scFv o (Fab')₂.
26. El anticuerpo de la reivindicación 60, donde el anticuerpo es humanizado.
- 30 27. El anticuerpo de la reivindicación 60, donde el anticuerpo es humano.
28. Un método de detección de la presencia de STEAP-1 en una muestra biológica, dicho método comprende establecer el contacto entre la muestra biológica y un anticuerpo de la reivindicación 1 en condiciones que faciliten la unión del anticuerpo a STEAP-1, y detectar si un complejo está formado por el anticuerpo y STEAP-1.

29. El método de la reivindicación 28, donde la muestra biológica se obtiene de un paciente que se cree que padece un trastorno proliferativo de células de próstata, pulmón, colon, vejiga, ovario o sarcoma de Ewing.

30. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la reivindicación 1 que se une covalentemente a un agente citotóxico.

31. El inmunoconjugado de la reivindicación 30, donde el agente citotóxico se selecciona a partir de una toxina, un agente quimioterapéutico, una fracción de fármaco, un antibiótico, un isótopo radioactivo y una enzima nucleolítica.

32. Un inmunoconjugado de la reivindicación 31 que comprende la fórmula $Ab-(L-D)_p$, donde:

(a) Ab es el anticuerpo de la reivindicación 1;

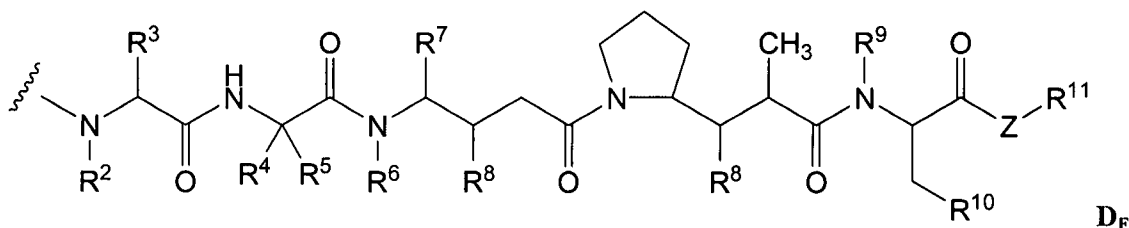
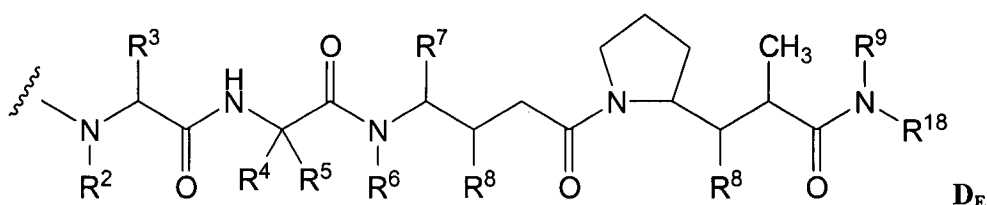
(b) L es un enlazador;

(c) D es una fracción de fármaco.

33. El inmunoconjugado de la reivindicación 32, en el que L se selecciona a partir de 6-maleimidocaproilo (MC), maleimidopropanoilo (MP), valina-citrulina (val-cit), alanina-fenilalanina (ala-phe), p-aminobenciloxicarbonil (PAB), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato (SPP), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato (SMCC), N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato (SIAB), y 6-maleimidocaproilo-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonil (MC-vc-PAB).

34. El inmunoconjugado de la reivindicación 33, en el que D se selecciona a partir de una auristatina y una dolastatina.

35. El inmunoconjugado de la reivindicación 34, en el que D es una fracción de fármaco de la fórmula D_E o D_F :



y donde R^2 y R^6 son, cada uno, metilo; R^3 y R^4 son cada uno isopropilo; R^7 es sec butilo, cada R^8 se selecciona independientemente entre CH_3 , $O-CH_3$, OH , y H ; R^9 es H ; R^{10} es arilo; Z es $-O-$ o $-NH-$; R^{11} es H , C_1-C_8 alquilo o $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_3$; y R^{18} es $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-$ arilo; y

(d) p oscila entre aproximadamente 1 y 8.

36. El inmunoconjugado de la reivindicación 32, con actividad de destrucción celular in vitro o in vivo.
37. El inmunoconjugado de la reivindicación 32, donde el enlazador se une al anticuerpo a través de un grupo tiol en el anticuerpo.
- 5 38. El inmunoconjugado de la reivindicación 32, donde el enlazador es escindible mediante una proteasa.
39. El inmunoconjugado de la reivindicación 32, donde el enlazador comprende un dipéptido val-cit.
40. El inmunoconjugado de la reivindicación 32, donde el enlazador comprende una unidad p-aminobencilo.
41. El inmunoconjugado de la reivindicación 32, donde el enlazador comprende 6-maleimidocaproilo.
- 10 42. El inmunoconjugado de la reivindicación 32, donde el fármaco se selecciona entre MMAE y MMAF.
43. El inmunoconjugado de la reivindicación 42, donde el fármaco es MMAE.
44. El inmunoconjugado de la reivindicación 42, donde el fármaco es MMAF.
45. El inmunoconjugado de la reivindicación 32 donde el inmunoconjugado tiene la fórmula
- Ab-(L-MMAE)p,
- 15 donde L es un enlazador y p oscila entre 2 y 5.
46. El inmunoconjugado de la reivindicación 45, donde L comprende val-cit.
47. El inmunoconjugado de la reivindicación 45, donde L comprende MC.
48. El inmunoconjugado de la reivindicación 45, donde L comprende PAB.
49. El inmunoconjugado de la reivindicación 45, donde L comprende MC-vc-PAB.
- 20 50. El inmunoconjugado de la reivindicación 45, donde el inmunoconjugado tiene la fórmula
- Ab-(L-MMAF)p,
- donde L es un enlazador y p oscila entre 2 y 5.
51. El inmunoconjugado de la reivindicación 50, donde L comprende val-cit.
52. El inmunoconjugado de la reivindicación 50, donde L comprende MC.
- 25 53. El inmunoconjugado de la reivindicación 50, donde L comprende PAB.
54. El inmunoconjugado de la reivindicación 50, donde L comprende MC-vc-PAB.
55. El inmunoconjugado de la reivindicación 50, donde el inmunoconjugado tiene la fórmula
- Ab-(L-MMAF)p,
- donde L es un enlazador y p oscila entre 2 y 5.
- 30 56. El inmunoconjugado de la reivindicación 32, donde D es un maitansinoide.
57. El inmunoconjugado de la reivindicación 56, donde D se selecciona a partir de DM1, DM3 y DM4.
58. El inmunoconjugado de la reivindicación 56, con actividad de destrucción celular in vitro o in vivo.
59. El inmunoconjugado de la reivindicación 56, donde el enlazador se une al anticuerpo a través de un grupo tiol en el anticuerpo.

60. El inmunoconjugado de la reivindicación 56, donde el enlazador L se selecciona a partir de N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato (SPP), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato (SMCC) y N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato (SIAB).
- 5 61. El inmunoconjugado de la reivindicación 60, donde el fármaco es DM1.
62. El inmunoconjugado de la reivindicación 62, donde L comprende un SPP.
63. El inmunoconjugado de la reivindicación 61, donde L comprende SMCC.
64. El inmunoconjugado de la reivindicación 61, donde p oscila entre 2 y 46.
65. El inmunoconjugado de la reivindicación 64, donde p oscila entre 3 y 45.
- 10 66. Una composición farmacéutica que contiene el inmunoconjugado de la reivindicación 32 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
67. Un método de tratamiento de un trastorno proliferativo de células que comprenda la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la reivindicación 66.
68. El método de la reivindicación 67, en el que el trastorno proliferativo de células se selecciona a partir de de un trastorno proliferativo de células de próstata, pulmón, colon, vejiga, ovario y sarcoma de Ewing.
- 15 69. Un método para inhibir la proliferación de células de próstata, pulmón, colon, vejiga, ovario y sarcoma de Ewing que comprende la exposición de una célula a un inmunoconjugado de la reivindicación 32 en condiciones que faciliten la unión del inmunoconjugado a STEAP-1.
70. El método de la reivindicación 69, en el que la proliferación de células de próstata, pulmón, colon, vejiga, ovario y sarcoma de Ewing es un xenotrasplante.
- 20 71. El método de la reivindicación 69, donde la exposición se produce *in vitro*.
72. El método de la reivindicación 69, donde la exposición se produce *in vivo*.
73. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo diseñado con cisteína que comprende uno o más aminoácidos de cisteína libre con un valor de reactividad del tiol que oscila entre 0,6 y 1,0, donde el anticuerpo diseñado con cisteína se prepara mediante un proceso que comprende la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo parental por una cisteína.
- 25 74. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 73, en la que dicho anticuerpo es más reactivo que el anticuerpo parental con un reactivo del tiol.
75. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 73, en la que el proceso comprende, además, la determinación de la reactividad del tiol del anticuerpo diseñado con cisteína mediante la reacción de dicho anticuerpo con un reactivo del tiol;
- 30 donde el anticuerpo diseñado con cisteína es más reactivo que el anticuerpo parental con el reactivo del tiol.
76. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 73, en el que uno o más residuos de aminoácidos de cisteína libre se encuentran en una cadena ligera.
- 35

77. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 73, en el que uno o más residuos de aminoácidos de cisteína libre se encuentran en una cadena pesada.
78. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 73, en la que el anticuerpo es un inmunocóncugado que comprende el anticuerpo diseñado con cisteína que se une covalentemente a un agente citotóxico.
79. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 78, donde el agente citotóxico se selecciona a partir de una toxina, un agente quimioterapéutico, una fracción de fármaco, un antibiótico, un isótopo radioactivo y una enzima nucleolítica.
80. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 73, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de captura, una marca de detección o un soporte sólido.
81. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 80, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de captura de biotina.
82. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 80, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de detección de un tinte fluorescente.
83. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 82, donde el tinte fluorescente se selecciona a partir de un tipo de fluoresceína, un tipo de rodamina, dansil, lisamina, cianina, ficoeritrina, Rojo Texas y un análogo de éstos.
84. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 80, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de detección de radionucleidos seleccionada de ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At y ^{213}Bi .
85. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 80, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de detección mediante un ligando quelante.
86. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 80, donde el ligando quelante se selecciona a partir de DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA.
87. El inmunocóncugado de la reivindicación 32, donde el enlazador se une al anticuerpo a través de un grupo tiol en el anticuerpo.
88. El anticuerpo de la reivindicación 1 comprende un péptido de unión a la albúmina.
89. El anticuerpo de la reivindicación 88, donde el péptido de unión a la albúmina se selecciona a partir de los identificadores de secuencia n.ºs: 80-84.
90. El método de la reivindicación 67, comprende, además, la administración al sujeto de una cantidad eficaz de, al menos, un compuesto terapéutico adicional seleccionado entre un ácido quimioterapéutico, un radionucleido, CHOP, un anticuerpo desnudo, un anticuerpo cóncugado con fármaco y un inmunocóncugado.
91. El método de la reivindicación 90, donde el anticuerpo, ADC, y el inmunocóncugado se unen a un antígeno expresado en las células en proliferación.

92. El método de la reivindicación 91, donde las células en proliferación proceden del sarcoma de próstata, de pulmón, de colon, de vejiga, de ovario o de Ewing.
- 5 93. Un anticuerpo anti-STEAP-1 diseñado con cisteína que comprende uno o más aminoácidos de cisteína libre, en donde el anticuerpo anti-STEAP-1 diseñado con cisteína se une a un polipéptido STEAP-1 y se prepara mediante un proceso que comprende la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti-STEAP-1 progenitor diseñado con cisteína, en donde el anticuerpo progenitor comprende al menos una secuencia HVR seleccionada de:
- 10 (a) una secuencia HVR-L1 del ID. SEC. N° 11;
(b) una secuencia HVR-L2 del ID. SEC. N° 12;
(c) una secuencia HVR-L3 del ID. SEC. N° 11;
(d) una secuencia HVR-H1 del ID. SEC. N° 14;
(e) una secuencia HVR-H2 del ID. SEC. N° 15; y
(f) una secuencia HVR-H3 del ID. SEC. N° 16
- 15 94. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 1, donde el anticuerpo anti-STEAP-1 progenitor comprende una secuencia de cadena pesada variable seleccionada a partir de una de ID. SEC. N°s. 9-10.
95. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 1, donde el anticuerpo anti-STEAP-1 progenitor comprende una secuencia de ligera variable seleccionada de ID. SEC. N° 6.
- 20 96. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 1, donde uno o más residuos de aminoácidos están localizados en una cadena ligera.
- 25 97. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 4, que comprende una o más secuencias seleccionadas de:
- (1) una HC-FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 25
(2) una HC-FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 22
(3) una HC-FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 75
(4) una HC-FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 76
(5) una HC-FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 23
(6) una HC-FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 78

(7) una HC-FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 79, y

(8) una HC-FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 24

98. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 1, en el que uno o más residuos de aminoácidos de cisteína libre están localizados en una cadena pesada.

5 99. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 6, que comprende una o más secuencias seleccionadas de:

(1) una LC-FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 17

(2) una LC-FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 18

(3) una LC-FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 19 y

10 (4) una LC-FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 20

100. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 93, que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende el ID. SEC. N° 9.

101. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 93, que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende el ID. SEC. N° 10.

15 102. El anticuerpo diseñada con cisterna de la reivindicación 93 que comprende una secuencia de cadena ligera que comprende el ID. SEC. N° 6.

103. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 93, en el que el anticuerpo parental anti-STEAP-1 se selecciona a partir de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano y un anticuerpo humanizado.

20 104. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 93 que es un fragmento de anticuerpo.

105. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 104, donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab.

106. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 93 que se selecciona a partir de un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.

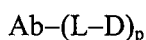
25 107. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 93 que se produce en una bacteria.

108. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 93 que se produce en células CHO.

109. Un método para determinar la presencia de una proteína STEAP-1 en una muestra que se cree que contiene dicha proteína; este método comprende exponer esta muestra a un anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 93 y determinar la unión de este anticuerpo a dicha proteína STEAP-1 en esta muestra, donde la unión del anticuerpo a dicha proteína indica la presencia de dicha proteína en la muestra.

30

110. El método de la reivindicación 109, donde la muestra comprende una célula que se cree que expresa dicha proteína STEAP-1.
111. El método de la reivindicación 109, donde dicha célula es una célula cancerosa de próstata, pulmón, colon, vejiga u ovario o una célula de sarcoma de Ewing.
- 5 112. El método de la reivindicación 109, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca seleccionada a partir de un tinte fluorescente, un radioisótopo, una biotina o un ligando de formación de complejos de metal.
113. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-STEAP-1 de la reivindicación 93 y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 114. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 93, donde el anticuerpo se une covalentemente a una fracción del fármaco auristatina o maitansinoide, a través de la cual se forma el conjugado de anticuerpo con fármacos.
115. El conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 114 comprende un anticuerpo diseñado con cisteína (Ab) y una fracción del fármaco auristatina (D) en la que el anticuerpo diseñado con cisteína se une por medio de uno o más aminoácidos de cisteína libre y de una porción de enlazador (L) a D, el compuesto que posee Fórmula I.
- 15



I

donde p es 1, 2, 3 ó 4.

116. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 115, donde p es 2.

- 20 117. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 115, donde L tiene la fórmula.



donde:

A es una unidad de extensión unida covalentemente a un tiol de cisteína del anticuerpo diseñado con cisteína (Ab),

a es 0 ó 1,

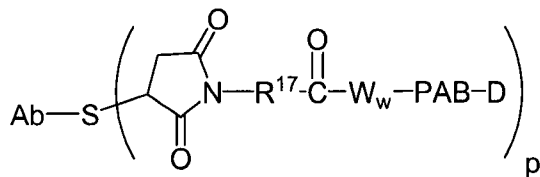
cada W es independientemente una unidad de aminoácidos,

w es un número entero que oscila entre 0 y 12,

Y es una unidad espaciadora unida covalentemente a una fracción de fármaco y

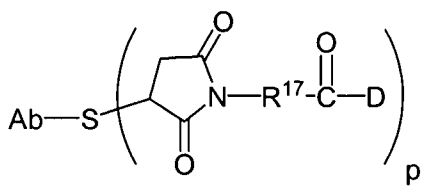
y es 0, 1 ó 2.

118. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 117 con la fórmula:

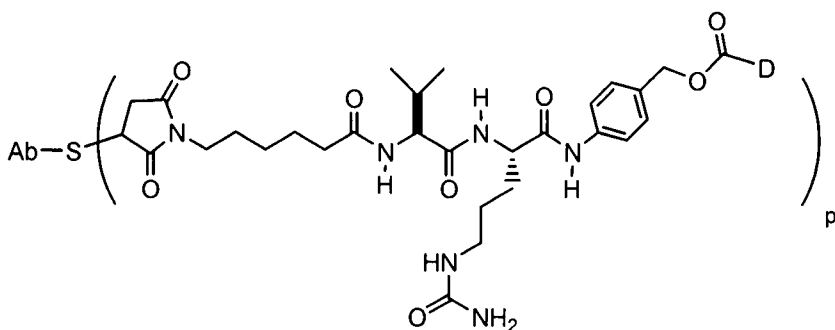


- 5 donde PAB es un para-aminobenzilcarbamoil y ^{17}R es un radical divalente seleccionado de $(\text{CH}_2)_r$, $\text{C}_3\text{-C}_8$ carbociclilo, $\text{O}-(\text{CH}_2)_r$, arileno, $(\text{CH}_2)_r$ -arileno, -arileno- $(\text{CH}_2)_r$, $(\text{CH}_2)_r$ - $(\text{C}_3\text{-C}_8$ carbociclilo), $(\text{C}_3\text{-C}_8$ carbociclilo)- $(\text{CH}_2)_r$, $\text{C}_3\text{-C}_8$ heterociclilo, $(\text{CH}_2)_r$ - $(\text{C}_3\text{-C}_8$ heterociclilo), - $(\text{C}_3\text{-C}_8$ heterociclilo)- $(\text{CH}_2)_r$, - $(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2)_r$ -, - $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -, - $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{-CH}_2$ -, - $(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -, - $(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{-CH}_2$ -, - $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -, - $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{-CH}_2$ - y - $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2)_r$ -; donde R^b es H, $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquilo, fenilo o bencilo y r es independientemente un número entero que oscila entre 1 y 10.

- 10 119. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 117, donde W_w es valina-citrulina.
120. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 117, donde ^{17}R es $(\text{CH}_2)_5$ o $(\text{CH}_2)_2$.
121. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 117 con la fórmula:

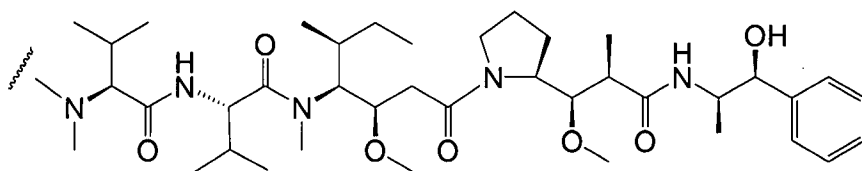


- 15 122. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 121, donde ^{17}R es $(\text{CH}_2)_5$ o $(\text{CH}_2)_2$.
123. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 117 con la fórmula:



124. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 115, donde L es SMCC, SPP o BMPEO.
125. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 115, donde D es MMAE con la estructura:

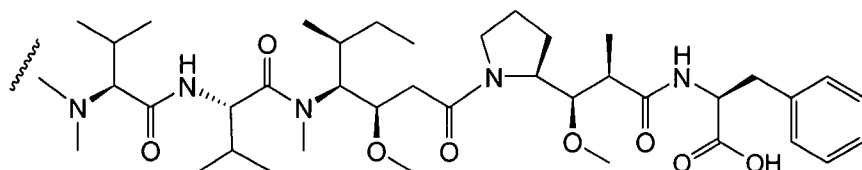
5



donde la línea ondulada indica el sitio de unión al enlazador L.

126. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 115, donde D es MMAF con la estructura:

10



donde la línea ondulada indica el sitio de unión al enlazador L.

127. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 114, donde el anticuerpo anti-STEAP-1 parental se selecciona a partir de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, y un anticuerpo humanizado.

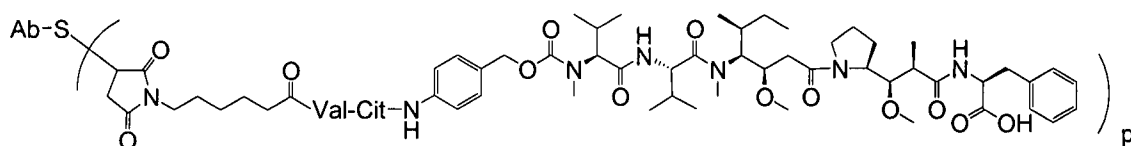
15

128. El compuesto del conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 114, en el que el anticuerpo parental STEAP-1 es un fragmento de anticuerpo.

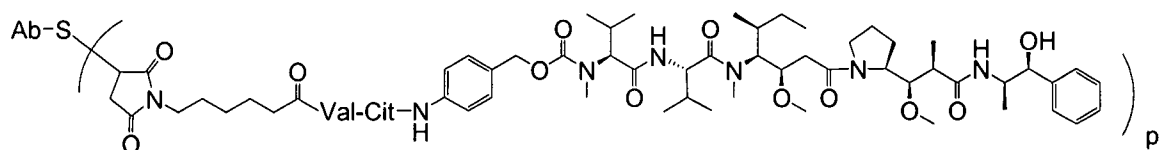
129. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 128, donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab.

130. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos seleccionado de las estructuras:

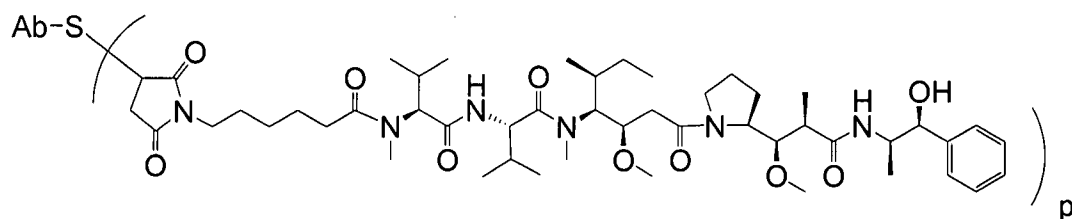
20



Ab-MC-vc-PAB-MMAF

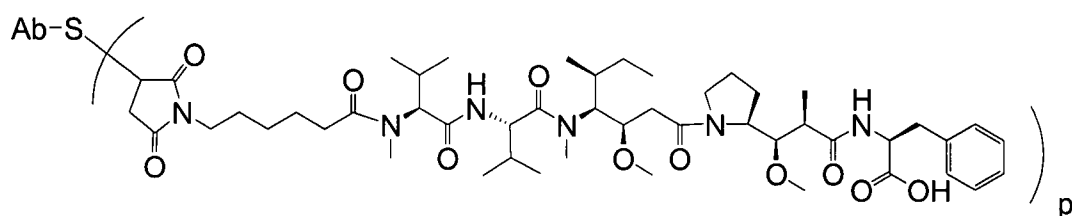


Ab-MC-vc-PAB-MMAE



5 Ab-MC-MMAE

and



Ab-MC-MMAF

10

donde Val es valina; Cit es citrulina; p es 1, 2, 3 ó 4; y Ab es un anticuerpo anti-STEAP-1 diseñado con cisteína de la reivindicación 93.

131. El conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 114, donde la auristatina es MMAE o MMAF.

15 132. El conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 115, L es MC-val-cit-PAB o MC.

133. El conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 115, donde L es SMCC, SPP, or BMPEO.

134. Un ensayo para la detección de células cancerosas que comprenden:

(a) las células de exposición a un compuesto conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 114; y

(b) la determinación del alcance de la unión del compuesto del conjugado de fármaco y anticuerpo a las células.

135. El ensayo de la reivindicación 134, donde las células son células tumorales del sarcoma de próstata, de pulmón, de colon, de vejiga, de ovario o de Ewing.
- 5 136. Un método de inhibición de la proliferación celular que comprende el tratamiento de células tumorales de mamíferos en un medio de cultivo celular con un compuesto conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 114, mediante el cual se inhibe la proliferación de las células tumorales.
137. El método de la reivindicación 136, donde las células tumorales mamíferas son células tumorales del sarcoma de próstata, de pulmón, de colon, de vejiga, de ovario o de Ewing.
- 10 138. Una formulación farmacéutica que comprende el conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 114, y un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
139. La formulación farmacéutica de la reivindicación 138, que comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico seleccionado entre letrozol, oxaliplatina, doxetaxel, 5-FU, lapatinib, capecitabina, leucovorina y gemcitabina.
- 15 140. Un método para el tratamiento del cáncer que comprende la administración a un paciente de la formulación farmacéutica de la reivindicación 138.
141. El método de la reivindicación 140, donde el cáncer es seleccionado a partir del grupo compuesto por el cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer de ovario y sarcoma de Ewing.
- 20 142. El método de la reivindicación 140, donde se administra al paciente un agente quimioterapéutico en combinación con el compuesto conjugado de fármaco y anticuerpo, donde el agente quimioterapéutico se selecciona entre letrozol, displatina, carboplatina, taxol, paditaxel, oxaliplatina, doxetaxel, 5-FU, leucovorina, lapatinib y gemcitabina.
- 25 143. Un artículo fabricado que contiene la formulación farmacéutica de la reivindicación 138; un envase contenedor; y un prospecto o etiqueta donde se indica que el compuesto puede usarse para tratar el cáncer caracterizado por la sobreexpresión de un polipéptido STEAP-1.
- 30 144. El artículo fabricado de la reivindicación 143, donde el cáncer es un cáncer de próstata, un cáncer de pulmón, un cáncer de colon, un cáncer de vejiga, un cáncer de ovario o un sarcoma de Ewing.
145. Un método para la producción de un compuesto conjugado de fármaco y anticuerpo que comprende un anticuerpo (Ab) anti-STEAP-1 diseñado con cisteína de la reivindicación 1, y una fracción del fármaco auristatina (D) donde el anticuerpo diseñado con cisteína está unido a D a

través de uno o más aminoácidos diseñados con cisteína por una fracción ligando (L); el compuesto tiene la fórmula I:



donde p es 1, 2, 3 ó 4; el método comprende los pasos de:

- 5 (a) reacción de un grupo diseñado con cisteína del anticuerpo diseñado con cisteína con un reactivo de enlace para formar un conjugado intermedio anticuerpo-ligando AB-L; y
- (b) la reacción de Ab-L con una fracción de fármaco activada D, mediante lo cual se forma el conjugado de fármaco y anticuerpo;
- o que comprende los pasos de:
- 10 (c) reacción de un grupo nucleofílico de una fracción de fármaco con un reactivo ligando para formar un conjugado intermedio fármaco-ligando D-L; y
- (d) la reacción de D-L con un grupo diseñado con cisteína del anticuerpo diseñado con cisteína, donde se forma el conjugado de fármaco y anticuerpo.
146. El método de la reivindicación 145 comprende además el paso de la expresión del anticuerpo diseñado con cisteína en las células de ovario de hámster chino (CHO).
- 15 147. El método de la reivindicación 146 comprende además el paso de tratamiento del anticuerpo diseñado con cisteína expresado con un agente reductor.
148. El método de la reivindicación 147, donde el agente reductor se selecciona de TCEP y DTT.
149. El método de la reivindicación 147 comprende además el paso de tratamiento del anticuerpo diseñado con cisteína expresado con un agente oxidante después del tratamiento con un agente reductor.
- 20 150. El método de la reivindicación 149, donde el agente oxidante se selecciona entre sulfato de cobre, ácido dehidroascórbico y aire.
151. Un anticuerpo que se une a STEAP-1, donde el anticuerpo comprende (a) una HVR-L1 que contiene una secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 11, y (b) al menos una, dos, tres, cuatro o cinco HVR seleccionadas entre:
- 25 (1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 14;
- (2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 15;
- (3) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 16;
- 30 (4) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 12; y
- (5) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N° 13;
152. El anticuerpo de la reclamación 151, en el que el anticuerpo contenga, además, una cisteína en una o más posiciones seleccionadas a partir de 15, 43, 110, 144, 168 y 205 de la cadena ligera de acuerdo con la convención de la numeración de Kabat y 41, 88, 115, 118, 120, 171, 172, 282, 375, y 400 de la cadena pesada según la convención de numeración de EU.
- 35

153. El anticuerpo de la reclamación 152, en el que la cisteína está en la posición 205 de la cadena ligera.
154. El anticuerpo de la reclamación 152, en el que la cisteína está en la posición 118 de la cadena pesada.
- 5 155. El anticuerpo de la reclamación 152, en el que la cisteína está en la posición 400 de la cadena pesada.
156. El anticuerpo de la reclamación 152, en el que el anticuerpo se selecciona de un anticuerpo monoclonal, anticuerpo biespecífico, anticuerpo quimérico, anticuerpo humano, y un anticuerpo humanizado.
- 10 157. El anticuerpo de la reclamación 152 en el que es un fragmento de anticuerpo.
158. El anticuerpo de la reclamación 157 en el que el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab.
159. El anticuerpo de la reclamación 152 en el que es seleccionado a partir de un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.
160. El anticuerpo de la reclamación 152 en el que se produce en bacteria
- 15 161. El anticuerpo de la reclamación 152 en el que se produce en células CHO.
162. Un método para determinar la presencia de una proteína STEAP-1 en una muestra que se cree que contiene dicha proteína, comprendiendo ese método la exposición de la muestra mencionada a un anticuerpo de la reivindicación 152 y la determinación de la unión de dicho anticuerpo a dicha proteína STEAP-1 en dicha muestra, donde la unión al anticuerpo a dicha proteína es indicativa de la presencia de dicha proteína en dicha muestra.
- 20 163. El método de la Reivindicación 162, donde dicha muestra contiene una célula de la cual se sospecha que expresa dicha proteína STEAP-1.
164. El método de la Reivindicación 162, donde dicha célula es una célula B.
165. El método de la reivindicación 162, donde el anticuerpo se enlaza de manera covalente a una etiqueta seleccionada entre un tinte fluorescente, un radioisótopo, biotina, o un ligando de formación de complejos de metal.
- 25 166. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-STEAP-1 de la reivindicación 152, y un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
167. El anticuerpo de la reivindicación 152, donde el anticuerpo se enlaza de manera covalente a una auristatina o a una fracción de fármaco maitansinoide a partir de lo cual se forma un conjugado de fármaco y anticuerpo.
- 30 168. El conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 167, que comprende un anticuerpo (Ab), una fracción de fármaco auristatina o maitansinoide (D), donde el anticuerpo diseñado con cisteína

se une a D a través de uno o más aminoácidos de cisteína libre mediante una fracción de ligando; el compuesto tiene la Fórmula I:



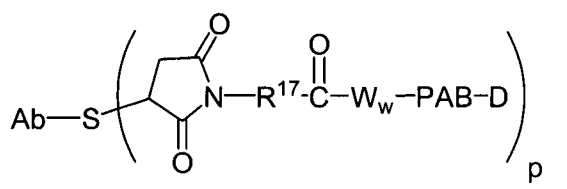
Donde p es 1, 2, 3 ó 4.

- 5 169. El compuesto del conjugado de fármaco y anticuerpo de reivindicación 167 donde p es 2.
170. El compuesto del conjugado de fármaco y anticuerpo de reivindicación 167 donde L tiene la fórmula:



- 10 A es una unidad Stretcher enlazada de manera covalente a un tiol cisteína del anticuerpo diseñado con cisteína (Ab);
a es 0 ó 1;
cada W es independientemente una unidad de aminoácido;
W es un entero comprendido entre 0 y 12;
Y es una unidad Spacer enlazada de manera covalente a la fracción de fármaco; y
15 y es 0, 1 ó 2.

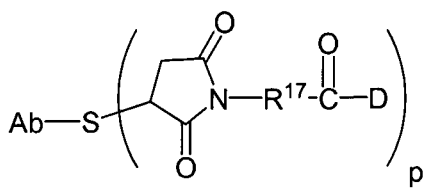
171. El compuesto del conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 170 tiene la fórmula:



- 20 donde PAB es para-aminobenzilcarbamoil y R¹⁷ es un radical divalente seleccionado de (CH₂)_r, C₃-C₈ carbocyclyl, O-(CH₂)_r, arylene, (CH₂)_r-arylene, -arylene-(CH₂)_r-, (CH₂)_r-(C₃-C₈ carbocyclyl), (C₃-C₈ carbocyclyl)-(CH₂)_r, C₃-C₈ heterocyclyl, (CH₂)_r-(C₃-C₈ heterocyclyl), -(C₃-C₈ heterocyclyl)-(CH₂)_r-, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-,
-(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-,
-(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, y
25 -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-; donde R^b es H, C₁-C₆ alkyl, phenyl, o benzyl; y r es independientemente un número entero que oscila de 1 a 10.

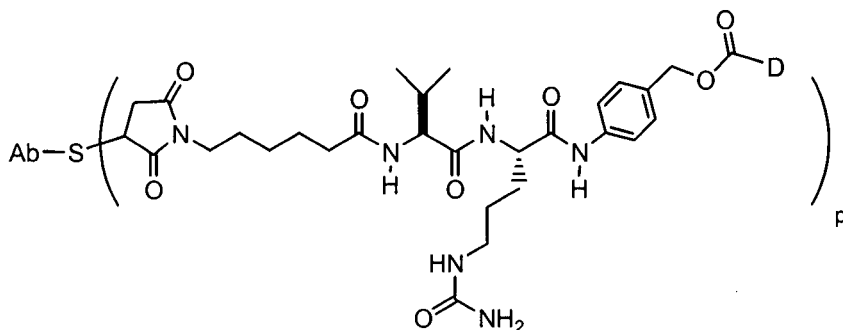
172. El compuesto del conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 170, donde W_w es valina-citrulina.
173. El compuesto del conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 170, donde R¹⁷ es
30 (CH₂)₅ ó (CH₂)₂.

174. El compuesto del conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 170 tiene la fórmula:



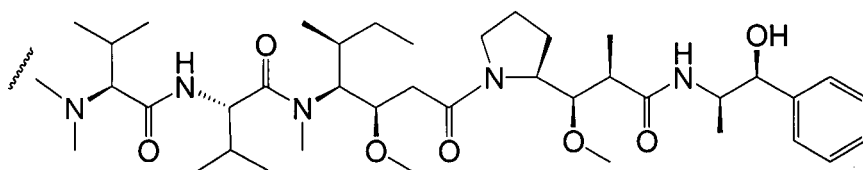
175. El compuesto del conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 174, donde R¹⁷ es (CH₂)₅ o (CH₂)₂.

5 176. El compuesto del conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 170 tiene la fórmula:



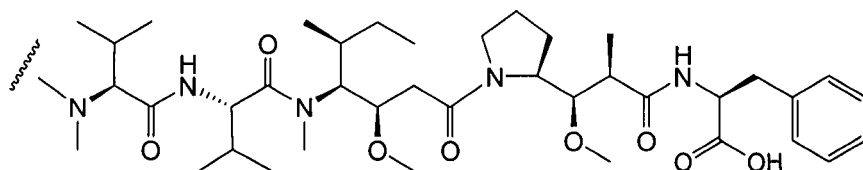
177. El compuesto del conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 168 en el que L es SMCC, SPP o BMPEO.

178. El compuesto del conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 168 en el que D es MMAE, teniendo la estructura:



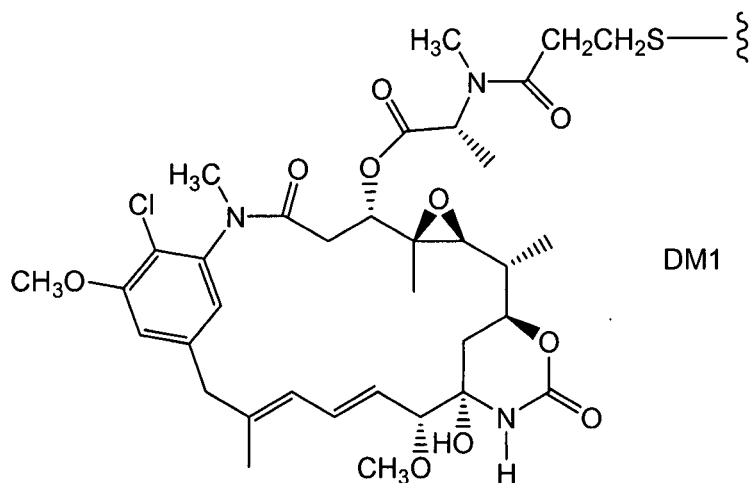
en el que la línea ondulada indica el sitio de unión al ligando L.

179. El compuesto del conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 168 en el que D es MMAF, teniendo la estructura:



en el que la línea ondulada indica el sitio de unión al ligando L.

180. El compuesto del conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 168 en el que D es DM1, teniendo la estructura:



en el que la línea ondulada indica el sitio de unión al ligando L.

181. El compuesto del conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 167, donde el anticuerpo anti-STEAP-1 progenitor se selecciona entre un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo

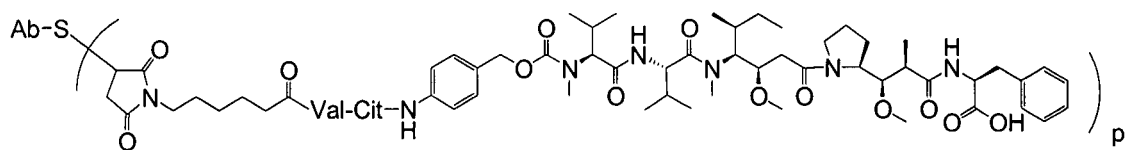
5

biespecífico, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado y un fragmento de anticuerpo.

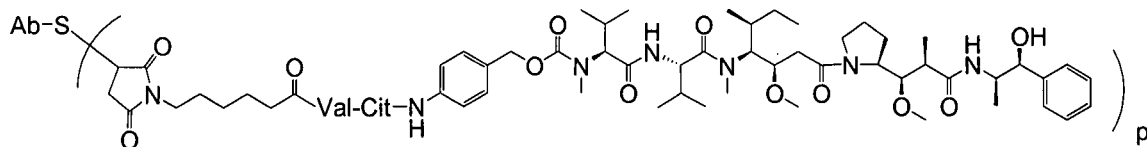
182. El compuesto del conjugado de fármaco y anticuerpo de la reivindicación 167, donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab.

183. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos seleccionado de las estructuras:

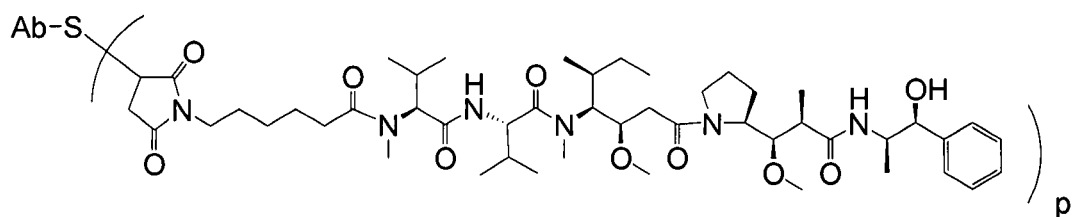
10



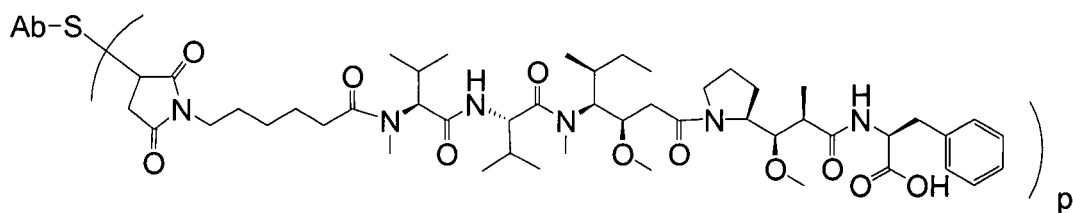
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



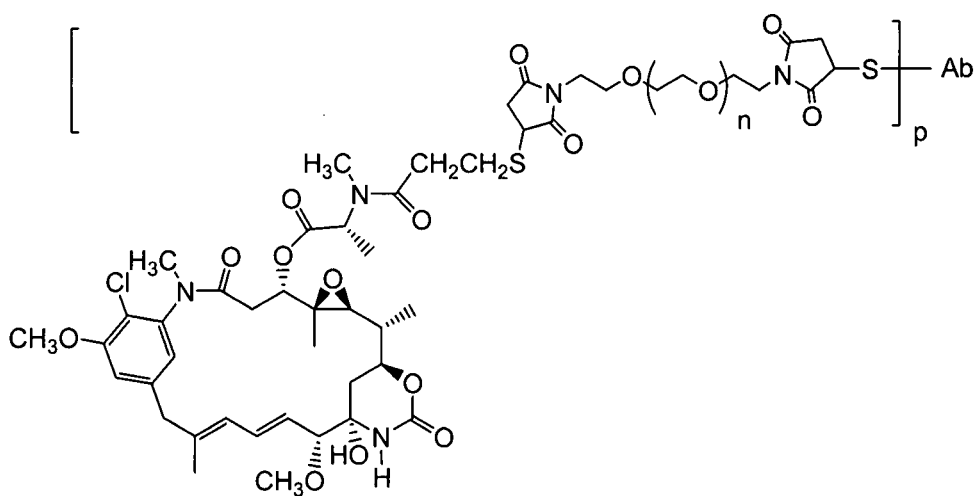
15 Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



5 Ab-MC-MMAF



Ab-BMPEO-DM1

donde Val es valina, Cit es citrulina, p es 1, 2, 3 ó 4 y Ab es anticuerpo anti-STEAP-1 de la reivindicación 186.

- 10 184. El conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 167, donde la auristatina es MMAE o MMAF.
185. El conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 168, donde L es MC-val-cit-PAB o MC.
186. Un ensayo para detectar las células B que comprende:

exponer las células a un compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 165, y

determinar el grado de unión del compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos a la células.

187. Un método para inhibir la proliferación celular que comprende tratar las células B cancerosas de mamíferos en un medio de cultivo celular con un compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 167, donde se inhibe la proliferación de las células B cancerosas.

188. Una formulación farmacéutica que comprende un conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 167, y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

189. Un método para tratar el cáncer que comprende la administración a un paciente de una formulación farmacéutica de la reivindicación 188.

190. El método de la reivindicación 189, en el que el cáncer se selecciona a partir del grupo que comprende los linfoma, linfoma no Hodgkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

191. El método de la reivindicación 189, donde se administra al paciente un agente citotóxico en combinación con un compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos.

192. Un artículo fabricado que comprende una formulación farmacéutica de la reivindicación 186, un envase y un prospecto o etiqueta que indica que el compuesto puede utilizarse para tratar el cáncer caracterizado por la sobreexpresión de un polipéptido STEAP-1.

193. El elemento de fabricación de la reivindicación 192, en el que el cáncer se selecciona a partir del grupo que comprende el cáncer de próstata, pulmón, colon, vejiga, ovario y sarcoma de Ewing.

194. El método para fabricar un compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos que comprenda un anticuerpo anti-STEAP-1 (Ab) de la reivindicación 152, y una fracción del fármaco auristatina o maitansinoide (D) en la que el anticuerpo se une por medio de uno o más aminoácidos diseñados con cisteína y de una porción de enlazador (L) a D, el compuesto que posee Fórmula I.

$Ab-(L-D)_p$

I

donde p es 1, 2, 3 ó 4; el método comprende los pasos para que:

(a) un grupo de anticuerpos diseñados con cisteína reaccione con un reactivo enlazador para formar un anticuerpo enlazador intermedio Ab-L, y

- (b) Ab-L reaccione con una fracción de fármaco D activada, donde se forma el conjugado de anticuerpo con fármacos,
- o comprende los pasos para que:
- (c) un grupo nucleofílico de una fracción de fármaco reaccione con un reactivo enlazador para formar un enlazador a fármacos intermedio D-L, y
- (d) D-L reaccione con un grupo de anticuerpos diseñados con cisteína, donde se forma el conjugado de anticuerpo con fármacos.
- 5 195. El método de la reivindicación 194 comprende, además, el paso para expresar el anticuerpo en células de ovario de hámster chino (CHO).
- 10 196. El método de la reivindicación 195 también comprende el paso para tratar el anticuerpo expresado con un agente reductor.
197. El método de la reivindicación 196, donde el agente reductor se selecciona a partir de TCEP y DTT.
- 15 198. El método de la reivindicación 196 también comprende el paso para tratar el anticuerpo expresado con un agente oxidante, después de tratarlo con un agente reductor.
199. El método de la reivindicación 198, donde el agente oxidante se selecciona a partir de un sulfato de cobre, un ácido dehidroascórbico y del aire.
200. El anticuerpo de la reivindicación 152, donde el anticuerpo comprende una secuencia de la cadena pesada seleccionada a partir de cualquiera de los identificadores de secuencia n.ºs.: 9 ó 10.
- 20 201. El anticuerpo de la reivindicación 152, donde el anticuerpo comprende una secuencia de la cadena ligera del identificador de secuencia n.º: 6.
202. El anticuerpo de la reivindicación 152, donde el anticuerpo comprende una secuencia de la cadena ligera de identificador de secuencia n.º: 6 y una secuencia de la cadena pesada de identificador de secuencia n.º: 9.
- 25 203. El anticuerpo de la reivindicación 152, donde el anticuerpo comprende una secuencia de la cadena ligera de identificador de secuencia n.º: 6 y una secuencia de la cadena pesada de identificador de secuencia n.º: 10.
204. Un anticuerpo que se enlaza a STEAP-1, caracterizado porque el anticuerpo comprende una región de cadena ligera seleccionada de:
- 30 (1) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:90;

- (2) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:91;
- (3) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:92;
- 5 (4) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:93;
- (5) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:94;
- 10 (6) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:95;
- (7) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:96;
- (8) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:97;
- 15 (9) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:98;
- (10) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:99;
- (11) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:100; y
- 20 (12) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:101.
205. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 204, caracterizado porque el anticuerpo es humanizado.
- 25 206. Un polinucleótido que codifica una región de cadena ligera, caracterizado porque se selecciona de:
- (1) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:90;
- (2) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:91;
- 30 (3) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:92;
- (4) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:93;

- (5) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:94;
- (6) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:95;
- 5 (7) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:96;
- (8) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:97;
- 10 (9) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:98;
- (10) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:99;
- (11) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:100; y
- 15 (12) una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:101.

207. Un vector, caracterizado porque comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 206.

20 208. Una célula hospedera, caracterizada porque comprende el vector de conformidad con la reivindicación 207.

209. La célula hospedera de conformidad con la reivindicación 208, caracterizada porque la célula hospedera es una célula bacteriana, de levadura, insecto o eucariótica.

210. La célula hospedera de conformidad con la reivindicación 209, caracterizada porque la célula hospedera es una célula CHO.

25 211. Un método para elaborar un anticuerpo anti-STEAP-1, caracterizado porque el método comprende, a) cultivar la célula hospedera de conformidad con la reivindicación 208, bajo condiciones adecuadas para expresión del polinucleótido de conformidad con el anticuerpo, y b), aislar el anticuerpo.

212. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 204, caracterizado porque el STEAP-1 es expresado en la superficie de una célula.

30 213. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 212, caracterizado porque la célula es una célula

de próstata, pulmón, colon, vejiga o célula de ovario, o una célula de sarcoma Ewing.

214. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 213, caracterizado porque la célula está asociada con un trastorno proliferativo.

215. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 214, caracterizado porque el trastorno es cáncer.

5 216. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 215, caracterizado porque el cáncer es metástasis.

217. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 204, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

218. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 217, caracterizado porque el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado del fragmento Fab, Fa'b-SH, Fv, scFV o (Fab')₂.

10 219. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 218, caracterizado porque el anticuerpo es humanizado.

220. Un método para detectar la presencia de STEAP-1 en una muestra biológica, caracterizado porque el método comprende, poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo de conformidad con la reivindicación 204, bajo condiciones permisivas para el enlace del anticuerpo a STEAP-1, y detectar si se
15 forma un complejo entre el anticuerpo y STEAP-1.

221. El método de conformidad con la reivindicación 220, caracterizado porque la muestra biológica es de un paciente sospechoso de tener un trastorno proliferativo de células de próstata, pulmón, colon, vejiga, ovario o células de sarcoma Ewing.

20 222. Un inmunoconjugado, caracterizado porque comprende un anticuerpo de conformidad con la reivindicación 204, covalentemente unido a un agente citotóxico.

223. El inmunoconjugado de conformidad con la reivindicación 222, caracterizado porque el agente citotóxico se selecciona de una toxina, un agente quimioterapéutico, una porción de fármaco, un antibiótico, un isótopo radioactivo, y una enzima nucleolítica.

25 224. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende el inmunoconjugado de conformidad con la reivindicación 222 y un portador farmacéuticamente aceptable.

Alineación de las Secuencias de Cadena Ligera

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37							
huKI	D	I	Q	M	I	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	Q							
mul20	D	I	Q	M	I	Q	S	P	S	S	L	A	V	S	V	G	E	K	V	T	M	S	C	K	S	Q	S	Q	S	L	L	Y	R	S	N	Q	K	N	Y	L	A	W	Y	Q
nieto 120	D	I	Q	M	I	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	S	Q	S	Q	S	L	L	Y	R	S	N	Q	K	N	Y	L	A	W	Y	Q
120.v24	D	I	Q	M	I	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	S	Q	S	Q	S	L	L	Y	R	S	N	Q	K	N	Y	L	A	W	Y	Q
				*																																						*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																										*		
																																						</						

Kabat#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
																								</																				

Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO:4)	
huk1	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO:5)	
mar120	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO:6)	
injerto 120	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO:6)	
120.v24	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO:6)	

Figura 2A

Alineación de Secuencias de Cadena Pesada

3/45

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 A 36 37 38 39 40 41

Kabat#

hum III
mu120
injerto 120
120.v24

E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P		
D	V	Q	V	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	G	Q	S	L	S	L	T	C	T	V	T	G	Y	S	I	F	S	D	Y	A	N	N	W	T	R	Q	P	
E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	S	I	F	S	D	Y	A	N	N	W	V	R	Q	A	P	
*																																									

42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 a b c 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

Kabat#

hum III
mu120
injerto 120
120.v24

G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G				D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L		
G	N	K	L	E	W	M	G	V	I	S					N	S	G	S	T	S	Y	N	P	S	L	K	S	R	F	T	I	S	R	D	T	S	K	N	Q	F	E	L		
G	K	G	L	E	W	V	G	V	I	S					N	S	G	S	T	S	Y	N	P	S	L	K	S	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L		
*																																												

81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

Kabat#

hum III
mu120
injerto 120
120.v24

Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	E	R	N	Y	D	Y	D	D	Y	Y	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	7
Q	L	I	S	V	T	T	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	E	R	N	Y	D	Y	D	D	Y	Y	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	8
Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	E	R	N	Y	D	Y	D	D	Y	Y	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	9
Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	E	R	N	Y	D	Y	D	D	Y	Y	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	10
*																																												

SEQ ID NO:

Figura 2B

I	A	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKASG	YTFE	-HL-	WVRQAPGQGLENM	-H2-
	B	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKAS		-H2-	WVRQAPGQGLENM	-H2-
	C	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKAS		-H2-	WVRQAPGQGLENM	-H2-
	D	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKAS		-H2-	WVRQAPGQGLENM	-H2-
II	A	QVQLQESGPGLVKPESQTLSTCTVS	GGSVS	-HL-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-
	B	QVQLQESGPGLVKPESQTLSTCTVS		-H2-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-
	C	QVQLQESGPGLVKPESQTLSTCTVS		-H2-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-
	D	QVQLQESGPGLVKPESQTLSTCTVS		-H2-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-
III	A	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	-HL-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	B	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS	CAAS	-H2-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	C	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS	CAAS	-H2-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	D	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS	CAAS	-H2-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
Aceptor-1						
Aceptor-1	A	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFPNIK	-HL-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	B	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS	CAAS	-H2-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	C	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS	CAAS	-H2-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	D	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS	CAAS	-H2-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
Aceptor-2						
Aceptor-2	A	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFPNIK	-HL-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	B	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS	CAAS	-H2-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	C	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS	CAAS	-H2-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	D	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS	CAAS	-H2-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-

Figura 3A

SEQ. ID NOs:

RVTIITADTSTSTAYMELSSLSRSEDTA VYYCAR -H3- 26, 27, 28, 29
RVTIITADTSTSTAYMELSSLSRSEDTA VYYCAR -H3- 30, 31, 28, 29
RVTIITADTSTSTAYMELSSLSRSEDTA VYYCAR -H3- 30, 31, 32, 29
RVTIITADTSTSTAYMELSSLSRSEDTA VYYC -H3- 30, 31, 33, 29

RVTISVDTSKNQFSLKLSLVTAADTA VYYCAR -H3- 34, 35, 36, 29
RVTISVDTSKNQFSLKLSLVTAADTA VYYCAR -H3- 37, 38, 36, 29
RVTISVDTSKNQFSLKLSLVTAADTA VYYCA -H3- 37, 38, 39, 28
RVTISVDTSKNQFSLKLSLVTAADTA VYYC -H3- 37, 38, 40, 29

RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTA VYYCAR -H3- 41, 42, 43, 29
RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTA VYYCAR -H3- 44, 45, 43, 29
RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTA VYYCA -H3- 44, 45, 46, 28
RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTA VYYC -H3- 44, 45, 47, 29

RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAEDTA VYYCER -H3- 48, 42, 49, 29
RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAEDTA VYYCSER -H3- 44, 45, 49, 29
RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAEDTA VYYCS -H3- 44, 45, 50, 29

RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAEDTA VYYCAR -H3- 48, 42, 51, 29
RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAEDTA VYYCAR -H3- 44, 45, 51, 29
RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAEDTA VYYCA -H3- 44, 45, 52, 29
RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAEDTA VYYC -H3- 44, 45, 53, 29

Figura 3B

kv1 DIQMTQSPSSLSASVEDRVTITC -M-WYQXKPGKAPKLLIY -L2-GVPSRFSGSGGTDFLTITISLQP
kv1 DIQMTQSPSSLSASVEDRVTITC -M-WYQXKPGKAPKLLI -L2-GVPSRFSGSGGTDFLTITISLQP
kv2 DIVMTQSPPLSLPVTFGESASISC -M-WYLQKPGQSPQLLIY -L2-GVPDRFSGSGGTDFLTIKISRVEA
kv3 SIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC -M-WYQXKPGQAPRLLIY -L2-GIPDRFSGSGGTDFLTISRLEK
kv4 DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC -M-WYQXKPGQPPKLLIY -L2-GVPDRFSGSGGTDFLTITISLQA

Figura 4A

EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK	SEQ ID NOs: 54, 55, 56, 57
EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK	SEQ ID NOs: 54, 56, 56, 57
EDVGYYC -L3- FGQGTKVEIK	SEQ ID NOs: 58, 59, 60, 57
EDFAVYYC -L3- FGQGTKVEIK	SEQ ID NOs: 61, 62, 63, 57
EDVAVYYC -L3- FGQGTKVEIK	SEQ ID NOs: 64, 65, 66, 57

Figura 4B

7/45

	230	240	250	260	270
humlgG1	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV				
humlgG2	PAP - PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
humlgG3	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
humlgG4	PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
		****			* *
	280	290	300	310	320
humlgG1	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humlgG2	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
humlgG3	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humlgG4	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
			*	*	*
	330	340	350	360	370
humlgG1	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
				D L	
humlgG2	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humlgG3	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humlgG4	SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
		**	*	*	
	380	390	400	410	420
humlgG1	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH				
humlgG2	EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH				
humlgG3	EWESNGQPENNYMTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH				
humlgG4	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH				
		*	*	*	*
	430	440			
humlgG1	EALHNHYTQKSLSLSPGK		(SEQ ID NO: 85)		
humlgG2	EALHNHYTQKSLSLSPGK		(SEQ ID NO: 86)		
humlgG3	EALHNRYTQKSLSLSPGK		(SEQ ID NO: 87)		
humlgG4	EALHNHYTQKSLSLSPGK		(SEQ ID NO: 88)		
		**	*		

Secuencia de Concenso de una región constante de cadena ligera Kappa

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)

Figura 5

Figura 6C

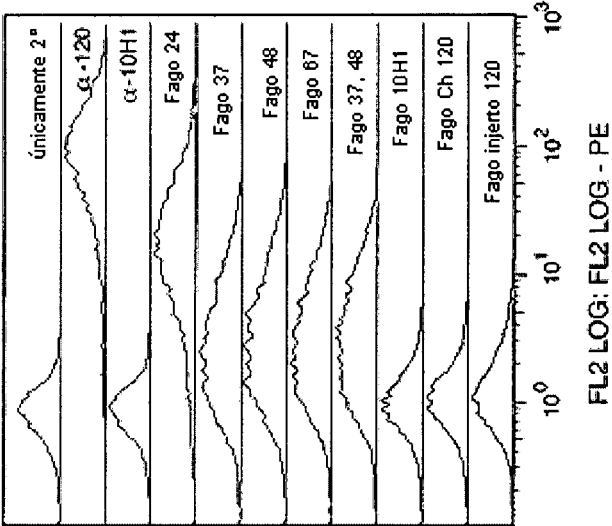


Figura 6A

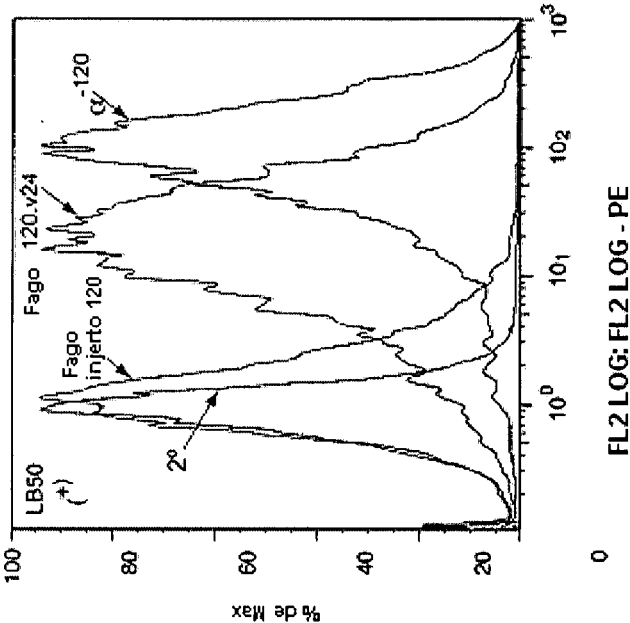


Figura 6D

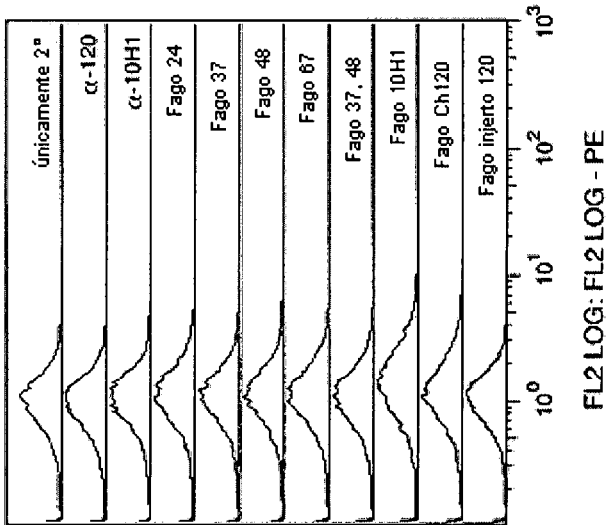
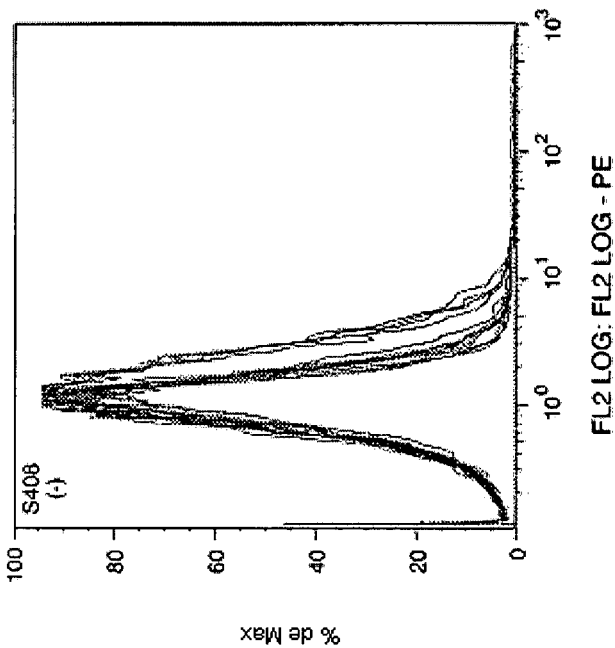


Figura 6B



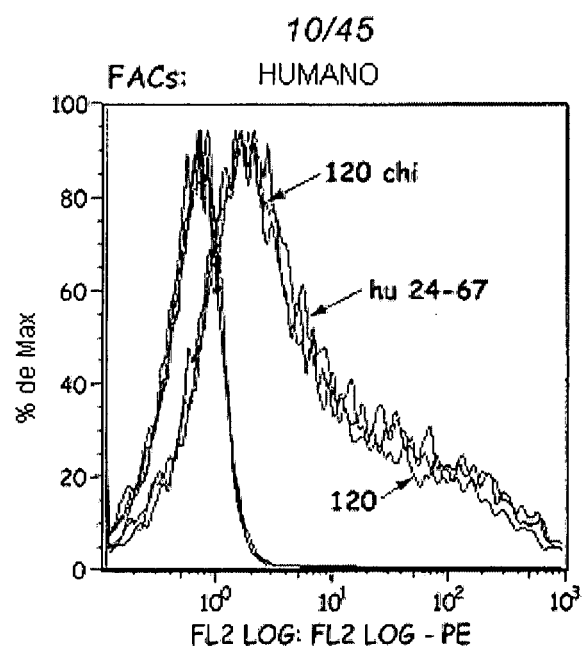


Figura 7A

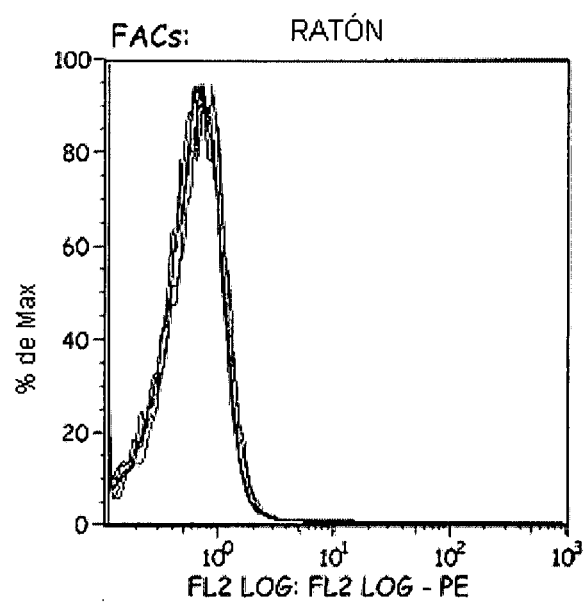


Figura 7B

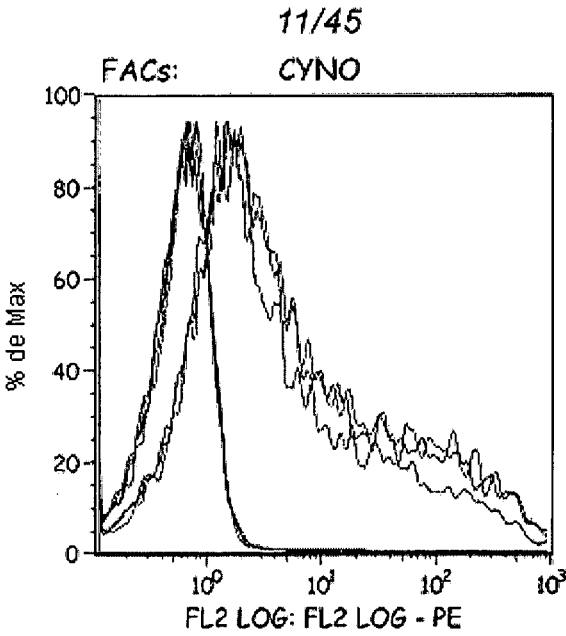


Figura 7C

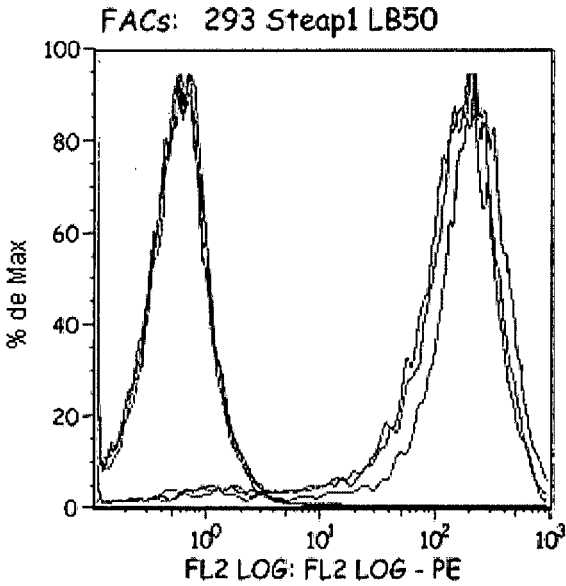


Figura 7D

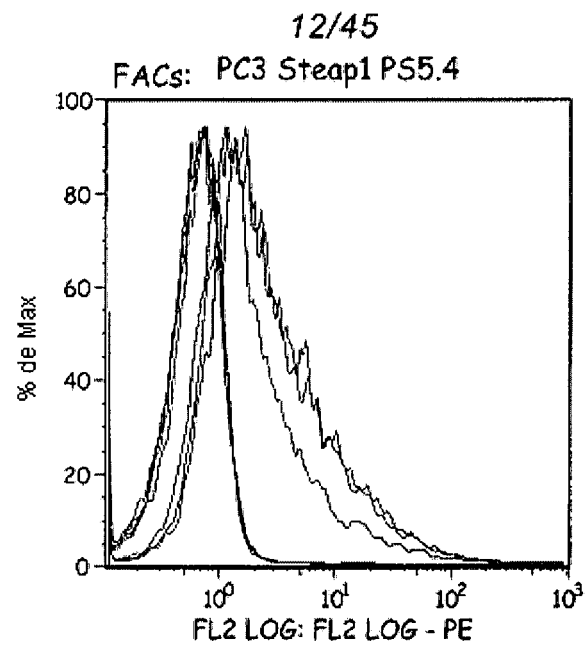


Figura 7E

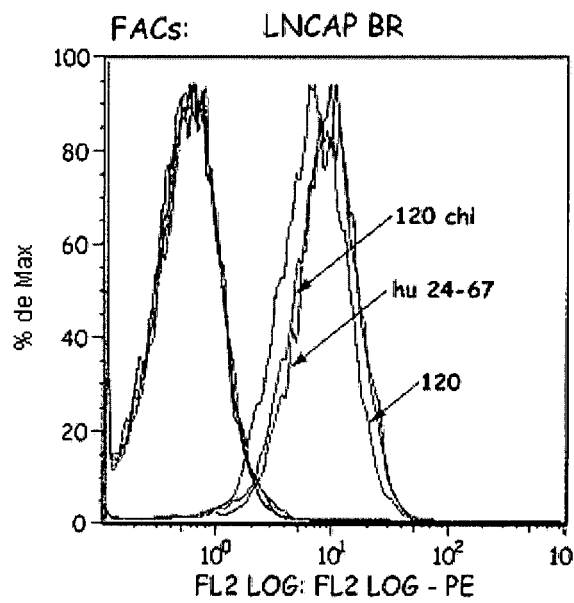


Figura 7F

Figura 8A

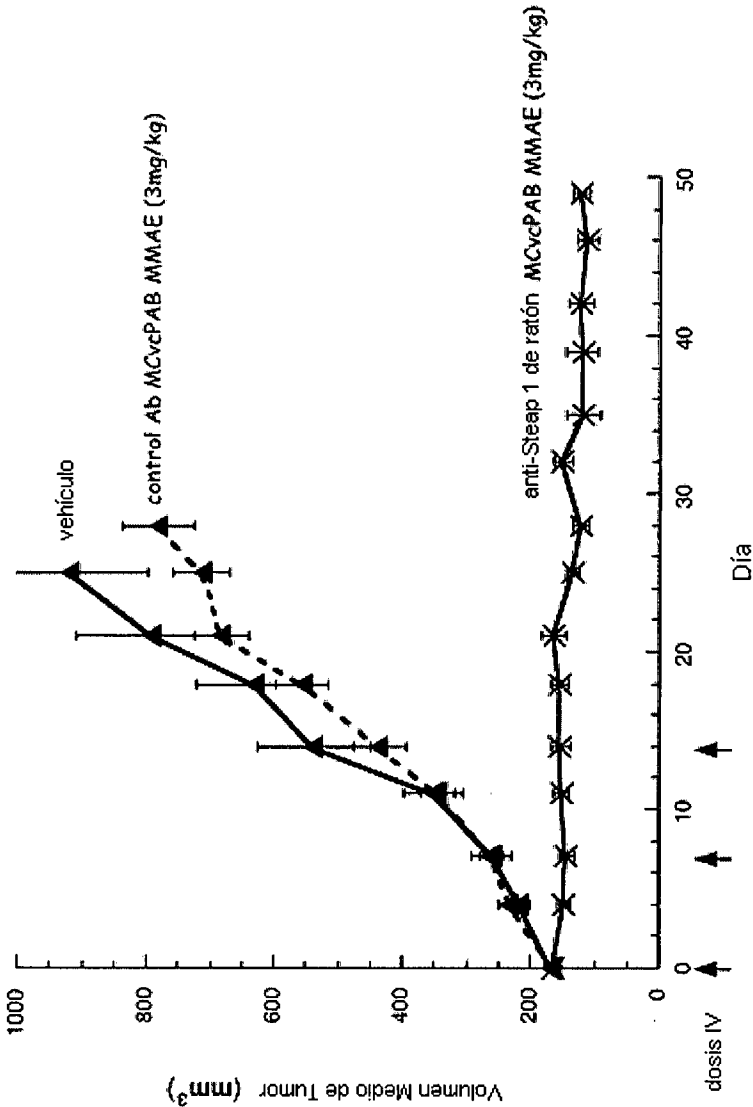


Figura 8B

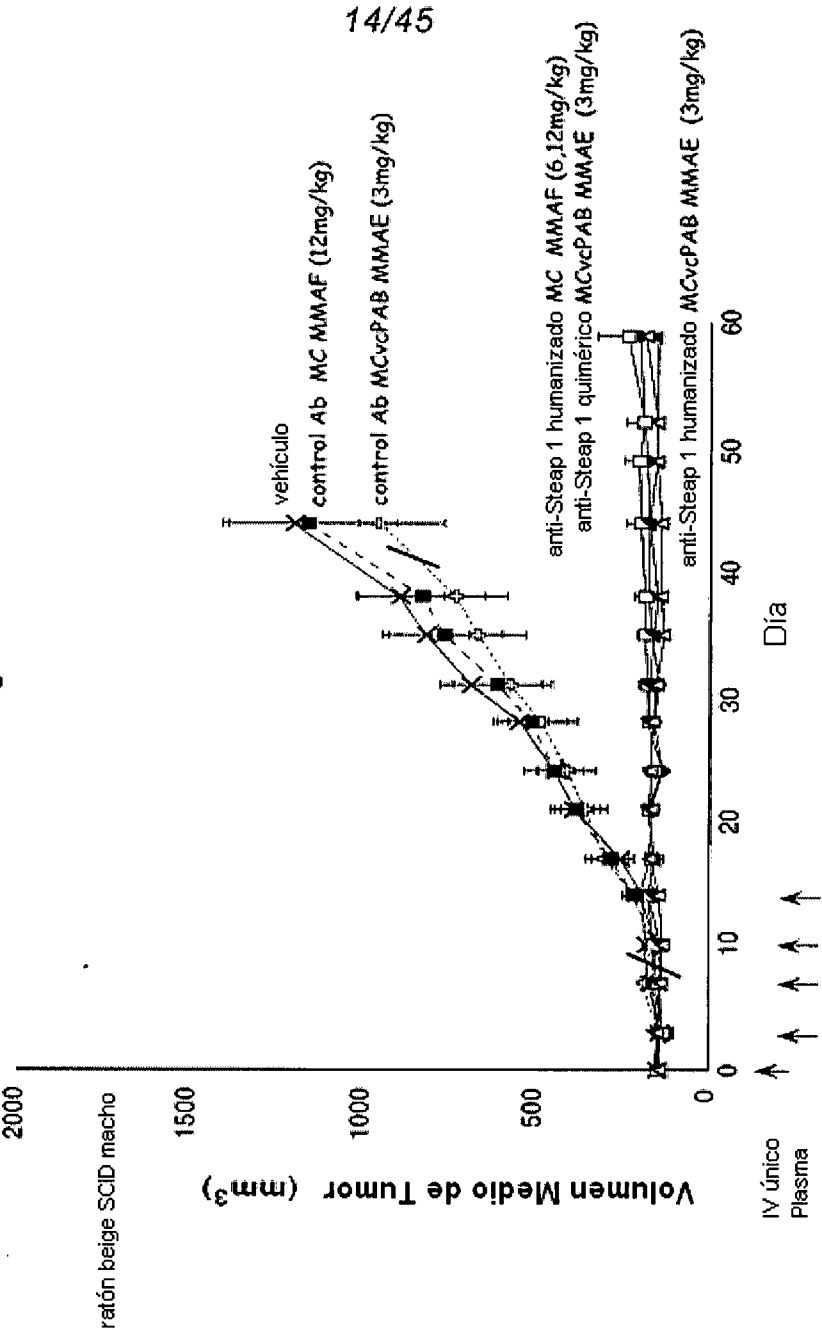
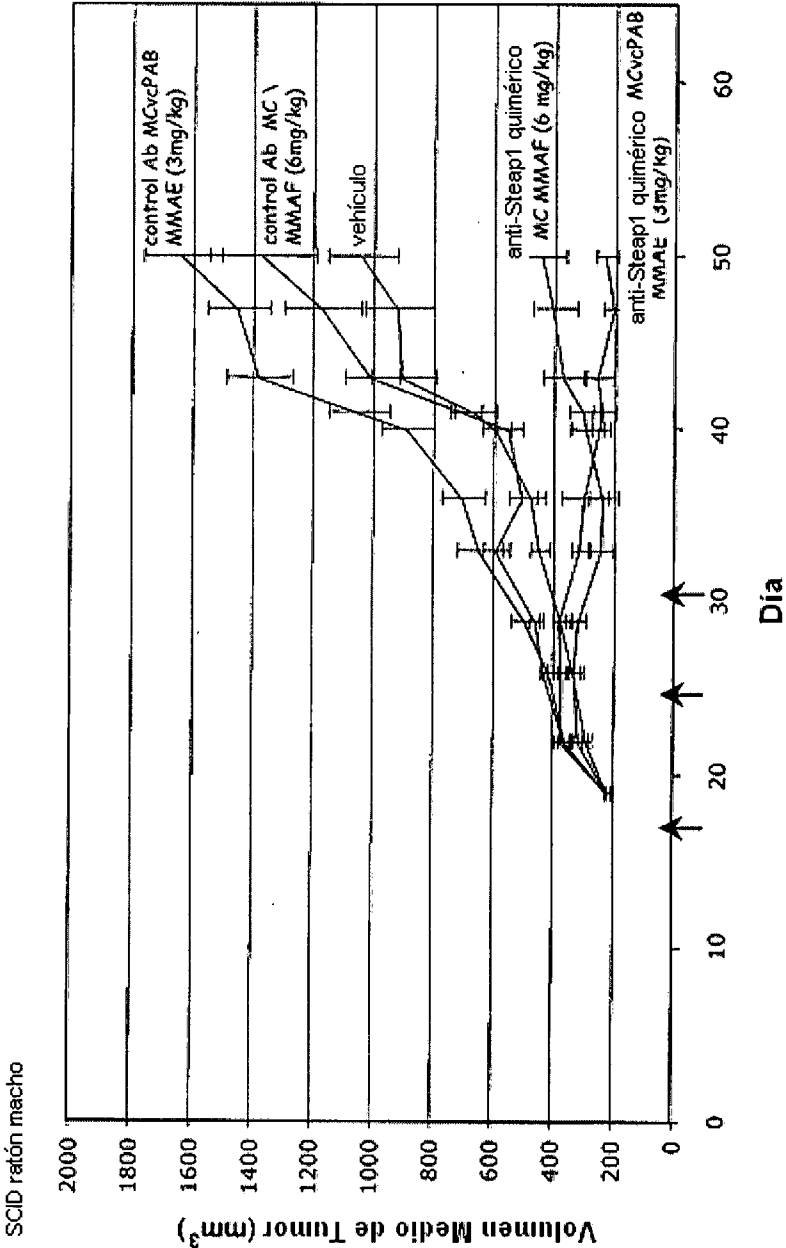
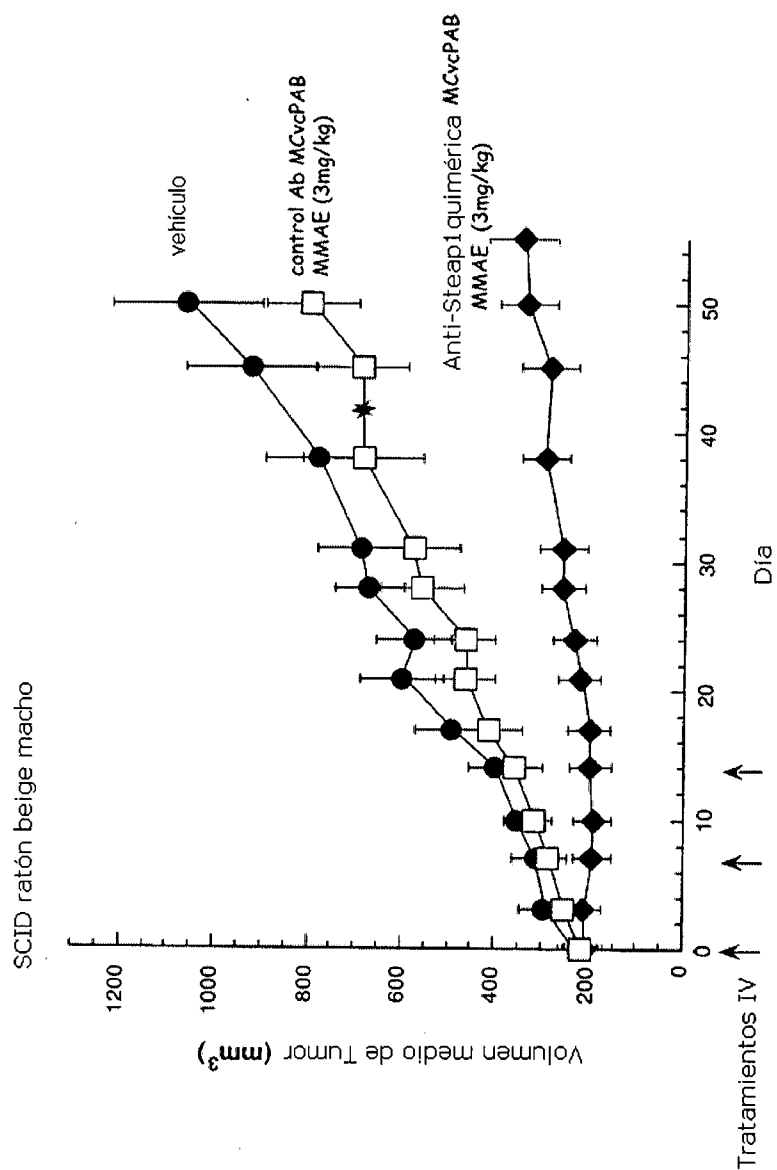


Figura 9



16/45

figura 10



17/45

Figura 11

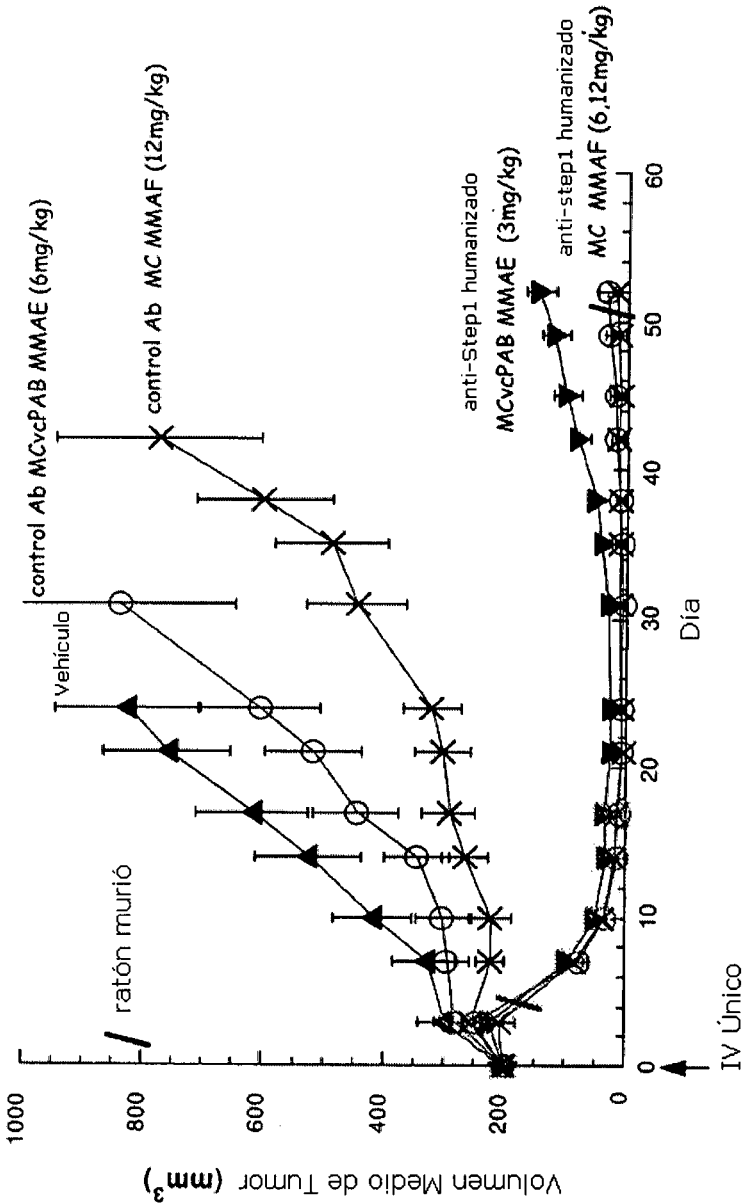


Diagrama Exquemático de STEAP-1 en la Membrana Celular

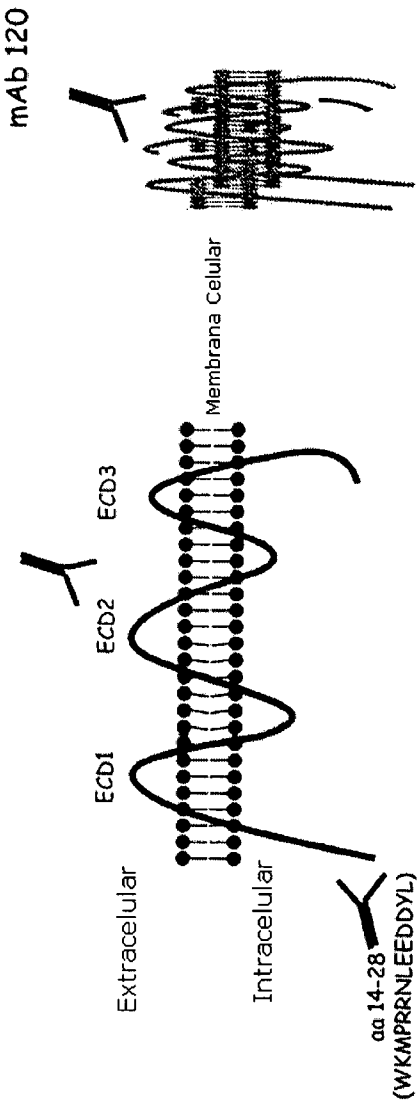
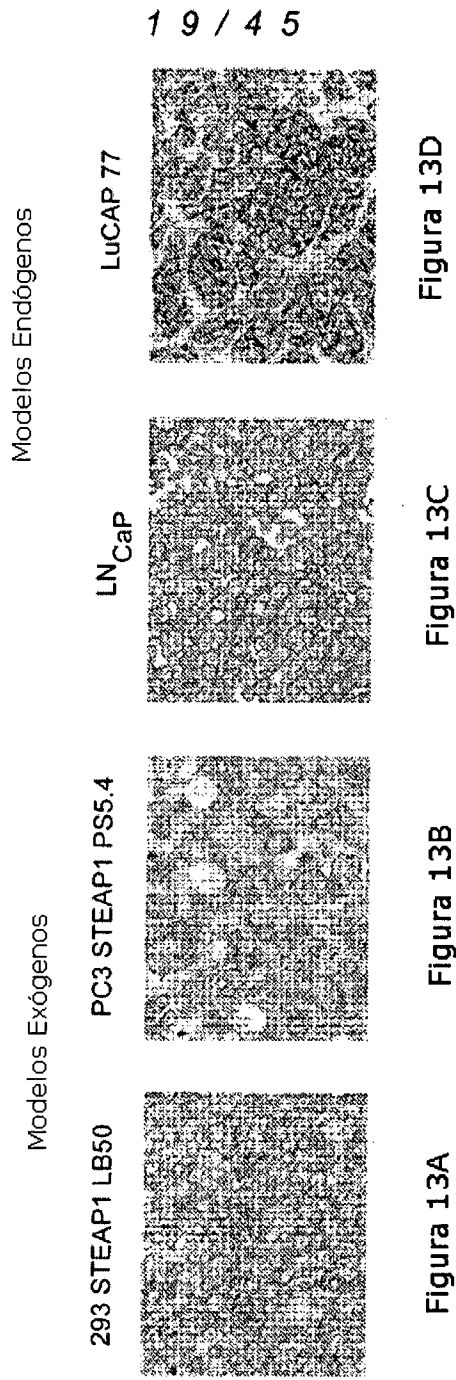


Figura 12

Expresión de STEAP1 en modelos de cáncer de próstata



20/45

Figura 14A

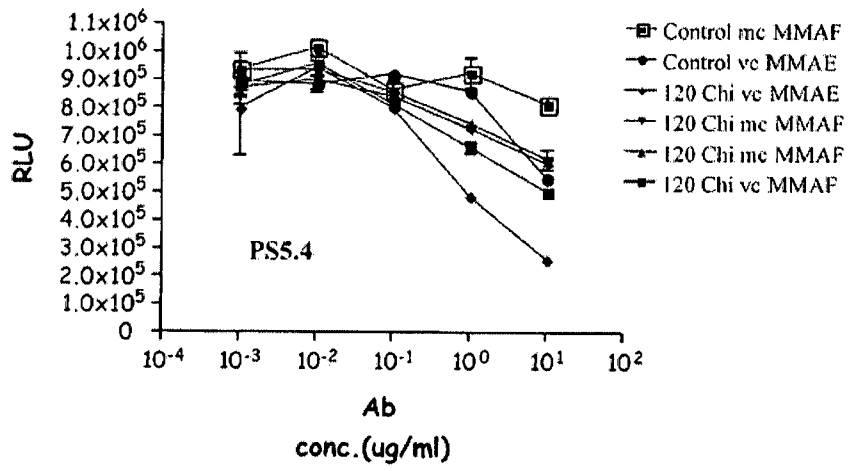
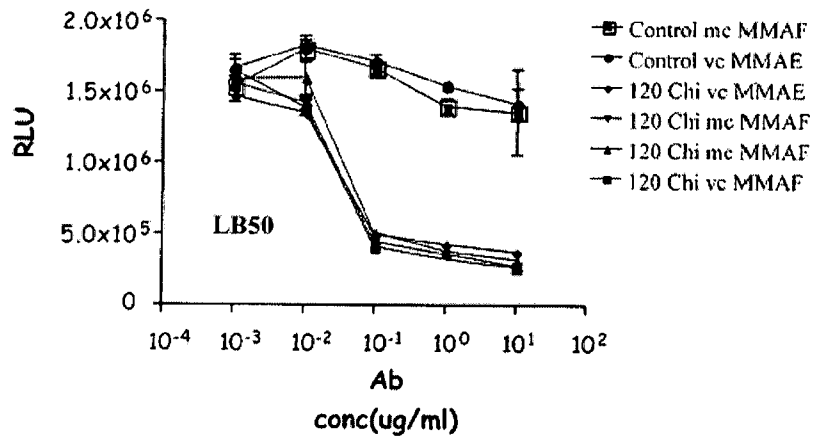


Figura 14B



21/45

Figura 14C

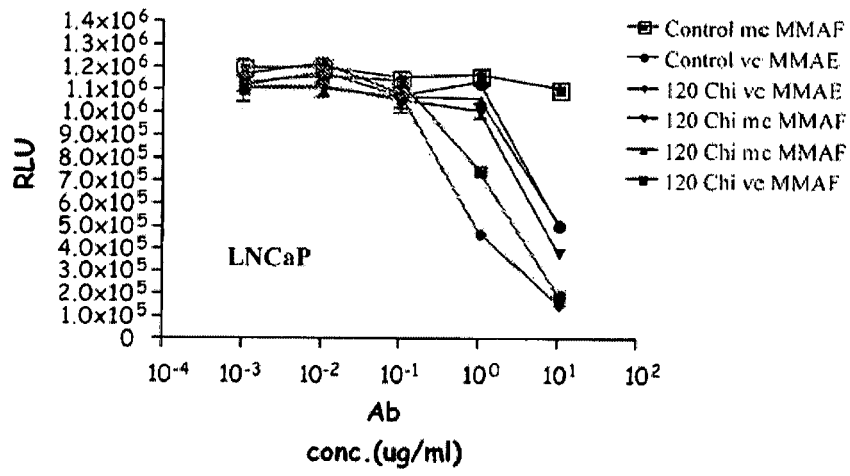
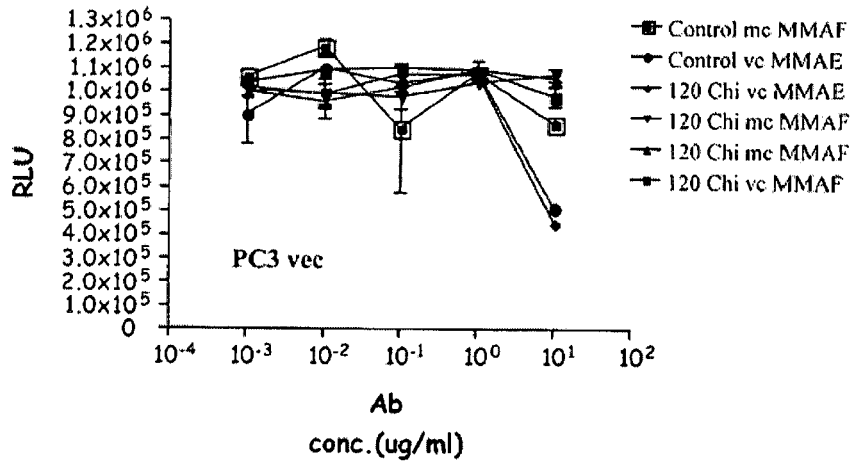
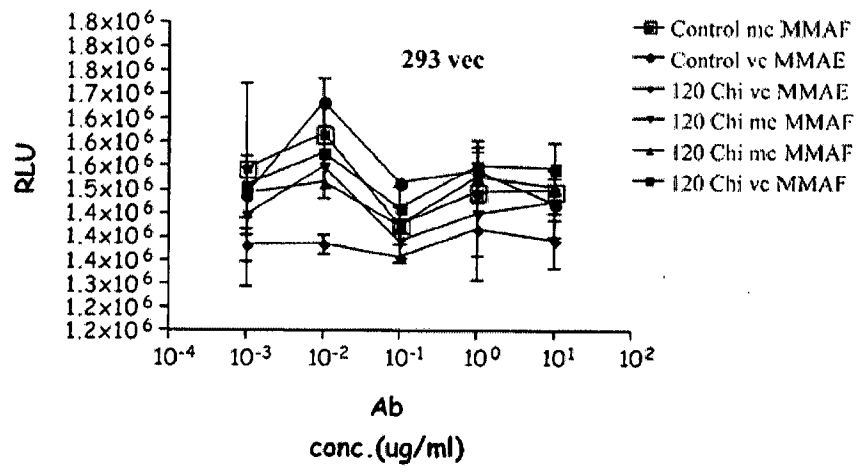


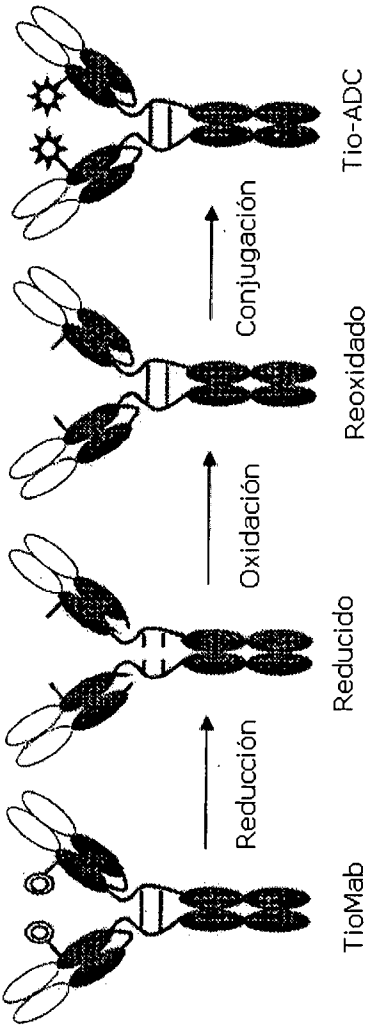
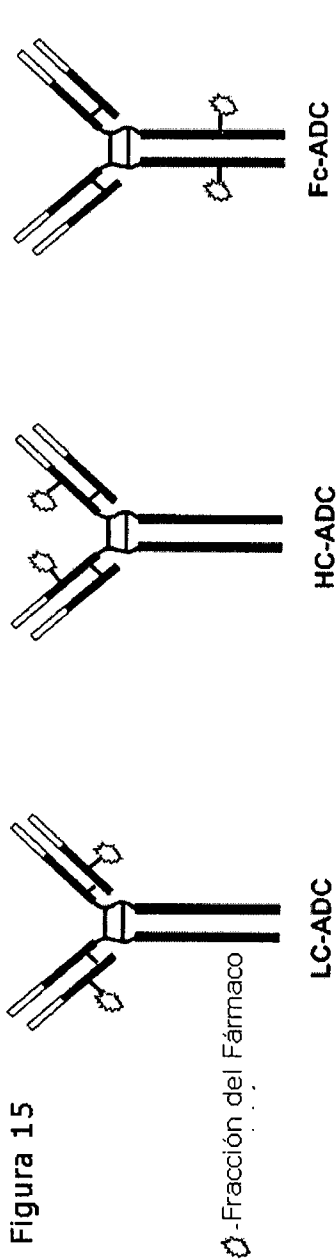
Figura 14D



22/45

Figura 14E





Variante Tio-LC(V205C) con numeración secuencial correspondiente

Numeración Estandarizada >> **LC-V205C** (Numeración Kabat)

Posición Relativa	LC-V210C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	219
	LC-V204C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	213
	LC-V211C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	220
	LC-V205C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	214
	LC-V205C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	214
	LC-V205C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	214
	LC-V210C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	219
	LC-V209C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	218
	LC-V209C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	218
	LC-V205C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	214
STEAP120-LC- V211C		E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	220

Figura 17A

2 5 / 4 5

Variante Tio-HC (A121C) con numeración secuencial correspondiente

Numeración Estandarizada >> **HC-A118C** (Numeración EU)

Posición Relativa	HC-A114C	- - - - - L Y L W G Q G T	L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L	138
	HC-A123C	- - N S Y W Y F D V W G Q G T	L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L	147
	HC-A121C	- - I P R H A N V F W G Q G T	L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L	145
	HC-A117C	- - - W T S G L D Y W G Q G T	L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L	141
	HC-A121C	- - D G F Y A M D Y W G Q G T	L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L	145
	HC-A121C	- - I S I A G M D Y W G Q G T	L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L	145
	HC-A121C	- - S W D W Y F D V W G Q G T	L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L	145
	HC-A124C	- R S H V G Y F D V W G Q G T	L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L	148
	HC-A118C	- - - - - I R L D Y W G Q G T	L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L	142
	HC-A121C	- - R G D Y S M D Y W G Q G T	L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L	145
STEAP120-HC-	A125C	Y D D Y Y Y A M D Y W G Q G T	L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L	149

Figura 17B

Variante Tio-Fc (S400C) con numeración secuencial correspondiente

Numeración Estandarizada >> **Fc-S400C** (Numeración EU)

HC-S396C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	438
HC-S405C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	447
HC-S403C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	445
HC-S399C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	441
HC-S403C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	445
HC-S403C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	445
HC-S403C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	445
HC-S406C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	448
HC-S400C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	442
HC-S403C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	445
STEAP120-HC- S407C	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	449

Figura 17C

27/45

Figura 18A

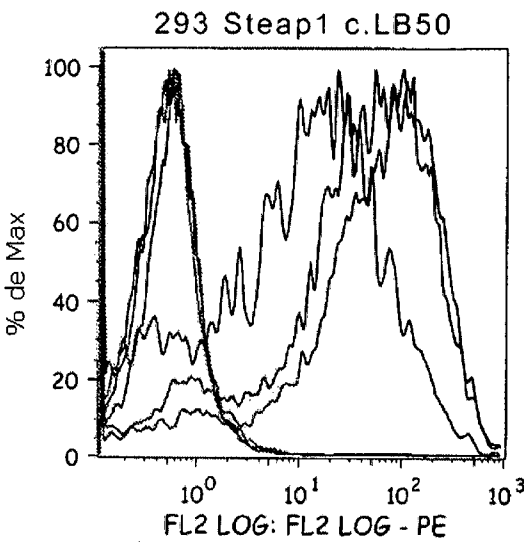
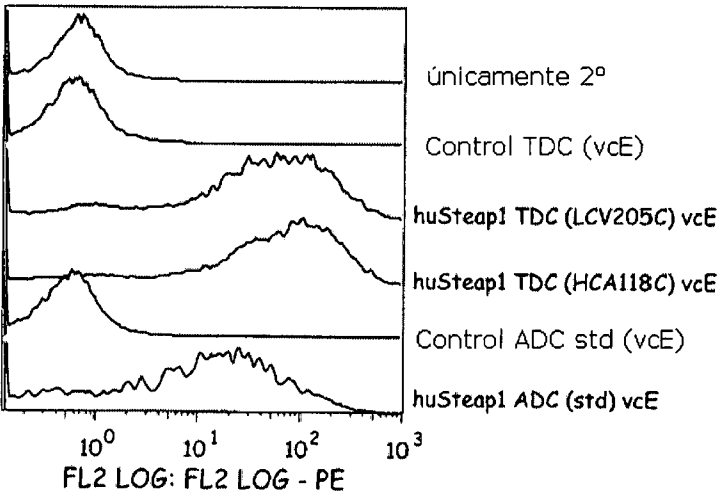


Figura 18D



28/45

Figura 18B
PC3 Steap1 c.PS5.4

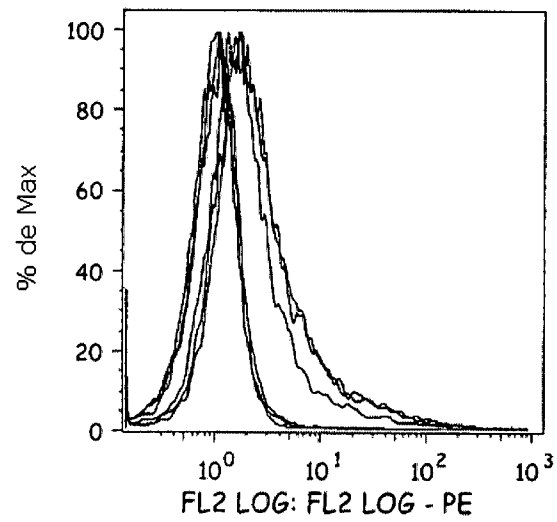
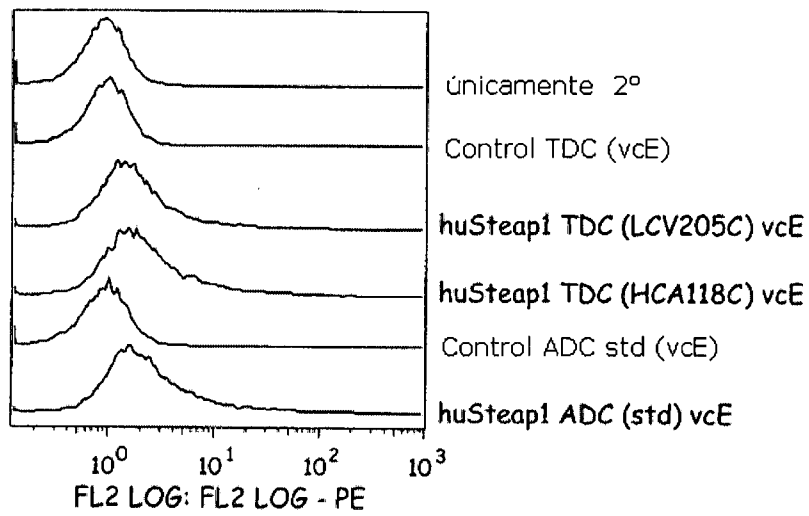


Figura 18E



29/45

Figura 18C

LNCaP

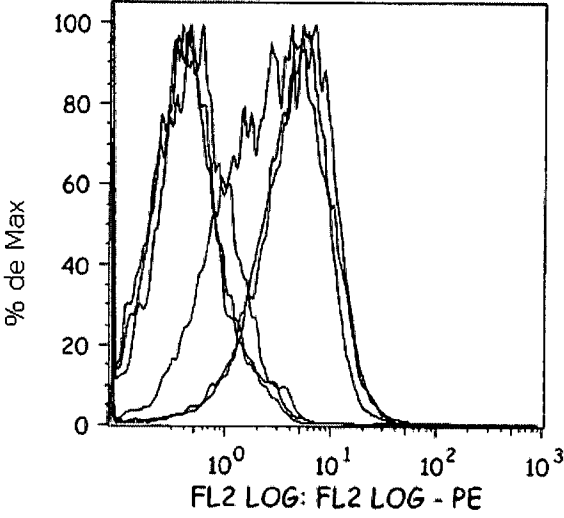
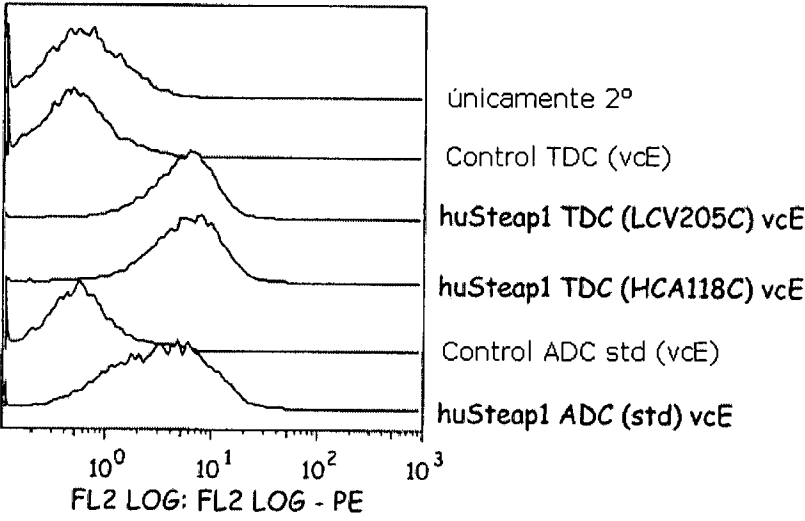


Figura 18F



30/45

Figura 19A

LB50 2K/ pozo

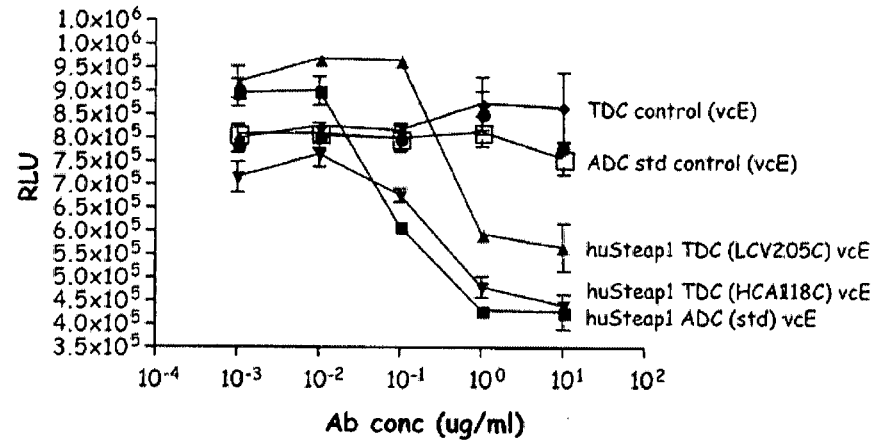
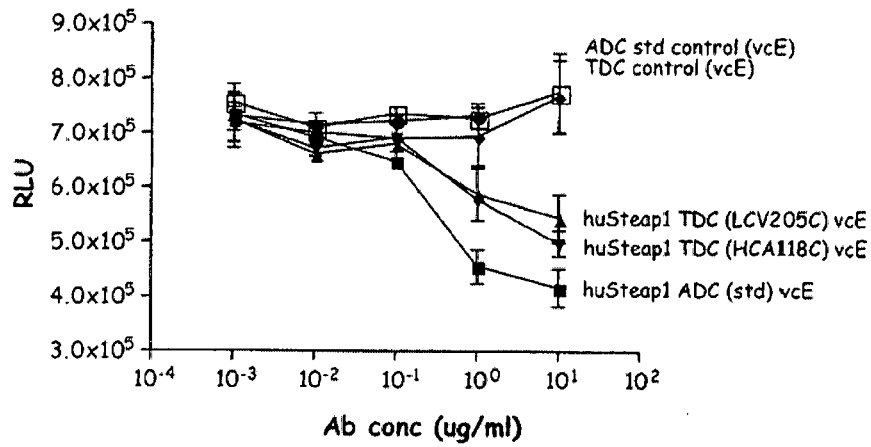


Figura 19B

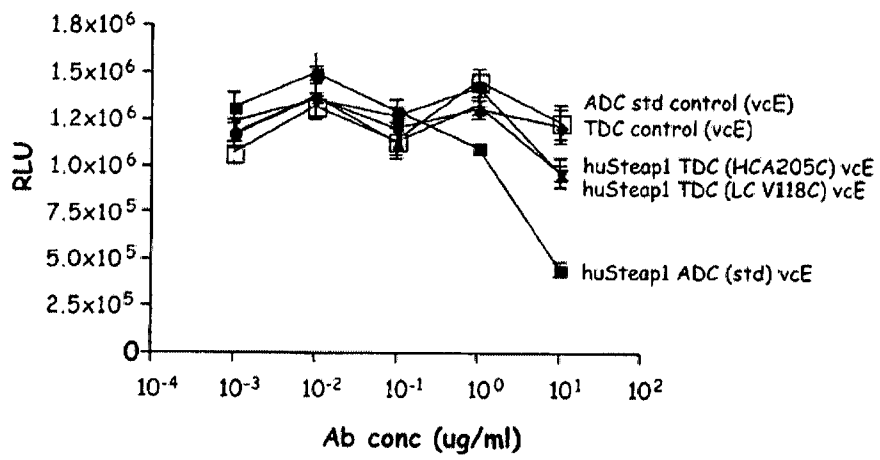
PS 5.4 2K/ pozo



31/45

Figura 19C

LNCAP 3K/ pozo



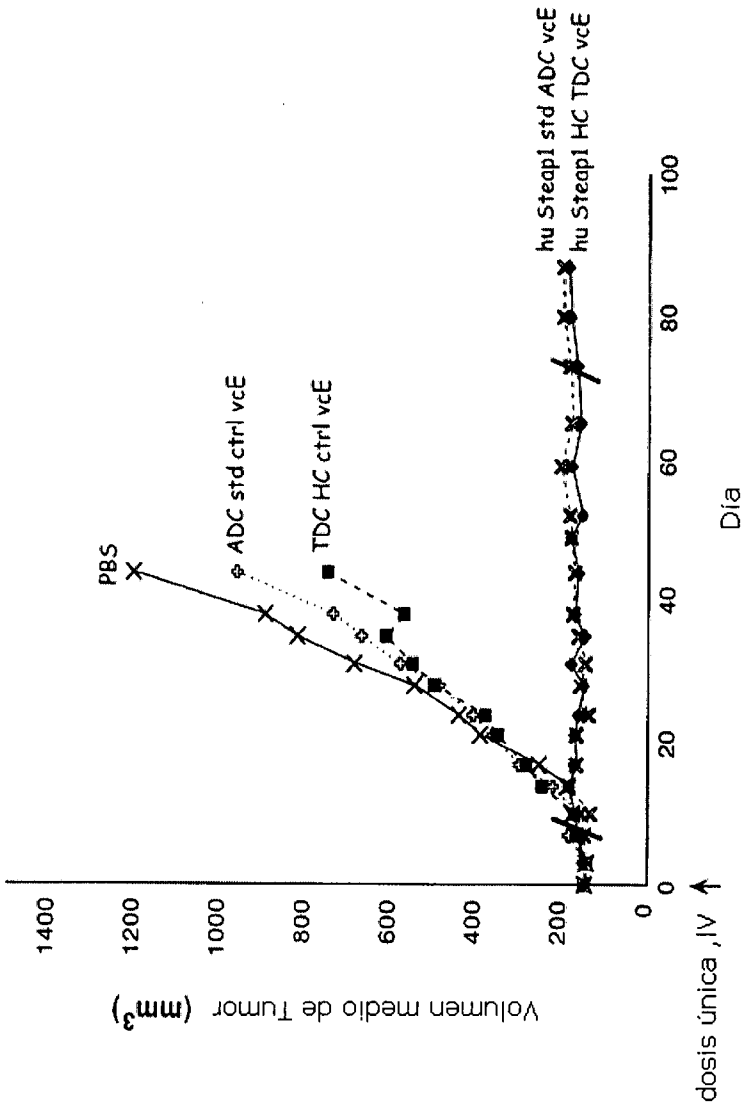


Figura 20

33/45

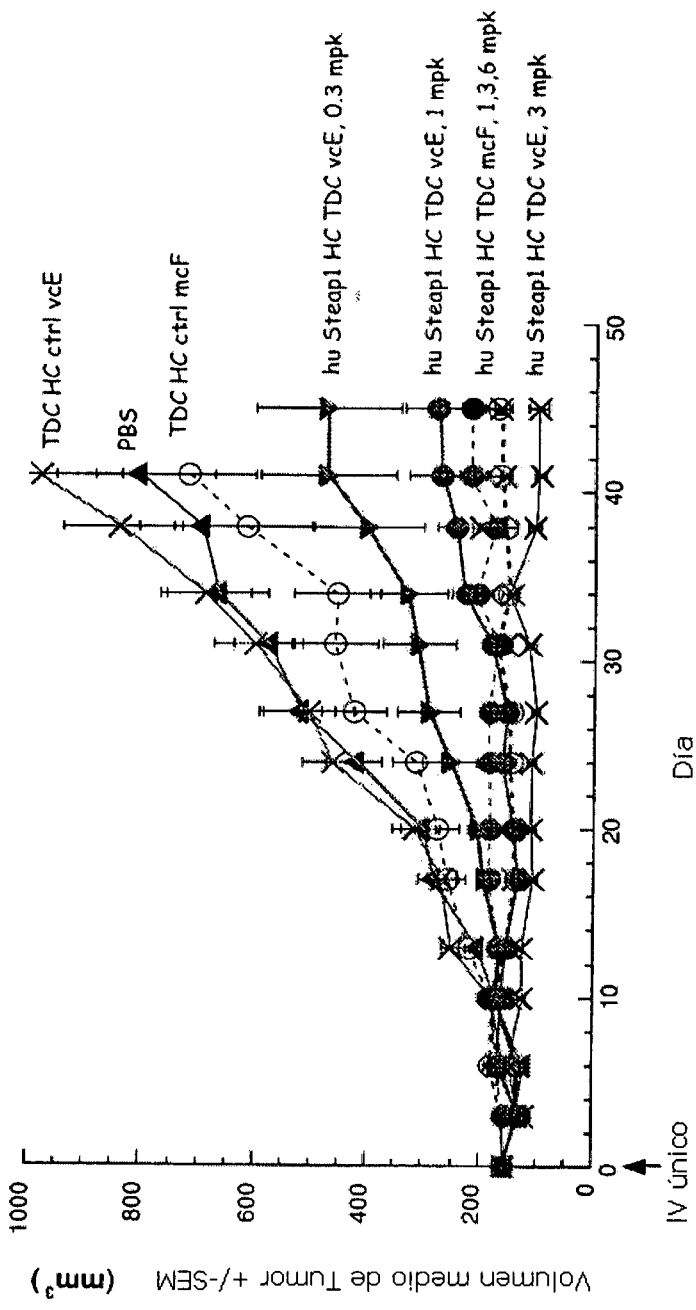


Figura 21

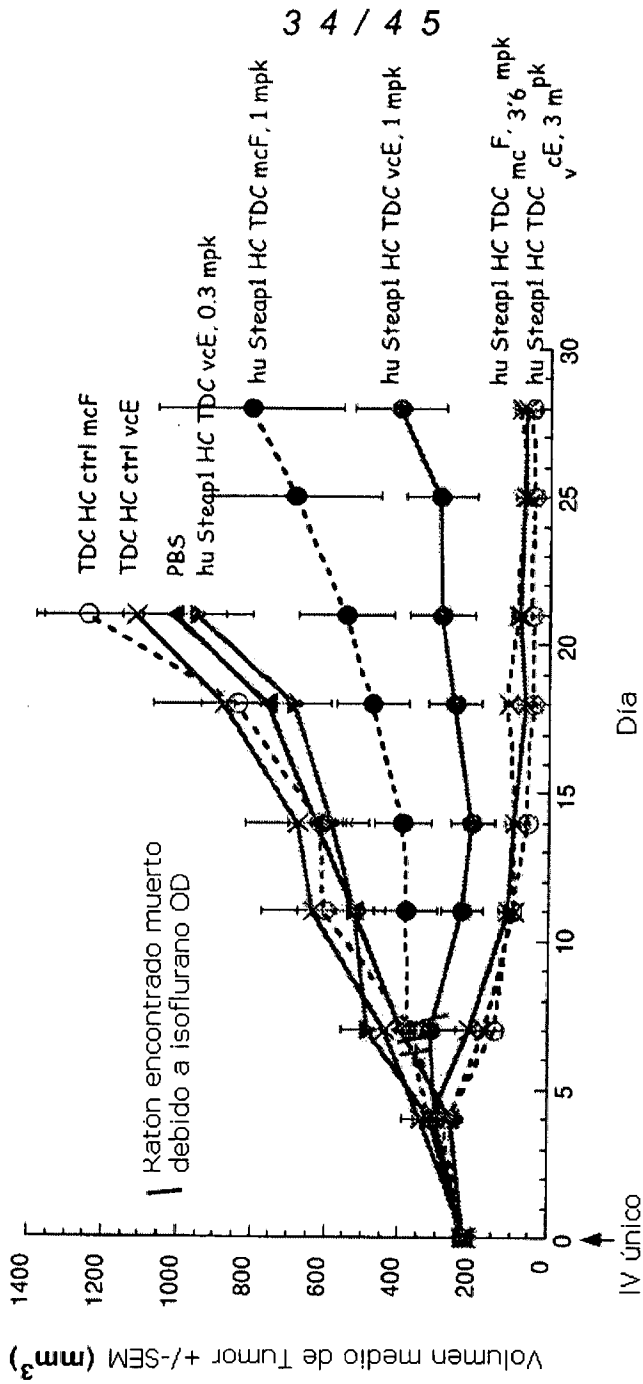


Figura 22

3 6 / 4 5

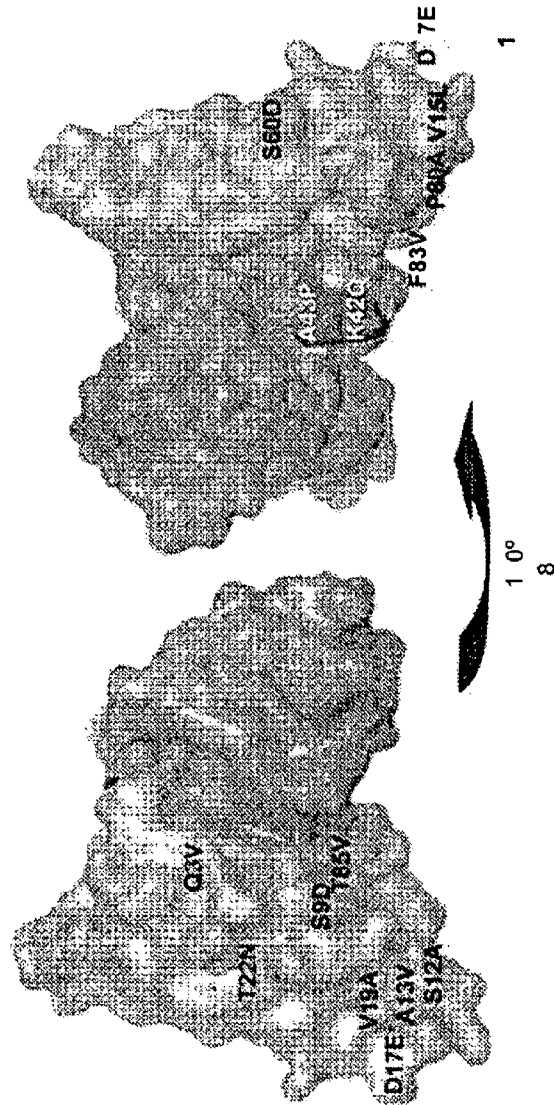


Figura 23 (PART 2)

Figura 25A

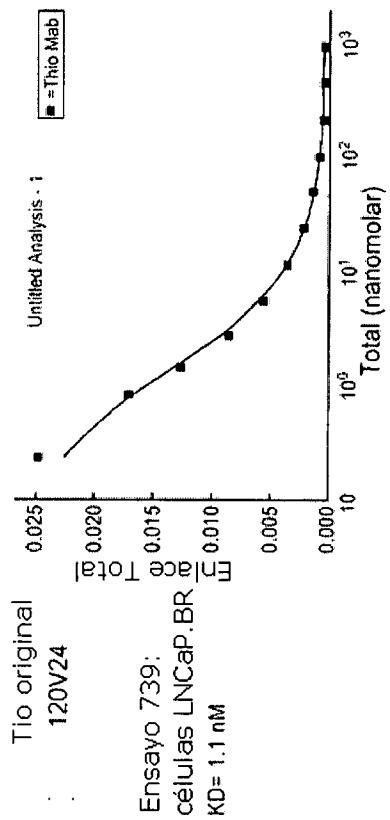


Figure 25B

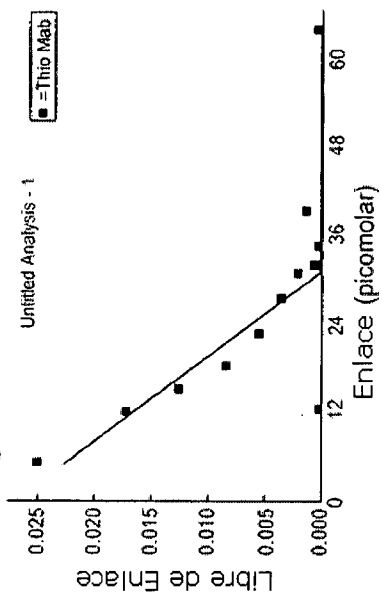


Figura 25C

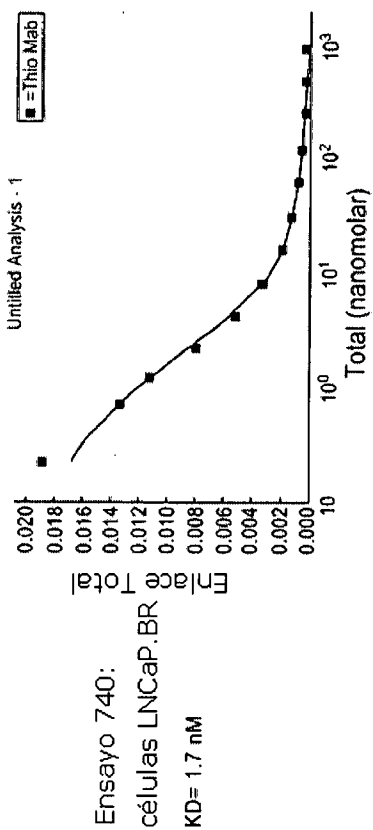
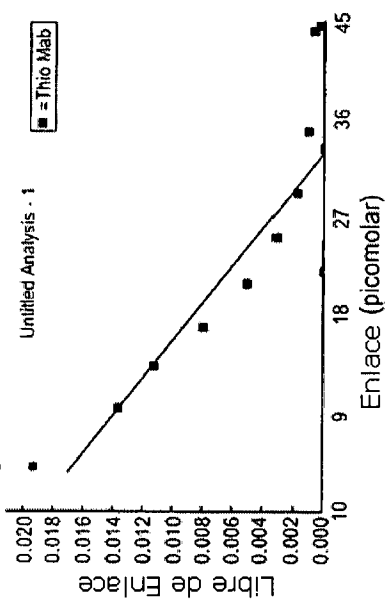


Figure 25D



39/45

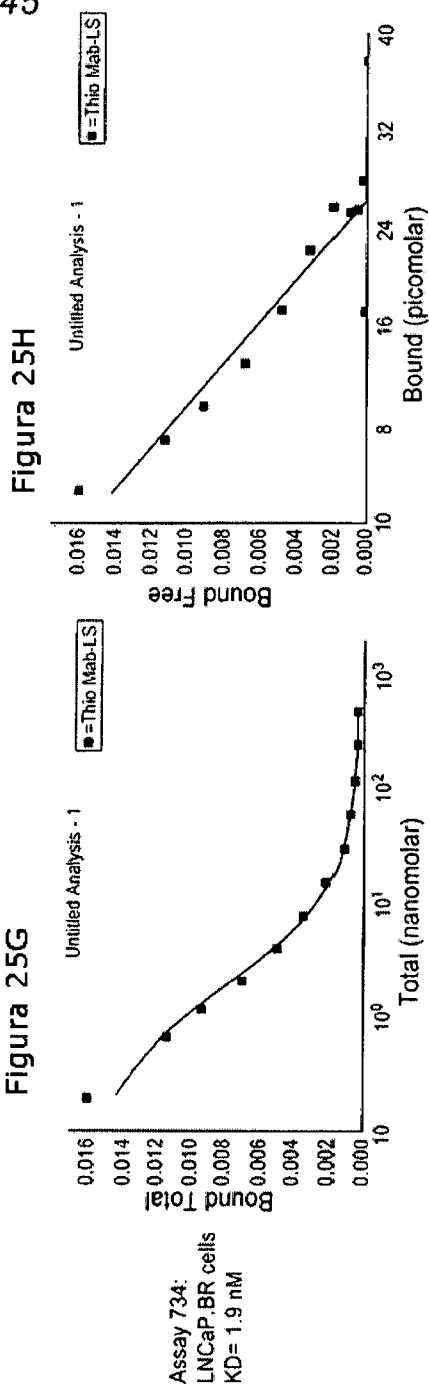
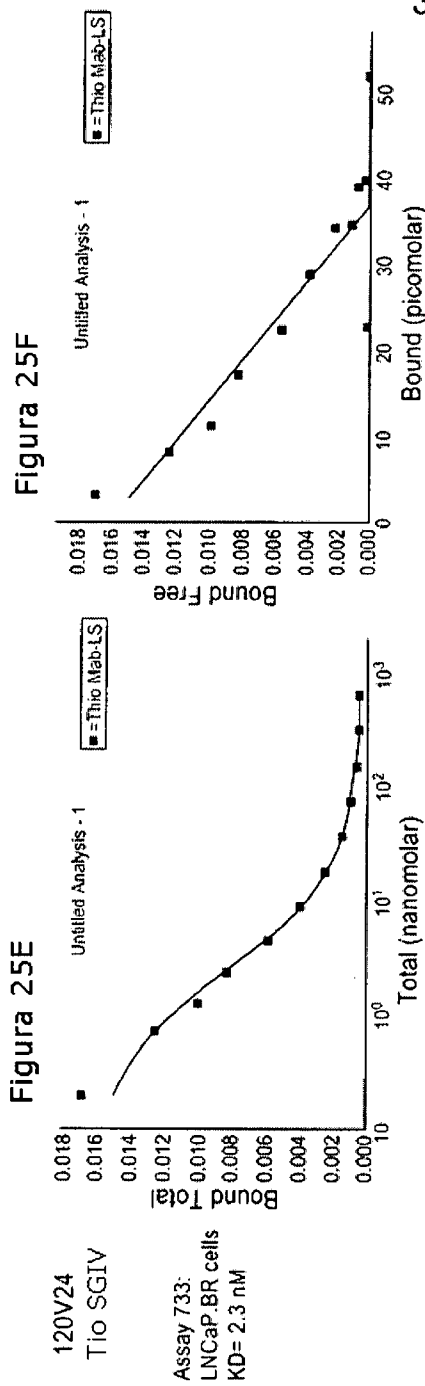


Figure 25F

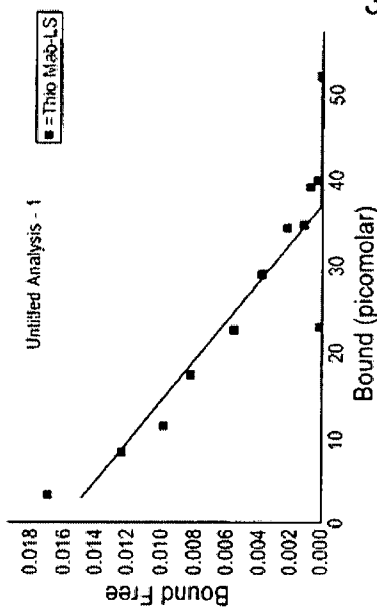
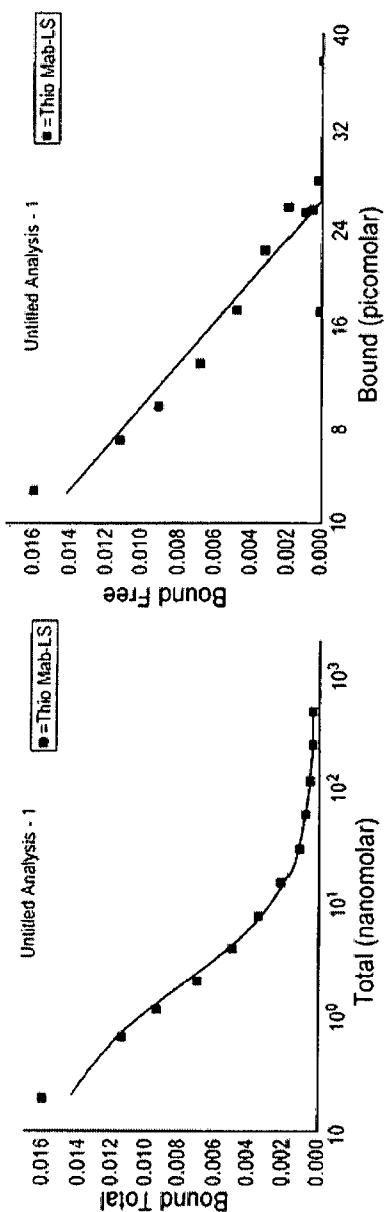
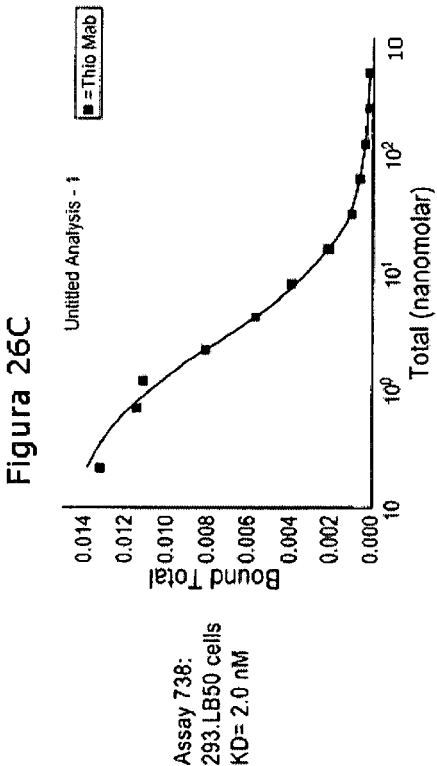
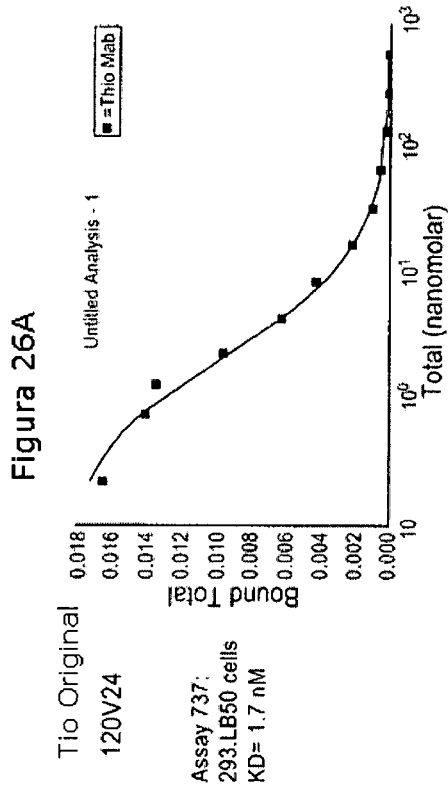
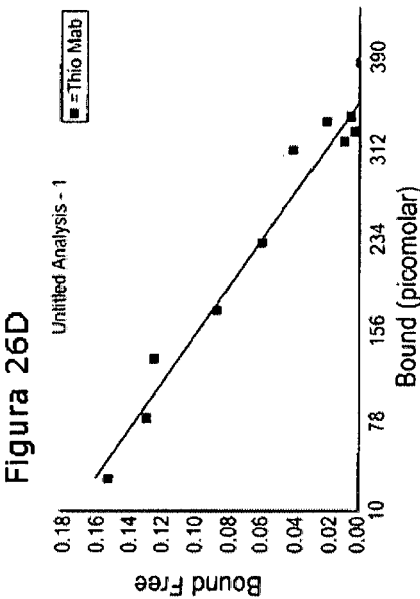
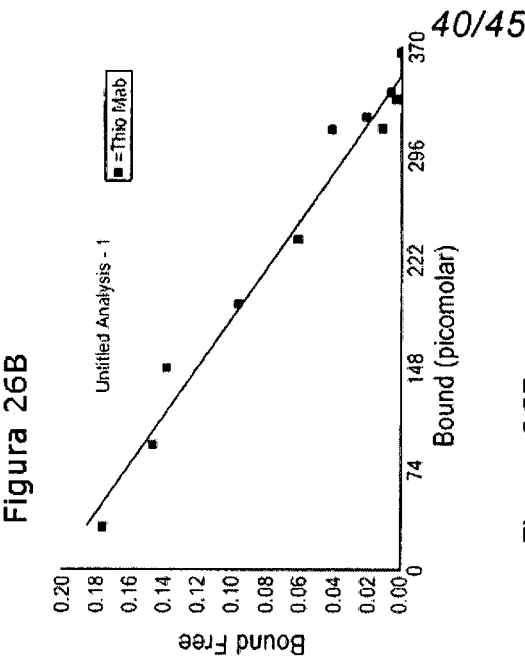
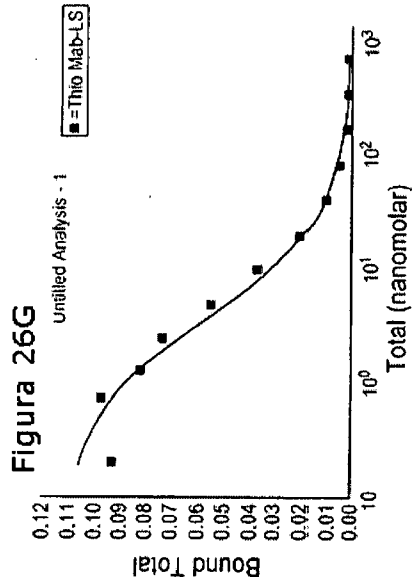
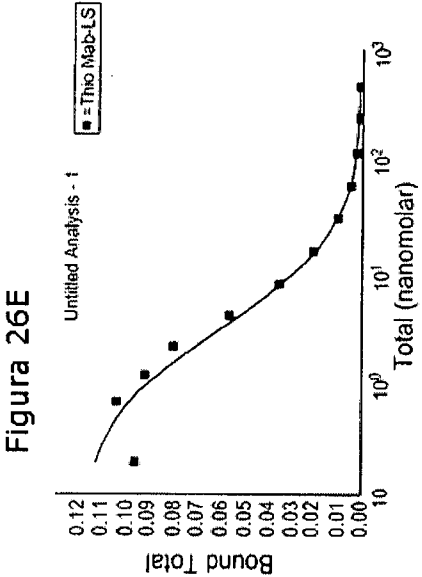
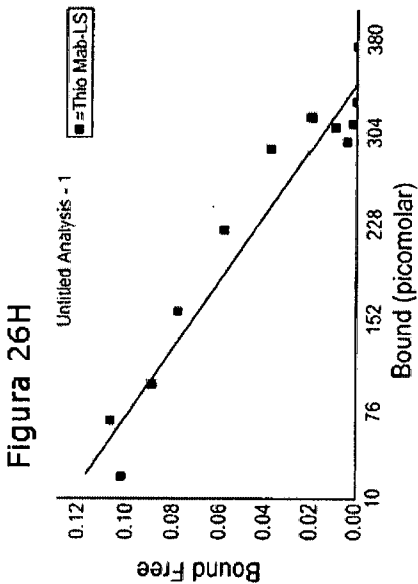
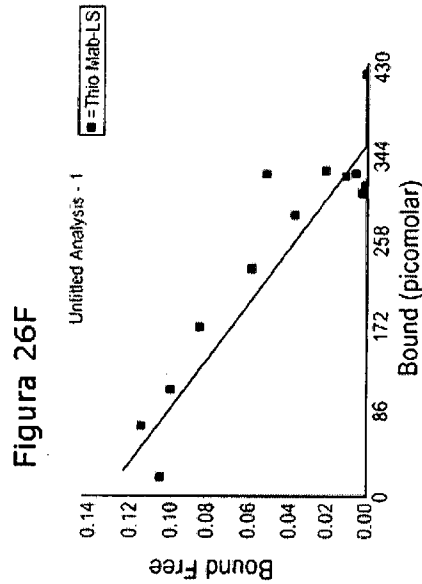


Figure 25G







120V24
Thio SGIV
Assay 735:
293.LB50 cells
KD= 2.7 nM

Assay 736:
293.LB50 cells
KD= 2.8 nM

Scatchards de Anticuerpo Steap1 Humanizado

Análisis Scatchard		quimera Fc 120v24 humano				Tio orig	Tio SGIV
marino		α 179	α 120	PUR 10162)	PUR 11712)	PUR 12813)	PUR 14951)
PC3-PS5.4	~23.4 nM	17.5 nM	9.9 nM			1.9 nM	2.8 nM
	~5.920	187,256	103,204				
293-LB50	4.7 nM	4.7 nM	4.9 nM		2.2 nM		
	25,368	301,100	252,892		264,172		
LNCaP-BR	3.3 nM	1.5 nM	0.9 nM			1.4 nM	2.1 nM
	2,626	37,207	22,021				

293- Temporal Steap1humano

293- Temporal Steap1cyno

1.4 nM

1.1 nM

Afinidad igual para humano & cyno

Figura 27

Figura 28A

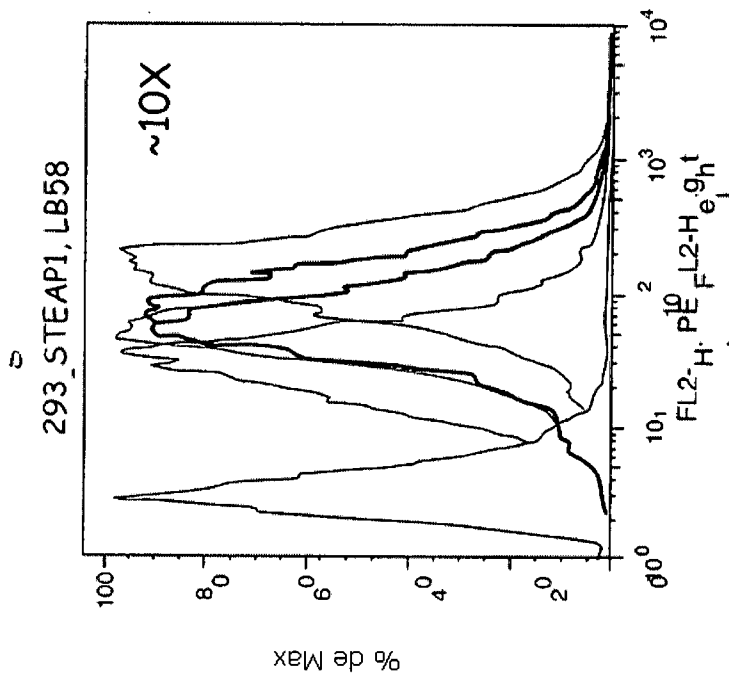


Figura 28B

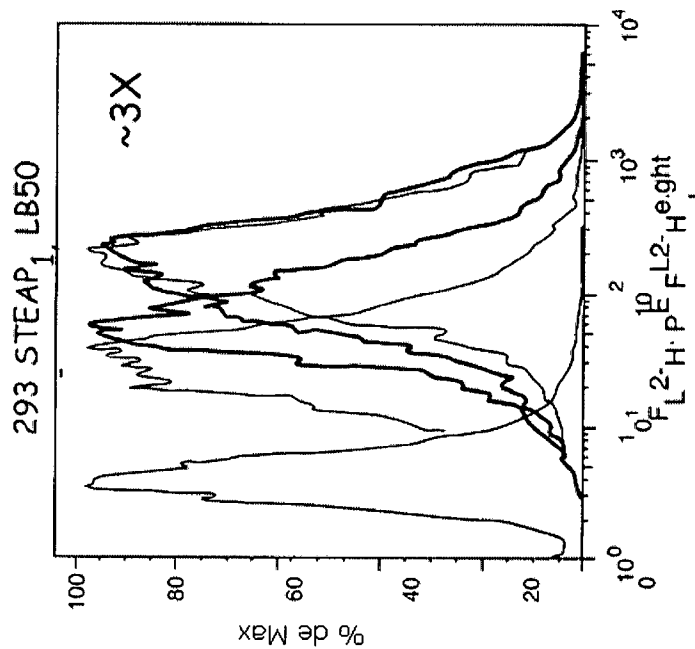


Figura 28D

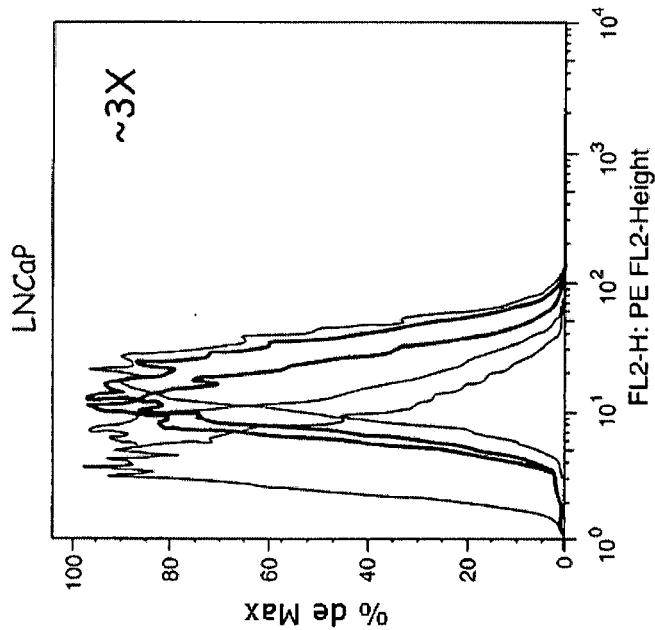
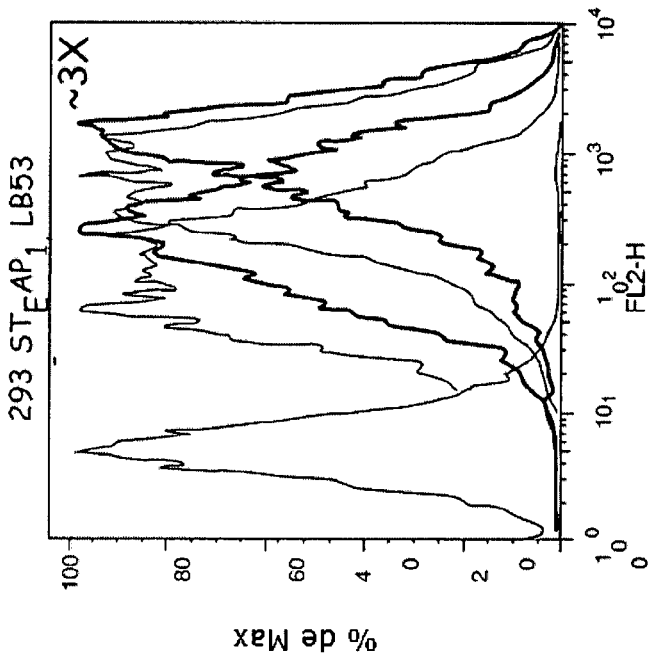


Figura 28C



45/45

XSTEAP1 Tio LCIV Producción Frasco Agitado

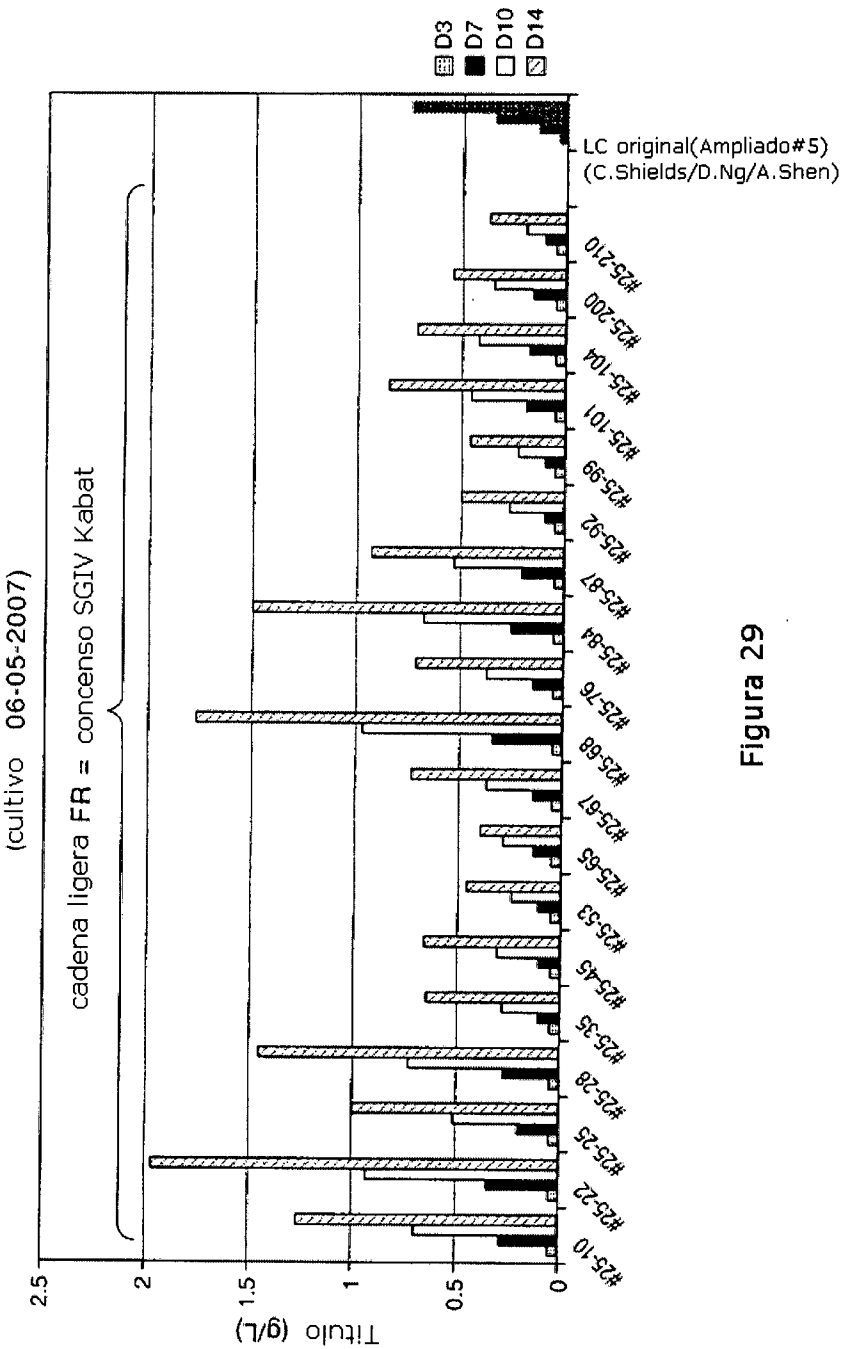


Figura 29

Viernes, 03 de Abril de 2009
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC.

<120> ANTICUERPOS E INMUNOCONJUGADOS Y SUS USOS

<130> 39766-0160R4.PCT

<140> PCT/US07/082726

<141> 2007-10-26

<150> 60/863,295

<151> 2006-10-27

<150> 60/868,707

<151> 2006-12-05

<150> 60/921,300

<151> 2007-03-30

<150> 60/937,857

<151> 2007-06-29

<160> 137

<170> PatentIn 3.3

<210> 1

<211> 340

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
1 5 10 15

Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
20 25 30

Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
35 40 45

Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
50 55 60

Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65 70 75 80

Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
85 90 95

Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
100 105 110

Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
115 120 125

Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
130 135 140

Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
145 150 155 160

Viernes, 03 de Abril de 2009

Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
165 170 175
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
180 185 190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
195 200 205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
210 215 220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225 230 235 240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys
245 250 255
Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Ile His Ala Leu Ile Phe
260 265 270
Ala Trp Asn Lys Trp Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp Tyr Thr Pro
275 280 285
Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Ile Val Val Leu Ile Phe
290 295 300
Lys Ser Ile Leu Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile
305 310 315 320
Arg His Gly Trp Glu Asp Val Thr Lys Ile Asn Lys Thr Glu Ile Cys
325 330 335
Ser Gln Leu Asn
340

<210> 2
<211> 340
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2
Met Glu Ile Ser Asp Asp Val Thr Asn Pro Glu Gln Leu Trp Lys Met
1 5 10 15
Lys Pro Lys Gly Asn Leu Glu Asp Asp Ser Tyr Ser Thr Lys Asp Ser
20 25 30
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Gly Leu Ser His Leu Gln His
35 40 45
Ala Val His Val Asp Ala Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
50 55 60
Gln Glu Phe Phe Pro Asn Trp Arg Leu Pro Val Lys Val Ala Ala Ile
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Ile Ile Tyr
85 90 95
Pro Leu Val Thr Ser Arg Glu Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu

100 105 110

Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ala Ile Thr Leu Leu Ala Leu
115 120 125

Val Tyr Leu Pro Gly Glu Leu Ala Ala Val Val Gln Leu Arg Asn Gly
130 135 140

Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro Pro Trp Leu Asp Arg Trp Met Leu Ala
145 150 155 160

Lys Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
165 170 175

Val Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
180 185 190

Leu Asn Trp Ala Tyr Lys Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
195 200 205

Val Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
210 215 220

Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225 230 235 240

Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys
245 250 255

Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Val His Ala Leu Val Phe
260 265 270

Ala Trp Asn Lys Trp Val Asp Val Ser Gln Phe Val Trp Tyr Met Pro
275 280 285

Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Thr Leu Val Leu Ile Cys
290 295 300

Lys Ile Ala Leu Cys Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile
305 310 315 320

Arg Cys Gly Trp Glu Asp Val Ser Lys Ile Asn Arg Thr Glu Met Ala
325 330 335

Ser Arg Leu Asn
340

<210> 3
<211> 340
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 3
Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Glu Glu Glu Leu Trp Lys Met
1 5 10 15

Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
20 25 30

Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
35 40 45

viernes, 03 de Abril de 2009

Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
50 55 60
Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65 70 75 80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
85 90 95
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
100 105 110
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
115 120 125
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
130 135 140
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
145 150 155 160
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
165 170 175
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
180 185 190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
195 200 205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
210 215 220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225 230 235 240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys
245 250 255
Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Ile His Ala Leu Ile Phe
260 265 270
Ala Trp Asn Lys Trp Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp Tyr Thr Pro
275 280 285
Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Val Val Val Leu Ile Phe
290 295 300
Lys Ser Ile Leu Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile
305 310 315 320
Arg His Gly Trp Glu Asp Ile Thr Lys Ile Asn Lys Met Glu Ile Ser
325 330 335
Ser Gln Leu Asn
340

<210> 4
<211> 108
<212> PRT

viernes, 03 de Abril de 2009

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

<210> 5

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

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

<210> 6

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

viernes, 03 de Abril de 2009

<400> 6
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
20 25 30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
35 40 45
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110
Lys Arg

<210> 7
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
Ser

<210> 8
<211> 124
<212> PRT

viernes, 03 de Abril de 2009

<213> Mus musculus

<400> 8

Asp Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30
Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45
Met Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60
Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80
Leu Gln Leu Ile Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ala
115 120 124

<210> 9

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30
Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60
Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10

<211> 124

viernes, 03 de Abril de 2009

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

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

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

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

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

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr
1 5

Viernes, 03 de Abril de 2009

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

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

<400> 17
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 19
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Página 9

viernes, 03 de Abril de 2009

1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 21
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 22
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 23
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 25

viernes, 03 de Abril de 2009

<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser
20 25

<210> 26
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 27
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 28
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 30
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

viernes, 03 de Abril de 2009

<400> 30
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
1 5 10

<210> 32
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

<210> 33
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 34
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30

<210> 35
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

viernes, 03 de Abril de 2009

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 36
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 37
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 38
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10

<210> 39
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

<210> 40
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

<210> 41
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 42
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 43
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 44
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 45
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 46

viernes, 03 de Abril de 2009

<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

<210> 47
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 48
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

<210> 49
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
20 25 30

<210> 50
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
20 25 30

viernes, 03 de Abril de 2009

<210> 51
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 52
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

<210> 53
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 54
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 55
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

viernes, 03 de Abril de 2009

<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 58
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
1 5 10

<210> 59
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 60
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 61
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
Página 17

1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 62
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 63
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 64
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 65
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 66
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

viernes, 03 de Abril de 2009

<210> 67
<211> 23
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 67
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys
20

<210> 68
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 68
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 69
<211> 32
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 69
Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 70
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 70
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 71
<211> 25
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 71
Asp Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr
20 25

<210> 72
<211> 13

viernes, 03 de Abril de 2009

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 72
Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met
1 5 10

<210> 73
<211> 32
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 73
Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln
1 5 10 15
Leu Ile Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 74
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 74
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ala Ser Ala
1 5 10

<210> 75
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75
Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 76
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
1 5 10

<210> 77
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77
Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
1 5 10

<210> 78
<211> 32

Viernes, 03 de Abril de 2009

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 79

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 80

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptidos sintéticos

<400> 80

Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu Asp
1 5 10 15

Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe
20 25 30

<210> 81

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptidos sintéticos

<400> 81

Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15

Glu Asp Asp Phe
20

<210> 82

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

viernes, 03 de Abril de 2009

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptidos sintéticos

<400> 82

Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15

Glu Asp Asp Phe
20

<210> 83

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptidos sintéticos

<400> 83

Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
1 5 10 15

Asp Asp

<210> 84

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptidos sintéticos

<400> 84

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10

<210> 85

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
35 40 45

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
50 55 60

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
Página 22

65 70 75 80																
His	Gln	Asp	Trp	Leu ₈₅	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr ₉₀	Lys	Cys	Lys	Val	Ser ₉₅	Asn	
Lys	Ala	Leu	Pro ₁₀₀	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys ₁₀₅	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala ₁₁₀	Lys	Gly	
Gln	Pro	Arg ₁₁₅	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr ₁₂₀	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser ₁₂₅	Arg	Glu	Glu	
Met	Thr ₁₃₀	Lys	Asn	Gln	Val	Ser ₁₃₅	Leu	Thr	Cys	Leu	Val ₁₄₀	Lys	Gly	Phe	Tyr	
Pro ₁₄₅	Ser	Asp	Ile	Ala	Val ₁₅₀	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn ₁₅₅	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn ₁₆₀	
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr ₁₆₅	Pro	Pro	Val	Leu	Asp ₁₇₀	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe ₁₇₅	Phe	
Leu	Tyr	Ser	Lys ₁₈₀	Leu	Thr	Val	Asp	Lys ₁₈₅	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln ₁₉₀	Gly	Asn	
Val	Phe	Ser ₁₉₅	Cys	Ser	Val	Met	His ₂₀₀	Glu	Ala	Leu	His	Asn ₂₀₅	His	Tyr	Thr	
Gln	Lys ₂₁₀	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser ₂₁₅	Pro	Gly	Lys							

```
<210> 86
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400>	86															
Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
1				5					10					15		
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
			20					25					30			
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	
		35					40					45				
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
	50					55					60					
Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	
65					70					75					80	
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
				85					90					95		
Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	
			100					105					110			
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	
		115					120					125				
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
	130					135					140					

260

viernes, 03 de Abril de 2009

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 87
<211> 168
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1 5 10 15
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
20 25 30
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp
35 40 45
Tyr Val Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
50 55 60
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
65 70 75 80
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
85 90 95
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
100 105 110
Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
115 120 125
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe
130 135 140
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys
145 150 155 160
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
165

<210> 88
<211> 218
<212> PRT

Viernes, 03 de Abril de 2009

<213> Homo sapiens

<400> 88

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

<210> 89

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
Página 25

50

55

60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 90
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

<210> 91
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 91
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
20 25 30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
35 40 45
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Viernes, 03 de Abril de 2009

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

Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg

<210> 92

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptidos sintéticos

<400> 92

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
20 25 30

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 93

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptidos sintéticos

<400> 93

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
20 25 30

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 94

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptidos sintéticos

<400> 94

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

<210> 95

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptidos sintéticos

<400> 95

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
20 25 30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

viernes, 03 de Abril de 2009

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 96

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptidos sintéticos

<400> 96

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
20 25 30

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 97

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptidos sintéticos

<400> 97

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
20 25 30

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

viernes, 03 de Abril de 2009

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 98

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptidos sintéticos

<400> 98

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

<210> 99

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptidos sintéticos

<400> 99

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
20 25 30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35

40

45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 100 105

<210> 100

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptidos sintéticos

<400> 100

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

<210> 101

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptidos sintéticos

<400> 101

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
 20 25 30

viernes, 03 de Abril de 2009

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 102
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 102
Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu
1 5 10 15

<210> 103
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 103
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys
20

<210> 104
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 104
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys
20

<210> 105
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 105
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys
20

viernes, 03 de Abril de 2009

<210> 106
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 106
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15
Arg Gly Glu Cys
20

<210> 107
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 107
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15
Arg Gly Glu Cys
20

<210> 108
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 108
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15
Arg Gly Glu Cys
20

<210> 109
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 109
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15
Arg Gly Glu Cys
20

<210> 110
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 110
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys
20

<210> 111
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 111
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys
20

<210> 112
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 112
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys
20

<210> 113
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 113
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys
20

<210> 114
<211> 39
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 114
Leu Tyr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
1 5 10 15

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35

<210> 115
<211> 44
<212> PRT
<213> Homo sapiens

viernes, 03 de Abril de 2009

<400> 115

Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
1 5 10 15

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
20 25 30

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35 40

<210> 116

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Ile Pro Arg His Ala Asn Val Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
1 5 10 15

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
20 25 30

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35 40

<210> 117

<211> 43

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Trp Thr Ser Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
1 5 10 15

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
20 25 30

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35 40

<210> 118

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
1 5 10 15

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
20 25 30

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35 40

<210> 119

<211> 44

<212> PRT

viernes, 03 de Abril de 2009

<213> Homo sapiens

<400> 119

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
20 25 30

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35 40

<210> 120

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
1 5 10 15

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
20 25 30

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35 40

<210> 121

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

Arg Ser His Val Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
1 5 10 15

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
20 25 30

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35 40 45

<210> 122

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Ile Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
20 25 30

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
35 40

<210> 123

<211> 44

viernes, 03 de Abril de 2009

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Arg Gly Asp Tyr Ser₅ Met Asp Tyr Trp Gly₁₀ Gln Gly Thr Leu Val₁₅ Thr

Val Ser Ser Ala₂₀ Ser Thr Lys Gly₂₅ Ser Val Phe Pro Leu₃₀ Ala Pro

Ser Ser Lys₃₅ Ser Thr Ser Gly₄₀ Thr Ala Ala Leu

<210> 124

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Tyr Asp Asp Tyr Tyr₅ Tyr Ala Met Asp Tyr₁₀ Trp Gly Gln Gly Thr₁₅ Leu

Val Thr Val Ser₂₀ Ser Ala Ser Thr Lys₂₅ Gly Pro Ser Val Phe₃₀ Pro Leu

Ala Pro Ser₃₅ Ser Lys Ser Thr Ser₄₀ Gly Gly Thr Ala Ala₄₅ Leu

<210> 125

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Val₁ Leu Asp Ser Asp₅ Gly Ser Phe Phe Leu₁₀ Tyr Ser Lys Leu Thr₁₅ Val

Asp Lys Ser Arg₂₀ Trp Gln Gln Gly Asn₂₅ Val Phe Ser Cys Ser₃₀ Val Met

His Glu Ala₃₅ Leu His Asn His Tyr₄₀ Thr Gln Lys Ser Leu₄₅ Ser

<210> 126

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Val₁ Leu Asp Ser Asp₅ Gly Ser Phe Phe Leu₁₀ Tyr Ser Lys Leu Thr₁₅ Val

Asp Lys Ser Arg₂₀ Trp Gln Gln Gly Asn₂₅ Val Phe Ser Cys Ser₃₀ Val Met

His Glu Ala₃₅ Leu His Asn His Tyr₄₀ Thr Gln Lys Ser Leu₄₅ Ser

<210> 127

viernes, 03 de Abril de 2009

<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 127
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
1 5 10 15
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
20 25 30
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 128
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 128
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
1 5 10 15
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
20 25 30
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 129
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 129
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
1 5 10 15
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
20 25 30
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 130
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 130
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
1 5 10 15
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
20 25 30
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
35 40 45

viernes, 03 de Abril de 2009

<210> 131
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 131
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
1 5 10 15
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
20 25 30
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 132
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 132
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
1 5 10 15
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
20 25 30
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 133
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 133
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
1 5 10 15
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
20 25 30
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 134
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 134
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
1 5 10 15
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
20 25 30
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
35 40 45

Viernes, 03 de Abril de 2009

<210> 135
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 135
Val¹ Leu Asp Ser Asp⁵ Gly Ser Phe Phe¹⁰ Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val¹⁵
Asp Lys Ser Arg²⁰ Trp Gln Gln Gly Asn²⁵ Val Phe Ser Cys Ser³⁰ Val Met
His Glu Ala³⁵ Leu His Asn His Tyr⁴⁰ Thr Gln Lys Ser Leu Ser⁴⁵

<210> 136
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 136
Asp Ile Val Met Thr⁵ Gln Ser Pro Asp Ser¹⁰ Leu Ala Val Ser Leu Gly¹⁵
Glu Arg Ala Thr²⁰ Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg³⁰
Ser Asn Gln³⁵ Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys⁴⁵ Pro Gly Gln
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁵⁵ Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val⁶⁰
Pro Asp Arg Phe Ser Gly⁷⁰ Ser Gly Ser Gly Thr⁷⁵ Asp Phe Thr Leu Thr⁸⁰
Ile Ser Ser Leu Gln⁸⁵ Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln⁹⁵
Tyr Tyr Asn Tyr¹⁰⁰ Pro Arg Thr Phe Gly¹⁰⁵ Gln Gly Thr Lys

<210> 137
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 137
Asp Ile Gln Met Thr⁵ Gln Ser Pro Asp Ser¹⁰ Leu Ser Ala Ser Val Gly¹⁵
Glu Arg Ala Thr²⁰ Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg³⁰
Ser Asn Gln³⁵ Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys⁴⁵ Pro Gly Lys
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁵⁵ Trp Ala Ser Thr Arg⁶⁰ Glu Ser Gly Val

Viernes, 03 de Abril de 2009

Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
65					70					75					80
Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				85					90					95	
Tyr	Tyr	Asn	Tyr	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys			
			100					105							

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION ☒ [x]

MODELO DE UTILIDAD ☐ []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒ [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒ [x] 1
- ◆ Descripción de la invención ☒ [x] 88
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒ [X] 29
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒ [x] 2

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 y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐ []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐ []

COMPLETA ☐ []

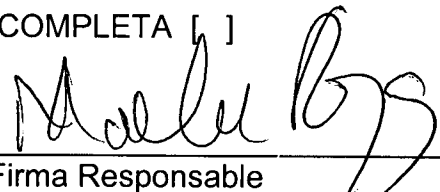
INCOMPLETA ☐ []

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ []

- ◆ Indicación de que se 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 trazado ☐ []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐ []

COMPLETA ☐ []

INCOMPLETA ☐ []


Firma Responsable

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Fecha



No. 09-034904- -00000-0000

Fecha: 2009-04-03 16:47:51 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 378

arrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Conmutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia