

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1 Titulo de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

COMPUESTOS AL RECEPTOR-3 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL FIBROBLASTO (FGFR3) Y MÉTODOS DE TRATAMIENTO

2 Datos del Solicitante

Nombre:	IMCLONE LLC	Dirección Electrónica:	patents@olartemoure.com
Dirección:	c/o Eli Lilly and Company Lilly Corporate Center Indianapolis, Indiana 46285	Domicilio/País de constitución:	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - INDIANA - INDIANAPOLIS
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE Número: 516861773038-			

3 Solicitantes

	Apellidos - Nombres o Razón Social	Tipo	Identificación
1.	IMCLONE LLC	NN	516861773038
2.	IMMUNOGEN INC.	NN	516861773039

4 Datos del Inventor

Nombre:		Paul J. BALDERES	Dirección Electrónica:	patents@olartemoure.com
Dirección:		P. O. Box 6288 Indianapolis, Indiana 46206-6288	Domicilio/País de constitución:	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - INDIANA - INDIANAPOLIS
Identificación:				
☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT ☒ No Aplica				
Número:		-		
5	Inventor(es)			
Apellidos - Nombres		Domicilio		
1.	BALDERES Paul J.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
2.	EASTMAN Scott W.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
3.	ERICKSON Hans K.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
4.	LUDWIG Dale L.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
5.	MOXHAM Christopher M.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
6.	PLOWMAN Gregory D.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
7.	RIGBY Alan C.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
6	Datos Inventor(es)			
País de Residencia		Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	INDIANAPOLIS	P. O. Box 6288 Indianapolis, Indiana 46206-6288
2.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	INDIANAPOLIS	P. O. Box 6288 Indianapolis, Indiana 46206-6288

3.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	MASSACHUSETTS	WALTHAM	830 Winter Street Waltham, Massachusetts 02451
4.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	INDIANAPOLIS	P. O. Box 6288 Indianapolis, Indiana 46206-6288
5.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	INDIANAPOLIS	P. O. Box 6288 Indianapolis, Indiana 46206-6288
6.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	INDIANAPOLIS	P. O. Box 6288 Indianapolis, Indiana 46206-6288
7.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	INDIANAPOLIS	P. O. Box 6288 Indianapolis, Indiana 46206-6288
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		CARLOS R. OLARTE GARCIA	Dirección Electrónica:	patents@olartemoure.com
Dirección:		patents@olartemoure.com	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - CUNDINAMARCA - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE Número: 79782747-				
Presentación de Poder				
Año de Radicación				
Número de Radicación				
8	Datos Solicitud: PCT / WO			
Número Solicitud:		PCT/US2014/069720	Fecha Solicitud:	11/12/2014

Número Publicacion:		WO 2015/094900		Fecha Publicacion:		25/06/2015	
9	Declaraciones de prioridad			☒ SI ☐ NO			
	(33) País de origen	Codigo del país	(31) No. Solicitud	(32) Fecha			
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	US	61/917,457	18/12/2013			
2.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	US	61/928,025	16/01/2014			
10	Reivindicaciones						
Número reivindicaciones:		25		Pago Reivindicaciones:		No	
11	Reducción de tasas.						
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolucón vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.							
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos							
12	Documentos Anexos						
☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☐ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen ☐ Certificado Depósito Material Biológico ☐ Uso de Conocimiento tradicional ☐ Listado de secuencias ☐ Artes finales 12 x 12 cm ☒ Poderes, si fuere el caso ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☒ Otros Anexos							

**COMPUESTOS AL RECEPTOR-3 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL
FIBROBLASTO (FGFR3) Y MÉTODOS DE TRATAMIENTO**

REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la
Solicitud Provisional Estadounidense |No. 61/917457 la cual
se presentó el 18 de Diciembre de 2013 y Solicitud
Provisional Estadounidense No. 61/928025 la cual se presentó
el 16 de Enero de 2014.

10

CAMPO DE LA INVENCION

 Esta invención se dirige a los campos de
inmunología, tratamiento de cáncer y terapéuticos de
objetivo. Más específicamente, la presente invención se
15 dirige a un compuesto que es un conjugado de una porción de
fármaco tóxico, específicamente un agente citotóxico, y un
agente de unión celular, más específicamente un anticuerpo, y
aún más específicamente un anticuerpo que dirige el receptor
3 del factor de crecimiento del fibroblasto humano (FGFR3,
20 por sus siglas en inglés), mediante una porción enlazadora.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

 El suministro de agentes tóxicos de objetivo
directamente a células aberrantes en lugar de tratar
25 sistemáticamente el cuerpo completo como se hace con la

quimioterapia tradicional es la ventaja clave para
terapéuticos de objetivo. El suministro de objetivo quizás
minimiza los efectos secundarios reduciendo el daño a células
sanas. Los conjugados de la invención son diseñados y
5 ajustados para dirigir una población celular específica y
suministrar citotoxinas potentes dentro de la célula mientras
se minimiza la actividad citotóxica fuera de objetivo. La
presente invención proporciona nuevos y útiles conjugados y
métodos de tratamiento junto con éstos, para eliminación o
10 viabilidad reducida de células anormales mientras se
minimizan los efectos en células sanas.

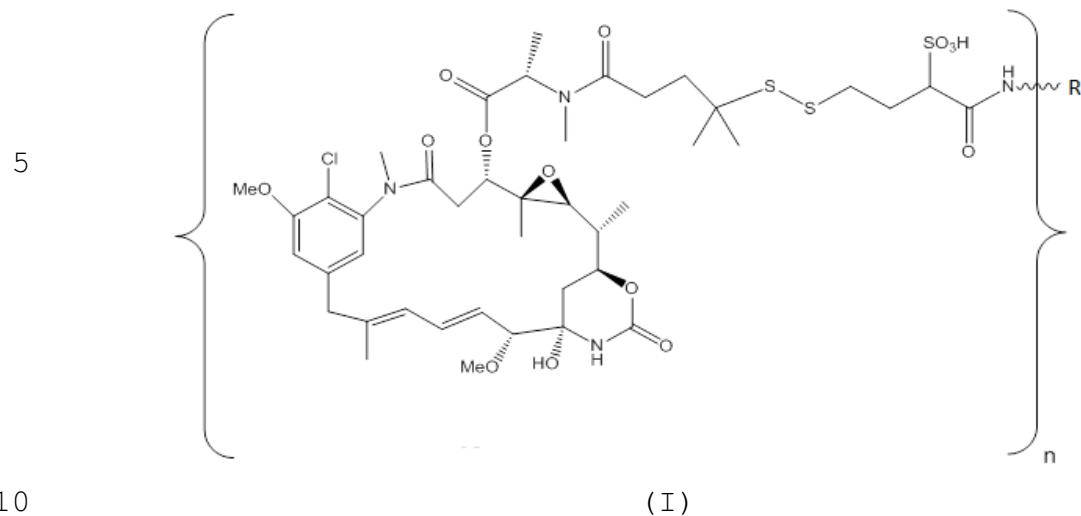
La presente invención es una respuesta a una
necesidad clínicamente no cubierta para el tratamiento de
cáncer de vejiga, que incluye carcinoma de células
15 transicionales (TCC, por sus siglas en inglés), el cual es
invasiva no muscular y principalmente una enfermedad local, e
invasiva muscular, la cual tiene un potencial muy alto de ser
metastásica, posteriormente "M+", y mieloma múltiple (MM, por
sus siglas en inglés). El cáncer de la vejiga se ha
20 diagnosticado recientemente en un estimado de 73,510
individuos y causará 14,880 muertes relacionadas con cáncer
en 2013 en los Estados Unidos. Esto hace que sea el cuarto
evento neoplásico más común en hombres y el noveno más común
en mujeres. Aproximadamente 70% de todos los nuevos casos son
25 cáncer invasivo no muscular, TCC, con recurrencia episódica

significante para lo cual un existe una alta necesidad médica no cubierta para mejorar el estándar de cuidado actual, el cual es bacilo de Calmette-Guérin (BCG)/irradiación/cirugía. Actualmente, existe una terapia no objetivo para cáncer de vejiga invasivo del músculo, donde el estándar de cuidado es una combinación de cuatro regímenes citotóxicos de quimioterapia (metotrexato, vinblastina, doxorubicina, y cisplatino (MVAC)) que es frecuentemente tóxica. Por consiguiente, la mayoría de los pacientes son actualmente tratados con la combinación menos óptima de gemcitabina y cisplatino. El mieloma múltiple permanece como una enfermedad incurable con supervivencia total actualmente variando desde tres hasta cinco años. Actualmente, el estándar de cuidado para mieloma múltiple es dosificación variable de corticosteroides (dexametasona) combinada con regímenes citotóxicos de quimioterapia, que incluye vincristina, ciclofosfamida y doxorubicina, todos los fármacos que han mostrado ser tóxicos a la mayoría de los pacientes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Existe una necesidad crítica para tratamientos de cáncer que efectivamente dirigen una población celular específica y suministrar una citotoxina potente mientras mitigan el daño a las células y tejidos sanos. Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto

de la Fórmula I o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable:



en donde n es un número entero desde 1 - 10 y

R es un agente de unión celular que se une al FGFR3 humano (SEQ ID NO 11) y comprende una CDRH1 que tiene la secuencia GYMFTSYGIS (SEQ ID NO 1), una CDRH2 que tiene la secuencia WVSTYNGDTNYAQKFQG (SEQ ID NO 2), una CDRH3 que tiene la secuencia VLGYYDSIDGYYYGMDV (SEQ ID NO 3), una CDRL1 que tiene la secuencia GGNNIGDKSVH (SEQ ID NO 4), una CDRL2 que tiene la secuencia LDTERPS (SEQ ID NO 5), y una CDRL3 que tiene la secuencia QVWDSGSDHVV (SEQ ID NO 6). La presente invención es aquí posteriormente referida como "Conjugado 1."

15

20

Evidencia científica en la presente sugiere que el compuesto de la presente invención es superior al estándar actual de cuidado de cáncer de vejiga (invasivo del músculo y no invasivo del músculo) y mieloma múltiple en que directamente dirige las células aberrantes y de este modo

25

reduce el daño a las células sanas del cuerpo, lo cual a su vez minimiza los efectos secundarios. Adicionalmente, el compuesto de la presente invención es superior a otros conjugados debido a que dirige indicaciones y poblaciones de paciente donde existe una necesidad clínicamente no cubierta. Distinto del conjugado actualmente aprobado Kadcyla®, el compuesto de la presente invención capitaliza en un objetivo el cual es fundamental en la formación de cáncer aún podría en general ser considerado inadecuadamente sobre-expresado para ser elegible para una terapia objetivo de conjugado. Distinto del conjugado actualmente aprobado Adcetris®, el compuesto de la presente invención minimiza las toxicidades fuera de objetivo de este modo reduciendo los efectos adversos los cuales son una limitación conocida de Adcetris®. Finalmente, distinto de los conjugados aprobados anteriores tales como gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg® - aprobado por la FDA en 2000 pero voluntariamente retirado en 2010) los cuales sufren de la inestabilidad del enlazador mientras están en circulación, el compuesto de la presente invención tiene un enlazador estable el cual de este modo evita la inestabilidad en la circulación.

El diseño e ingeniería de un conjugado es una tarea complicada. Es bastante más complicado que solamente seleccionar un antígeno, una porción de fármaco, una porción enlazadora y un agente de unión celular. (Ritter, A.,

Antibody-Drug Conjugates; Looking Ahead to an Emerging Class of Biotherapeutic, *Pharmaceutical Technology* pp 42-47 (Enero 2012)). El antígeno tumoral, la especificidad de unión del agente de unión celular, el mecanismo de acción de la porción de fármaco, y la manera en la cual la porción de fármaco está ligada al agente de unión celular son todos determinantes claves que rigen la actividad clínica y la tolerabilidad del compuesto.

El conjugado de la presente invención es un compuesto novedoso e inventivo, no una combinación de componentes. El diseño por ingeniería del compuesto requiere identificación y selección de los grupos funcionales constituyentes (porción de fármaco, porción enlazadora, agente de unión celular) que se complementan entre sí. Cada componente es un grupo funcional que tiene sus propias características, beneficios y restricciones. El proceso es similar al diseño de una nueva molécula pequeña comprendida de distintos grupos funcionales que incluyen pero no se limitan a grupos alquilo, grupo carbonilo, etc. Se requiere el diseño cuidadoso para asegurar las características, beneficios y restricciones equilibrados para que el conjugado sea un agente terapéutico efectivo; sin embargo, los resultados son impredecibles. La selección de grupos funcionales del vasto universo de porciones de fármaco, enlazadores y agentes de unión celular es complicada e

impredecible. Aunque los grupos funcionales pueden ser previamente descritos (toxina: DM4 (N2'-desacetil-N-2'(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina) (Patente Estadounidense No. 7,276,497), enlazador: sulfo-SPDB (4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de N-succinimidilo)) (Patente Estadounidense No. 8,236,319), y agente de unión celular: Anticuerpo 1 (Patente Estadounidense No. 8,043,618)), como con las relaciones de actividad estructural y actividades químicas de compuestos de molécula pequeña, por ejemplo, metotrexato, vinblastina, doxorubicina y cisplatino, el conocimiento de los grupos funcionales individuales no imparte conocimiento de la funcionalidad del compuesto final.

La selección de un antígeno objetivo adecuado es un aspecto clave de la presente invención. El antígeno objetivo de la invención es FGFR3. La señalización de la tirosina cinasa del receptor (RTK) aberrante juega un papel fundamental en la formación del cáncer así como también en el progreso del cáncer. Los factores de crecimiento del fibroblasto (FGFs) y sus receptores cognatos (FGFRs) son una parte de la familia del RTK. Los (FGFRs) son una parte de la familia RTK. Los FGFs y FGFRs juegan papeles críticos durante el desarrollo embriónico, homeostasis del tejido y metabolismo. La activación aberrante de FGFR3, a través de la mutación, la generación de fusiones cromosomales, o sobreexpresión, han sido directamente ligados a cáncer con

suficiente sobreexpresión del FGFR3 activada para inducir transformación oncogénica.

Debido a que la prominencia de las trayectorias de señalización del FGFR3 juegan en el tratamiento de cáncer, el
5 FGFR3 es una selección de antígenos poco probable para el desarrollo de una terapia de conjugado. Para que un conjugado sea efectivo, la expresión objetivo robusta en la célula tumoral es comúnmente considerada un requerimiento esencial. Aunque el FGFR3 es un antígeno positivo, su sobre-expresión
10 en las células tumorales contra las células normales es moderado; no es expresado a un nivel de antígeno entendido en la técnica por ser necesario para y considerado ventajoso para conjugados típicos, que incluyen aquellos actualmente aprobados por la FDA. Dado los niveles de expresión modestos
15 de FGFR3, el Conjugado 1 es inesperadamente eficaz. Las mutaciones y fusiones de activación de FGFR3 también han sido identificadas que provocan además eficiencia inesperada del Conjugado 1.

Por consiguiente, diseñar por ingeniería el
20 Conjugado 1 para incluir el Anticuerpo 1 como el agente de unión celular es un aspecto clave de la presente invención. Como el agente de unión celular del Conjugado 1, el Anticuerpo 1 se une al receptor e induce la internalización y degradación del receptor. El pensamiento clásico es que la
25 rápida reposición del antígeno de la superficie es requerida

para mejorar la probabilidad de éxito de un agente terapéutico. Debido a esto, el Conjugado 1 se ha encontrado por ser particularmente eficaz.

La selección de sulfo-SPDB como el enlazador es
5 también un aspecto clave de la invención. El sulfo-SPDB se seleccionó por equilibrar la toxicidad de la porción del fármaco asegurando el metabolismo intracelular de la porción de fármaco dentro de la célula. Sin embargo, los conjugados sulfo-SPDB, cuando se metabolizan intracelularmente, generan
10 tres productos metabólicos (lisina-N(épsilon)-sulfo-SPDB-DM4, DM4, y S-metil-DM4), dos de los cuales son capaces de promover la eliminación celular transeúnte de células vecinas a través del suministro de fármaco libre (DM4 y S-metil-DM4), el cual puede también incrementar la toxicidad a través de
15 eliminación no específica de células normales. Debido a los índices de expresión del antígeno, este efecto fue equilibrado, de este modo cambiando a una desventaja percibida sobre una ventaja del conjugado de la presente invención. Además, el sulfo-SPDB se seleccionó sobre otros
20 enlazadores desdoblables, tales como SPDB y SMCC, debido a su eficacia superior en algunos modelos de tumor así como también a consideraciones de toxicidad.

Debido al diseño por ingeniería significativa y retos de conjugación, el conjugado de la presente invención
25 de manera sorprendente permite los tratamientos de cáncer que

efectivamente dirigen una población celular específica y suministran una citotoxina potente mientras mitigan el daño al tejido al tejido sano en un antígeno moderadamente expresado que juega un papel fundamental en el progreso del
 5 cáncer.

Un aspecto de la invención es el Conjugado 1 mencionado anteriormente. La invención también se refiere a un compuesto en donde el agente de unión celular además comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada
 10 variable de:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYMFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWV
 STYNGDTNYAQKFQGRVTVTDDTSTSTAYMELRSLRSEDVAVYYCARVLGGYDSIDGYYYG
 MDVWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO 7)

y una secuencia de aminoácido ligero variable de:
 15 QSVLTQPPSLSVAPGKTATFTCGGNNIGDKSVHWYRQKPGQAPVLMYLDT
 ERPSGIPERMSGSNFGNTATLTITRVEAGDEADYYCQVWDSGSDHVVFGGGTKLTVLG
 (SEQ ID NO 8).

La invención se refiere a un compuesto en donde el agente de unión celular además comprende una cadena ligera
 20 que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 10 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 9. La invención también se refiere al compuesto en donde el agente de unión celular además comprende dos cadenas ligeras cada una comprende la secuencia
 25 de aminoácido de la SEQ ID NO: 10 y dos cadenas pesadas cada

una comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 9.

En un aspecto de la invención, los compuestos tienen una relación de fármaco a anticuerpo o como se usa en la presente "DAR", de 2.0 hasta 5.0. En otro aspecto de la
5 invención, el compuesto tiene una DAR de 3.5 ± 0.5 .

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende los compuestos mencionados anteriormente junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica
10 puede comprender además un agente farmacéutico adicional.

Un aspecto de la invención es el compuesto para uso en terapia. Otro aspecto es el compuesto para uso en el tratamiento de cáncer.

En otro aspecto, la invención es el compuesto para
15 uso en el tratamiento de cáncer en un paciente que tiene un nivel de expresión del FGFR3 que es mayor que el nivel de expresión del FGFR3 en una población de control. En un aspecto, la población de control comprende al menos un individuo que no sufre de cáncer.

20 En otro aspecto, la invención es el compuesto para uso en el tratamiento de cáncer en un paciente, en donde el paciente tiene un nivel elevado de expresión del FGFR3 y el tratamiento comprende determinar si o no el paciente tiene un nivel elevado de expresión del FGFR3 determinando *ex vivo* o
25 *in vitro* el nivel de expresión del FGFR3 en una muestra

biológica del paciente y comparando el nivel de expresión del FGFR3 en tal muestra con el nivel de expresión del FGFR3 en una muestra de control.

En un aspecto, la muestra de control es una muestra
5 biológica de un individuo que no sufre de cáncer.

En un aspecto adicional, la muestra biológica del paciente se selecciona a partir del grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina y tejido. En todavía un aspecto adicional, la muestra de control es de la misma fuente como
10 la muestra biológica del paciente. Por ejemplo, si la muestra biológica del paciente es una muestra de sangre, la muestra de control también es una muestra de sangre.

En otro aspecto, la invención es el compuesto para uso en el tratamiento de cáncer en un paciente que tiene (a)
15 una mutación de FGFR3 (SEQ ID NO 11), en donde la mutación se selecciona a partir del grupo que consiste de S249C, R248C, Y373C, Y375C, y combinaciones de las mismas; (b) una fusión de FGFR3-TACC3; o (c) una combinación de (a) y (b).

En otro aspecto, la invención es el compuesto para
20 uso en el tratamiento de cáncer en un paciente que tiene (a) una mutación de FGFR3 (SEQ ID NO 11), en donde la mutación se selecciona a partir del grupo que consiste de S249C, R248C, Y373C, Y375C, y combinaciones de las mismas; (b) una fusión de FGFR3-TACC3; o (c) una combinación de (a) y (b), y el
25 tratamiento comprende determinar sí o no el paciente tiene

(a) una mutación de FGFR3 (SEQ ID NO 11), en donde la mutación se selecciona a partir del grupo que consiste de S249C, R248C, Y373C, Y375C, y combinaciones de las mismas; (b) una fusión de FGFR3-TACC3; o (c) una combinación de (a) y 5 (b), *determinando ex vivo o in vitro* la presencia de (i) una o más de las mutaciones S249C, R248C, Y373C, Y375C; (ii) una fusión de FGFR3-TACC3; o (iii) una combinación de (i) y (ii) en una muestra biológica del paciente.

En un aspecto adicional, la muestra biológica del 10 paciente se selecciona a partir del grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, tejido, células tumorales, muestras de tejido tumoral, células tumorales de circulación, y ADN de circulación.

En algunos aspectos, el cáncer es cáncer de vejiga 15 o mieloma múltiple.

En otro aspecto, el compuesto puede ser administrado simultáneamente, separadamente o secuencialmente con otro tratamiento anti-cancerígeno. El tratamiento anti-cancerígeno se selecciona a partir del grupo que consiste de 20 un agente anti-angiogénico, un agente quimioterapéutico, y un agente anti-neoplásico. En un aspecto de la invención, el agente anti-neoplásico es cisplatino.

La invención también se refiere a un método para tratar cáncer en un mamífero, que comprende administrar a tal 25 mamífero en necesidad del mismo una cantidad efectiva del

compuesto en donde el cáncer se selecciona a partir del grupo que consiste de vejiga o mieloma múltiple. El método puede comprender además administrar otro tratamiento anticancerígeno a tal mamífero en donde tal tratamiento anticancerígeno se selecciona a partir del grupo que consiste de un agente anti-angiogénico, un agente quimioterapéutico, y un agente anti-neoplásico. En un aspecto, el agente anti-neoplásico es cisplatino.

Un aspecto de la invención es un método para tratar cáncer en un paciente, que comprende las etapas: (1) medir el nivel de expresión del FGFR3 (SEQ ID NO 11) en una muestra tomada del paciente, en donde la muestra se selecciona a partir del grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, y tejido, y (2) administrar al paciente el compuesto si el nivel de expresión del FGFR3 está arriba del nivel de expresión del FGFR3 encontrado en una población de control.

Un aspecto de la invención es un método para tratar cáncer en un paciente, que comprende las etapas: (1) determinar la presencia de una anomalía en una muestra tomada del paciente, en donde la anomalía es: (a) una mutación de FGFR3 (SEQ ID NO 11), en donde la mutación se selecciona a partir del grupo que consiste de S249C, R248C, Y373C, Y375C, y combinaciones de las mismas, (b) una fusión de FGFR3-TACC3, o (c) una combinación de (a) y (b), y en donde la muestra se selecciona a partir del grupo que consiste de sangre, suero,

plasma, orina, tejido, células tumorales, muestras de tejido tumoral, células tumorales de circulación, y ADN de circulación, y (2) administrar al paciente el compuesto si la anomalía está presente.

5 Un aspecto de la invención es un método para tratar cáncer en un paciente, que comprende las etapas: (1) determinar la presencia de una mutación S249C del FGFR3 (SEQ ID NO 11) en una muestra tomada del paciente en donde la muestra se selecciona a partir del grupo que consiste de
10 sangre, suero, plasma, orina, tejido, células tumorales, muestras de tejido tumoral, células tumorales de circulación, y ADN de circulación, y (2) administrar al paciente el compuesto si la mutación S249C está presente.

 Un aspecto de la invención es un método para tratar
15 cáncer en un paciente, que comprende las etapas: (1) determinar la presencia de una mutación R248C del FGFR3 (SEQ ID NO 11) en una muestra tomada del paciente en donde la muestra se selecciona a partir del grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, tejido, células tumorales,
20 muestras de tejido tumoral, células tumorales de circulación, y ADN de circulación, y (2) administrar al paciente el compuesto si la mutación R248C está presente.

 Otro aspecto de la invención es un método para tratar cáncer en un paciente, que comprende las etapas: (1)
25 determinar la presencia de una mutación Y373C del FGFR3 (SEQ

ID NO 11) en una muestra tomada del paciente en donde la muestra se selecciona a partir del grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, tejido, células tumorales, muestras de tejido tumoral, células tumorales de circulación, y ADN de circulación, y (2) administrar al paciente el compuesto si la mutación Y373C está presente.

Otro aspecto de la invención es un método para tratar cáncer en un paciente, que comprende las etapas: (1) determinar la presencia de una mutación Y375C del FGFR3 (SEQ ID NO 11) en una muestra tomada del paciente en donde la muestra se selecciona a partir del grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, tejido, células tumorales, muestras de tejido tumoral, células tumorales de circulación, y ADN de circulación, y (2) administrar al paciente el compuesto si la mutación Y375C está presente.

Otro aspecto de la invención es un método para tratar cáncer en un paciente, que comprende las etapas: (1) determinar la presencia de una fusión de FGFR3-TACC3 en una muestra tomada del paciente en donde la muestra se selecciona a partir del grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, tejido, células tumorales, muestras de tejido tumoral, células tumorales de circulación, y ADN de circulación, y (2) administrar al paciente el compuesto si la fusión del FGFR3-TACC3 está presente.

Un aspecto de la invención es un método para

determinar si un sujeto que tiene un cáncer es un candidato para el compuesto que comprende determinar *ex vivo* o *in vitro* el nivel de la expresión del FGFR3 (SEQ ID NO 11) en una muestra del sujeto, en donde la muestra se selecciona a partir del grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, y tejido, en donde un incremento en el nivel de expresión del FGFR3 ya comparado con el nivel de expresión del FGFR3 en un individuo que no sufre de cáncer, es indicativo de que el sujeto es un candidato para el compuesto.

Otro aspecto es un método para determinar si un sujeto que tiene un cáncer es un candidato para el compuesto que comprende determinar *ex vivo* o *in vitro* la presencia de una anomalía en una muestra tomada a partir de un paciente, en donde la anomalía es: (1) una mutación del FGFR3 (SEQ ID NO 11) en donde la mutación se selecciona a partir del grupo que consiste de S249C, R248C, Y373C, Y375C, y combinaciones de las mismas, (2) una fusión del FGFR3-TACC3, o (3) una combinación de (a) o (b), y en donde la muestra se selecciona a partir del grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, tejido, células tumorales, muestras de tejido tumoral, células tumorales de circulación, y ADN de circulación, y en donde una detección de la mutación es indicativa de que el sujeto es un candidato para el compuesto.

Un aspecto de la invención es un método para

determinar si un sujeto que tiene un cáncer es un candidato para el compuesto, que comprende determinar *ex vivo* o *in vitro* la presencia de una mutación S249C del FGFR3 (SEQ ID NO 11) en una muestra del sujeto, en donde la muestra se
5 selecciona a partir del grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, tejido, células tumorales, muestras de tejido tumoral, células tumorales de circulación, y ADN de circulación, en donde una detección de la mutación S249C es indicativa de que el sujeto es un candidato para el
10 compuesto.

Un aspecto de la invención es un método para determinar si un sujeto que tiene un cáncer es un candidato para el compuesto que comprende determinar *ex vivo* o *in vitro* la presencia de una mutación R248C del FGFR3 (SEQ ID NO 11)
15 en una muestra del sujeto, en donde la muestra se selecciona a partir del grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, tejido, células tumorales, muestras de tejido tumoral, células tumorales de circulación, y ADN de circulación, en donde una detección de la mutación R248C es indicativa de que
20 el sujeto es un candidato para el compuesto.

Otro aspecto es un método para determinar si un sujeto que tiene un cáncer es un candidato para el compuesto que comprende determinar *ex vivo* o *in vitro* la presencia de una Y373C mutación del FGFR3 (SEQ ID NO 11) en una muestra
25 del sujeto, en donde la muestra se selecciona a partir del

grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, tejido, células tumorales, muestras de tejido tumoral, células tumorales de circulación, y ADN de circulación, en donde una detección de la mutación Y373C es indicativa de que el sujeto
5 es un candidato para el compuesto.

Otro aspecto es un método para determinar si un sujeto que tiene un cáncer es un candidato para el compuesto que comprende determinar *ex vivo* o *in vitro* la presencia de una mutación Y375C del FGFR3 (SEQ ID NO 11) en una muestra
10 del sujeto, en donde la muestra se selecciona a partir del grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, tejido, células tumorales, muestras de tejido tumoral, células tumorales de circulación, y ADN de circulación, en donde una detección de la mutación Y375C es indicativa de que el sujeto
15 es un candidato para el compuesto.

Otro aspecto es un método para determinar si un sujeto que tiene un cáncer es un candidato para el compuesto que comprende determinar *ex vivo* o *in vitro* la presencia de una fusión del FGFR3-TACC3 en una muestra del sujeto, en
20 donde la muestra se selecciona a partir del grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, tejido, células tumorales, muestras de tejido tumoral, células tumorales de circulación, y ADN de circulación, en donde una detección de la fusión del FGFR3-TACC3 es indicativa de que el sujeto es
25 un candidato para el compuesto.

Como se usa en la presente, el término "antígeno" incluye una proteína localizada en una superficie celular. Los antígenos pueden incluir polipéptidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos, haptenos u otros compuestos sintéticos o que se originan naturalmente. Preferiblemente, el antígeno es un polipéptido o proteína plegada. Los ligandos específicos se unen a la proteína o receptor, iniciando la transducción de la señal y un cambio en la actividad celular. Los anticuerpos también pueden unirse al antígeno el cual puede bloquear la unión del ligando y la transducción de la señal resultante. Los términos antígeno, "receptor," "objetivo" o "antígeno objetivo" son usados de manera intercambiable en la presente.

Como se usa en la presente, el término "anomalía" incluye cualquier cambio en la secuencia del antígeno que se desvía de aquel que es de tipo nativo, estándar, normal o esperado. Los anticuerpos incluyen anomalías genéticas. Las anomalías incluyen mutaciones de todos los tipos y fusiones.

Como se usa en la presente, el término "mutación" incluye cambios en la secuencia de nucleótido del genoma que incluye cambios en la secuencia de aminoácido del antígeno.

Como se usa en la presente, el término "fusión" incluye proteínas creadas a través de la unión de dos o más genes los cuales originalmente codifican para proteínas separadas. Los genes de fusión son comúnmente creados cuando

una translocación cromosomal reemplaza exones de un gen con exones intactos de un segundo gen. Esto crea un gen único el cual puede ser transcrito, dividido, y traducido para producir una proteína de fusión funcional.

5 La sobre expresión del FGFR3 de tipo nativo es suficiente para inducir la transformación oncogénica. La activación aberrante que resulta en actividad independiente del ligando, constitutiva del FGFR3 (SEQ ID NO: 11), a través de la mutación, ha sido directamente ligada al cáncer. Las
10 mutaciones identificadas incluyen S249C, R248C, Y373C, y Y375C. Varias proteínas de fusión que dividen exones del FGFR3 objetivo con exones de la proteína espiralada de la espiral ácido de transformación 3 (TACC3), como se usa en la presente como "fusión FGFR3-TACC3" ha sido identificada en
15 numerosos cánceres. Estas mutaciones y algunas fusiones como se observan en la Tabla 5 considerando hipersensibilidad del FGFR3 y de este modo más receptivo al conjugado de la presente invención.

 Como se usa en la presente, el término
20 "sobrexpresión" incluye la expresión excesiva de un gen en donde el gen produce un nivel elevado de su producto que incluye uno o más receptores, los cuales están asociados con la incrementada activación y señalización del receptor. Un cáncer el cual "sobrexpresas" un receptor antigénico es uno
25 el cual tiene niveles significativamente superiores del

receptor en la superficie celular ya comparado con células no cancerosas del mismo tejido. La sobreexpresión del receptor puede ser determinada en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando niveles incrementados de la proteína del receptor presente en la superficie de la célula mediante un ensayo de inmunohistoquímica (IHC), o midiendo los niveles del ácido nucleico de terminación del receptor en la célula mediante hibridización *in situ* fluorescente (FISH), manchado southern, manchado northern, o reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La sobreexpresión no es un límite finito sino preferiblemente uno continuo. La expresión de la superficie celular del receptor o densidad de superficie celular del receptor relativa puede ser medida por intensidad de fluorescencia mediana (MFI). Por ejemplo la expresión de la superficie celular del FGFR3 se presenta en 11,000 receptores en la línea de células de cáncer de vejiga BFTC-905 (tipo nativa) y 16,000 receptores del FGFR3 en la línea de células de tumor de vejiga RT112 (receptores de fusión FGFR3-TACC3 y tipo nativo). (Véase Tabla 5.) Kadcyła®, también conocido como TDM1, uno de los dos conjugados aprobados en los Estados Unidos, dirige a HER-2 el cual promedia 2 millones de receptores en tumores metastásicos de mama. (Lohrisch, et al., Seminars in Oncology, Vol 28, No 6, Suppl 18: 3-11 (2001)). Aunque el FGFR3 puede ser sobreexpresado, la

cantidad de la expresión de la proteína del FGFR3 es moderada y la expresión diferencial del tumor normal no es tan significativa cuando se compara con las cantidades de otras proteínas relacionadas con cáncer, tales como HER-2, las cuales son consideradas altamente sobreexpresadas.

El término "conjugado" como se usa en la presente se refiere a una porción de fármaco o un derivado del mismo que está ligado a un agente de unión celular (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo) y se define por una fórmula genérica: $(D-L)_n-R$, en donde D es la porción de fármaco, L es enlazador, R es el agente de unión celular que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y n es un número entero el cual identifica el número de porciones de fármaco y enlazadores unidos a cada agente de unión celular. Un conjugado también se conoce como un "inmunoconjugado", un "conjugado de fármaco de anticuerpo" o un "ADC".

El conjugado de la presente invención es un conjugado de maitansinoide-anticuerpo monoclonal formado por la unión covalente de los residuos de lisina disponibles en el anticuerpo anti-FGFR3 (Anticuerpo 1), a enlazadores desdoblables (sulfo-SPDB) con el maitansinoide activo (DM4) unido al enlazador mediante una unión de disulfuro.

Los conjugados son compuestos que son ajustados para dirigir una población celular específica y suministrar una citotóxica potente dentro de la célula. Un conjugado

puede ser considerado un profármaco en que cuando se administra, es esencialmente no tóxico hasta que es internalizado en la célula anormal.

La carga promedio para una muestra de un conjugado es referida en la presente como la DAR, relación maitansinoide a anticuerpo "MAR" o "carga de fármaco". La DAR, como se usa en la presente, se refiere al número de moléculas de fármaco (*por ejemplo*, un maitansinoide) que están ligadas o unidas a un agente de unión celular (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-FGFR3). Mientras la DAR tiene un valor exacto para una molécula de conjugado específica (*por ejemplo*, n en la Fórmula (I)), se entiende que el valor a menudo será un valor promedio cuando se usa para describir una muestra que contiene muchas moléculas, debido a la presencia de diferentes moléculas de conjugado que tienen diferentes relaciones de fármaco a anticuerpo. En un aspecto el número de moléculas de fármaco que pueden ser unidos a un agente de unión celular puede promediar desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10. En un aspecto de la invención, la DAR promedia 2 hasta 8. En otros aspectos de la invención, la DAR promedia 2 hasta 5. En aún otro aspecto de la invención, la DAR promedia 3 hasta 5. En aún otro aspecto de la invención, la DAR promedia 3 hasta 4. En algunos aspectos, una DAR de 'aproximadamente n ' significa que el valor medido de DAR está dentro de $n \pm 0.5$. En un aspecto de la invención,

la DAR promedia 3.5 ± 0.5 . La actividad anti-tumoral del conjugado puede ser más eficaz como se compara con una carga de fármaco de un número disminuido de fármacos ligados al mismo agente de unión celular, mientras se incrementa el número de fármacos ligados puede mejorar la potencia, pero en el costo de propiedades farmacocinéticas alteradas por agente de unión celular. El método usado para conjugación y la metodología y técnicas para medir y calcular la DAR puede impactar el valor de DAR del compuesto.

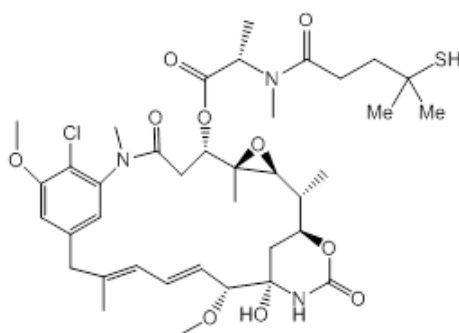
La consistencia y reproductibilidad del DAR asegura el suministro de una dosis y farmacocinéticas consistentes para un ADC especificado. Una DAR baja puede resultar en el desarrollo de un conjugado con actividad citotóxica inferior. Sin embargo, una DAR alta puede afectar la afinidad al receptor, unión al receptor y actividad de bloqueo así como también la estabilidad del conjugado *in vivo*.

Como se usa en la presente, el término "toxina" es cualquier sustancia capaz de tener un efecto adverso en el crecimiento o proliferación de una célula, resultando en la muerte celular de una célula, induciendo muerte celular, o en alguna manera disminuyendo la viabilidad celular. Como se usa en la presente, el término "citotoxina" o "agentes citotóxicos" incluye toxinas que son activadas en el citoplasma.

Como se usa en la presente, los términos "porción

de fármaco", "fármaco" o "carga útil" incluye toxinas, citotoxinas o agentes citotóxicos. Un tipo de porción de fármaco incluye la clase de maitansina de compuestos.

Como se usa en la presente, el término "maitansinoides", incluye compuestos dirigidos al microtúbulo de la citotoxina que inhiben la proliferación de células en la mitosis. Este incluye N2'-desacetil-N-2'(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina, conocida como "DM4" (Fórmula II):



(II)

Los maitansinoides son mostrados por ser 100 hasta 1000 veces más citotóxicos que los agentes quimioterapéuticos del cáncer convencionales. Aunque los maitansinoides altamente eficaces han probado ser también tóxicos cuando se administran a pacientes sistémicamente en ensayos de Fase 1. Sin embargo, cuando se administran como parte de un tratamiento objetivo tal como un conjugado, la naturaleza altamente citotóxica de los maitansinoides es suministrada directamente a células aberrantes o dañadas de este modo mitigando los efectos sistémicos, tóxicos en células sanas en

el cuerpo que no expresan en objetivo o antígeno. La ventaja es las dos partes. Primero, la citotoxicidad mayor permite la muerte celular más eficiente y viabilidad celular disminuida. Segundo, la mayor citotoxicidad puede permitir dosificaciones inferiores ser administradas con los mismos resultados con la célula. Esto proporciona una opción terapéutica más potente para pacientes con un espectro de evento adverso reducido.

Como se usa en la presente, el término "porción enlazadora" o "enlazador" se refiere a una porción química que actúa como un agente de unión que contacta un agente de unión celular a una porción de fármaco. Más específicamente, una porción enlazadora comprende un enlace covalente o átomos que unen covalentemente un agente de unión celular a una porción de fármaco. El enlazador puede ser cualquier compuesto puenteado que permite la liberación metabólica de la carga útil *dentro de* las células de cáncer y algunos promueven la eliminación celular transeúnte dependiente del metabolito subsecuente. Los enlazadores pueden ser susceptibles a, o ser sustancialmente resistentes a desdoblamiento inducido por ácido, desdoblamiento inducido por luz, desdoblamiento inducido por peptidasa, desdoblamiento inducido por esterasa, y desdoblamiento de enlace de disulfuro, a condiciones bajo las cuales el compuesto o el anticuerpo permanece activo.

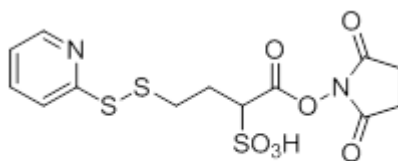
La porción de fármaco, por ejemplo, está ligada al

agente de unión celular, en la presente invención el Anticuerpo 1, el anticuerpo anti-FGFR3 del conjugado, a través de un enlace disulfuro. La molécula enlazadora o agente de reticulación comprende un grupo químico reactivo
5 que puede reaccionar con residuos de lisina u otros residuos del agente de unión celular. El grupo químico reactivo para reacción con el agente de unión celular puede ser *N*-succinimidil ésteres y *N*-sulfosuccinimidil ésteres. Adicionalmente la molécula enlazadora comprende un grupo
10 químico reactivo, el cual puede ser un grupo ditiopiridilo que puede reaccionar con la porción de fármaco para formar un enlace disulfuro.

Por ejemplo, el agente de unión celular puede ser modificado con reactivos de reticulación y el agente de unión
15 celular que contiene grupos tiol protegidos o libres de este modo derivado, entonces se hacen reaccionar con un maitansinoide que contiene disulfuro o tiol para producir conjugados. Los conjugados pueden ser purificados por cromatografía, que incluyen pero no se limitan a HPLC,
20 exclusión de tamaño, adsorción, intercambio iónico y captura de afinidad, diálisis o filtración de flujo tangencial.

Sulfo-SPDB o sSPDB (los cuales son usados intercambiabilmente en la presente), 4-(2-piridilditio)-2-sulfobutanoato de *N*-succinimidilo, Fórmula III, es un
25 enlazador desdoblable que permite al conjugado ser desdoblado

dentro de la célula objetivo en el citosol debido al ambiente intracelular de reducción. Fórmula III:



sulfo-SPDB (o sSPDB)

(III)

Como un enlazador desdoblable, el sulfo-SPDB permite la eliminación celular transeúnte mejorada por el fármaco libre dado por el procesamiento metabólico del conjugado para generar DM4, y S-metil-DM4. En la presente invención, el anticuerpo del conjugado se conecta al enlazador mediante un residuo de lisina expuesto a la superficie libre el cual a su vez se enlaza a la citocina del conjugado mediante un grupo tio. Cuando se conjuga con un maitansinoide, el metabolito cargado tiene hidrofobicidad disminuida, la cual disminuye la actividad de las bombas de flujo de salida del MDR y de este modo proporciona una oportunidad para la eliminación celular incrementada mediante la resistencia a fármacos múltiples específica del MDR-1 disminuida.

Como se usa en la presente, la expresión "ligado a un agente de unión celular" o "ligado a un anticuerpo o fragmento anti-FGFR3", se refiere a la molécula conjugada que comprende al menos un fármaco derivado unido a un agente de

unión celular, *por ejemplo*, anticuerpo anti-FGFR3 del Conjugado 1 mediante un grupo enlazante adecuado, o un precursor del mismo.

Las trayectorias metabólicas para los conjugados
5 varían, sin embargo, después de la internalización por células objetivo. Los conjugados de maitansinoides sufren degradación rápida del componente de unión celular en el lisosoma de pH bajo, resultando en la liberación de los productos metabólicos a partir del fármaco maitansinoide que
10 está unido mediante el enlazador a un aminoácido (un residuo de lisina) del agente de unión celular. En el caso de un conjugado ligado al disulfuro, tal como sulfo-SPDB-DM4, el residuo de lisina modificada por maitansinoide sufre reducción de disulfuro para liberar el fármaco que contiene
15 tiol, el cual puede entonces sufrir metilación, presumiblemente catalizada por una enzima de metiltransferasa intracelular para dar el S-metil-maitansinoide altamente potente (S-metil-DM4) o puede simplemente resultar en la producción de maitansina no modificada (DM4). Este fármaco
20 liberado es capaz de difundirse fuera de la célula y reducir la viabilidad de las células vecinas mediante lo que se ha definido y descrito como un efecto transeúnte. Dada la heterogeneidad objetivo observada para la mayoría de los receptores de la superficie celular, el fenómeno "transeúnte"
25 puede ser un mecanismo importante de eliminación de células

in vivo debido a que todas las células en una población tumoral pueden no expresar el antígeno al mismo grado.

Como se usa en la presente, el término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro
5 cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Las cadenas individuales pueden plegarse en dominios que tienen tamaños similares (110-125 aminoácidos) y estructuras, pero diferentes funciones. El anticuerpo puede ser abreviado en la
10 presente como "Ab".

La cadena ligera comprende un dominio variable (descrito en la presente como VL) y/o un dominio constante (abreviado en la presente como CL). Las cadenas ligeras de anticuerpos humanos (inmunoglobulinas) son ya sea cadenas
15 ligeras kappa (K) o cadenas ligeras lambda (λ). La expresión VL, como se usa en la presente, está propuesta para incluir tanto regiones variables de las cadenas ligeras tipo kappa (VK) como regiones ligeras de tipo lambda ($V\lambda$). La cadena pesada también puede comprender un dominio variable
20 (abreviado en la presente como VH) y/o, dependiendo de la clase o isotipo del anticuerpo, tres o cuatro dominios constantes (CH1, CH2, CH3 y CH4) (abreviados colectivamente en la presente como CH). En humanos, los isotipos son IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, con IgA e IgG además subdivididos en
25 subclases o subtipos (IgA1-2 e IgG1-4). La presente invención

incluye anticuerpos de cualquiera de las clases o subclases mencionadas anteriormente. El IgG1 humano es el isotipo preferido para los anticuerpos del conjugado de la presente invención.

5 Tres regiones, llamadas regiones hipervariables o determinantes de complementariedad (CDRs), se encuentran en cada una de las VL y VH, las cuales están soportadas por regiones menos variables llamadas de armazón (abreviadas en la presente como FR). Los aminoácidos son asignados a un
10 dominio o región del CDR particular de conformidad con la convención de Kabat (Kabat, *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)), convención de Chothia (Chothia, *et al.*, J Mol Biol.
15 1987; 196: 901-917. Chothia, *et al.*, Nature. 1989; 342: 877-883), y/u software de modelación de anticuerpo de AbM Molecular Oxford (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>). Cada VH y VL está compuesto de tres CDRs y cuatro FR, arregladas del término amino al término carboxi en el siguiente orden: FR1-
20 CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. La porción de un anticuerpo que consiste de dominios VL y VH es designada Fv (Fragmento variable) y constituye el sitio de unión al antígeno. El Fv de cadena única (scFv) es un fragmento de anticuerpo que contiene un dominio VL y un dominio VH en una cadena de
25 polipéptido, en donde el N-término de un dominio y el C-

término del otro dominio están unidos por un enlazador flexible.

El Anticuerpo 1, el agente de unión celular del conjugado de la presente invención es un anticuerpo monoclonal que tiene una cadena ligera lambda (λ). La estructura del anticuerpo del Conjugado 1 contiene el número típico de aproximadamente 100 residuos laterales de lisina libres en posiciones que permiten la conjugación con mínimo impedimento estérico. Es altamente específica a ambas formas de división del FGFR3 (FGFR3(IIIb) y FGFR3(IIIc)) y es internalizada después del enlace al FGFR3. Sin embargo, el Anticuerpo 1 tiene un punto isoeléctrico ligeramente inferior (pI) que la mayoría de los anticuerpos los cuales pueden afectar la estabilidad así como también los procesos de conjugación. Adicionalmente, el Anticuerpo 1 induce la degradación del receptor después de la unión al receptor del FGFR3 lo cual es en general visto como una desventaja. Con su pI inferior y cadena ligera lambda, el Anticuerpo 1 imparte retos únicos al compuesto. Debido a los cambios con la inestabilidad el conjugado ha probado ser de manera sorprendente, eficaz.

El término "aislado" se refiere a un anticuerpo, proteína, péptido o ácido nucleico el cual está libre o sustancialmente libre de otras especies macromoleculares encontradas en un ambiente celular. "Sustancialmente libre",

como se usa en la presente significa que el péptido de proteína o ácido nucleico de interés comprende más de 80% (en una base molar) de las especies macromoleculares presentes, preferiblemente más de 90% y más preferiblemente más de 95%.

5 Ejemplos de anticuerpos "aislados" incluyen un anticuerpo que ha sido purificado de afinidad, un anticuerpo que ha sido elaborado por un hibridoma u otra línea celular *in vitro*, y un anticuerpo humano derivado de un ratón transgénico.

El término "anticuerpo desnudo," como se usa en la
10 presente, se refiere a un material de anticuerpo no conjugado.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *por*
15 *ejemplo*, los anticuerpos individuales que comprenden la población son sustancialmente idénticos excepto por las mutaciones posibles que se originan naturalmente o variaciones menores post-traduccionales que pueden estar presentes. Los anticuerpos monoclonales son altamente
20 específicos, son dirigidos contra un sitio antigénico único (también conocido como determinante o epítopo). Además, contrario a las preparaciones convencionales de anticuerpo (policlonal) las cuales típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes, cada
25 anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único

en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo siendo obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no está siendo construido como requerir la producción del anticuerpo por cualquier método particular. El anticuerpo molecular puede ser abreviado en la presente como "mAb."

El término "anticuerpo humano", como se usa en la presente, incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes que corresponden a secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (como se describe en Kabat *et al.*, *supra*). Los anticuerpos humanos del conjugado de la presente invención pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal (*por ejemplo*, mutaciones introducidas por mutagénesis de sitio específico o aleatoria *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), *por ejemplo* en las CDRs. El anticuerpo humano puede tener al menos una posición reemplazada con un residuo de aminoácido, *por ejemplo*, un residuo de aminoácido que mejora la actividad la cual no es codificada por la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en la presente, no está propuesto para incluir anticuerpos en los cuales las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamífero, tal como un ratón, han sido injertadas sobre las secuencias de armazón

humana. Los métodos para producir un "anticuerpo humano", como se usan en la presente, no están propuestos para incluir anticuerpos producidos en un ser humano.

La frase "anticuerpo humano recombinante" incluye
5 anticuerpos humanos que son preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedera, anticuerpos aislados a partir de un recombinante, biblioteca de anticuerpo humano
10 combinatorial, anticuerpos aislados a partir de un animal que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana, o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquiera de otros medios que involucren división de secuencias de gen de inmunoglobulina humana a otras
15 secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana.

De este modo, los anticuerpos del conjugado en la presente invención incluyen, pero no se limitan a,
20 anticuerpos aislados, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos recombinantes, anticuerpos monoclonales, porciones especificadas y variantes de los mismos; cada uno contiene al menos una CDR.

La especificidad de los anticuerpos o fragmentos de
25 los mismos puede ser determinada con base en la afinidad. La

afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con un anticuerpo (K_D), mide la resistencia a la unión entre un determinante antigénico y un sitio de unión al anticuerpo. La afinidad puede ser medida
5 por ejemplo, por resonancia de plasmó de superficie.

Los anticuerpos, o fragmentos de los mismos de la invención, se unen a un epítipo del FGFR3 localizado en los segmentos del dominio extracelular (posteriormente referido simplemente como "dominios" o "ECD"). El término "epítipo"
10 como se usa en la presente se refiere a sitios tridimensionales, discretos, en un antígeno que son reconocidos por los anticuerpos de la invención.

Además de los anticuerpos descritos específicamente en la presente, otros anticuerpos modificados
15 "sustancialmente homólogos" pueden ser fácilmente diseñados y manufacturados utilizando varias técnicas de ADN recombinante bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, las regiones de armazón pueden variar desde las secuencias nativas al nivel de estructura primaria por varias
20 sustituciones, adiciones terminales e intermediarias y supresiones de aminoácido, y similares. Sin embargo, una variedad de diferentes regiones de armazón puede ser usada individualmente o en combinación como una base para las inmunoglobulinas humanizadas incluidas en la presente
25 invención. En general, las modificaciones de los genes pueden

ser fácilmente realizadas por una variedad de técnicas bien conocidas, tales como mutagénesis de sitio dirigido.

La presente invención incluye secuencias de ácido nucleico que codifican un componente de anticuerpo anti-FGFR3
5 de la cadena pesada del conjugado, que comprende cualquiera de las regiones de VH o una porción de las mismas, o cualquiera de las CDR de VH, que incluyen cualquiera de las variantes de la misma, como se describe en la presente. El componente de anticuerpo del conjugado de la presente
10 invención incluye anticuerpos que comprenden las mismas regiones CDR del Anticuerpo 1, y/o la misma región variable de cadena ligera y/o región variable de cadena pesada del Anticuerpo 1.

Los anticuerpos del Conjugado 1 pueden ser
15 producidos por métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen el método inmunológico descrito por Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975); *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 13 (Burdon *et al.* eds., Elsevier Science Publishers, Amsterdam) en
20 *Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas* (Campbell ed., 1984); así como también por el método de ADN recombinante descrito por Huse *et al.*, *Science* 246: 1275-1281 (1989). Los anticuerpos del Conjugado 1 también pueden ser
25 obtenidos a partir de bibliotecas que portan combinaciones de

dominios VH y VL en la forma del fragmento de unión del antígeno o scFv (Fab). Los dominios VH y VL pueden ser codificados por nucleótidos que son sintéticos, parcialmente sintéticos, o naturalmente derivados. La presente invención
5 puede ser elaborada por bibliotecas de despliegue de fago que portan fragmentos de anticuerpo humano. Otras fuentes de anticuerpos humanos son ratones transgénicos diseñados por ingeniería para expresar los genes de inmunoglobulina humana.

Se entiende que los residuos de aminoácido que son
10 determinantes primarias de unión de anticuerpos de dominio único pueden estar dentro de Kabat, Chothia, AbM, o una combinación de los mismos definidos como CDRs, pero pueden incluir otros residuos también, tales como, por ejemplo, residuos que podrían de otro modo ser enterrados en la
15 interfaz de VH-VL de un heterodímero de VH-VL.

Las células hospederas preferidas para transformación de vectores y expresión de los anticuerpos del Conjugado 1 son células de mamífero, *por ejemplo*, células NS0 (células de mieloma de ratón (0) no secretantes), células
20 293, SP20 y CHO y otras líneas de células de origen linfoide tales como linfoma, mieloma, o células de hibridoma. Otros hospederos eucarióticos, tales como levaduras, pueden ser alternativamente usados.

Los anticuerpos pueden ser aislados o purificados
25 por cualquier método conocido en la técnica, que incluye

precipitación por sulfato de amonio o sulfato de sodio
seguido por diálisis contra salina, cromatografía de
intercambio iónico, cromatografía de afinidad o
inmunoafinidad, así como también filtración en gel o
5 electroforesis de zona. Un método preferido de purificación
para los anticuerpos del Conjugado 1 es cromatografía de
afinidad de la Proteína A.

Los Maitansinoides pueden ser sintetizados por
técnicas que incluyen, pero no se limitan a, aquellas
10 detalladas en las Patentes Estadounidenses Nos. 7,432,088,
7,301,019, 7,598,375, RE39,151 y 7,411,063.

Los conjugados de la presente invención pueden ser
preparados por una variedad de métodos conocidos en la
técnica, tales como aquellos descritos en las Patentes
15 Estadounidenses Nos. 7,811,572, 8,383,122, 6,441,163,
7,368,565, 7,811,572, 8,163,888, y publicaciones de solicitud
Estadounidense 2011/0003969, 2011/0166319, 2012/0253021 y
2012/0259100.

Una forma alternativa para preparar los conjugados
20 de la presente invención es concentrar el anticuerpo a 30
mg/mL y diafiltrar en el amortiguador de reacción (50 mM de
EPPS, 20mM de cloruro de sodio, 2 mM de EDTA, pH 8.2) por 10
diavolumenes, y se concentró además a 45 g/L. Una relación
molar 1.2 de DM4 (12mM) con relación a sulfo-SPDB (10 mM) se
25 hizo reaccionar con una relación molar de 4.68 de sulfo-SPDB

con relación al anticuerpo en 167 mM de EPPS, 66.7 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, pH 8.2 y 70.0% (v/v) de DMA. La reacción *in situ* se llevó a cabo por 10 ± 4 horas a $20 \pm 3^\circ\text{C}$, después se agregó al anticuerpo con DMA para lograr una concentración final de anticuerpo de 20 mg/mL en 50 mM de EPPS, 20mM de NaCl, 2 mM de EDTA, pH 8.2 ± 0.2 y 5.0% de DMA (v/v). La reacción de conjugación se llevó a cabo a $20.0 \pm 3.0^\circ\text{C}$ por 16 ± 8 horas. Después de la reacción, la mezcla de conjugación se ajustó a pH rápidamente a 5.0 por adición de 6.5% (v/v) de ácido acético 1M. La mezcla de pH ajustado se concentró a 20 mg/mL, y se diafiltró contra el amortiguador de formulación basal (10 mM de Acetato, pH 5.0 ± 0.1) por 16 diavolúmenes. El conjugado purificado se formuló a 5.0 mg/mL en 10 mM de Acetato, 9% (p/v) de Sacarosa, 0.01% (p/v) de Polisorbato-20 (Tween-20), pH 5.0, usando soluciones base concentradas de sacarosa (45%, p/v) y polisorbato-20 (10%, p/v).

El número de moléculas maitansinoides unidas por molécula de anticuerpo puede ser determinado midiendo espectrofotométricamente la relación de la absorbancia a 252 nm y 280 nm. La espectrometría de masas permite ser monitoreada la reproducibilidad del proceso de conjugación. El número promedio de moléculas maitansinoides al anticuerpo puede ser, por ejemplo, 1 - 10, 2 - 8, 2 - 5, 3 - 5, 3 - 4, o 3.5 ± 0.5 .

Para producir un producto conjugado comercialmente

viable, el proceso de conjugación e intercambio de amortiguador debe ser eficiente. Durante el desarrollo del Conjugado 1, se encontró que el compuesto tiene cambios de solubilidad y tiende a precipitar de la solución cuando se
5 utilizan amortiguadores de conjugación comúnmente usados. Los factores tales como la carga de superficie pura y el punto isoeléctrico (pI) (el punto donde la molécula es neutral o no tiene carga pura), pueden alterar la solubilidad de la molécula y pueden crear un problema de estabilidad resultando
10 en precipitación. Numerosos intentos usando una variedad de métodos resultan en material conjugado que incluye agregados y precipitación. Los niveles de tolerancia de agregación y precipitación dependen del uso del compuesto; los niveles de tolerancia son a menudo inferiores para materiales propuestos
15 para ensayos clínicos o producción comercial. Se desconoce cuáles característica, o características del Conjugado 1 pueden haber causado estos problemas. Para el Conjugado 1, la conjugación a pH básico probó ser estimulante debido a la diferencia en intensidad iónica requerida para mantener la
20 solubilidad del anticuerpo y conjugado en el pH de la reacción y el pH de la formulación. Específicamente, el Anticuerpo 1 precipita en amortiguador de baja intensidad iónica a pH básico usado para la reacción, mientras el Conjugado 1 precipita en amortiguador de alta intensidad
25 iónica, a un pH ácido usado para la formulación del

conjugado. El amortiguador de conjugación requiere suficiente intensidad iónica para permitir el intercambio de amortiguador del Anticuerpo 1 en el amortiguador de reacción a pH básico, pero bastante bajo para permitir el intercambio de amortiguador del Conjugado 1 en amortiguador de formulación a pH ácido. Alternativamente, la dilución de la mezcla de reacción puede ser usada para reducir la intensidad iónica al nivel requerido. Eventualmente, después del diseño por ingeniería significativa, se encontró que el Conjugado 1 requiere un balance entre el pH y la sal para que la reacción vaya a terminación para generar un compuesto estable y activo que no precipita de la solución ni requiere otros aditivos o técnicas menos deseables para mantener la solubilidad.

Los conjugados comprendidos de la carga útil de maitansina pueden ser evaluados por su capacidad para suprimir o eliminar células proliferantes mediante la actividad mediada por el objetivo y/o no específicamente *in vitro*. Por ejemplo, las líneas celulares tales como NCI-H226, NCI-H292, y NCI-H322M, pueden ser fácilmente usadas para la evaluación de citotoxicidad no objetivo del conjugado. Las células a ser evaluadas pueden ser expuestas a los compuestos por 4 hasta 5 días y las fracciones supervivientes de las células medidas en ensayos directos por métodos conocidos. Los valores IC_{50} pueden entonces ser calculados a partir de los resultados de los ensayos. La actividad citotóxica

mediada por el objetivo del Conjugado 1 también puede ser evaluada usando líneas de células que expresan diferentes niveles del antígeno del FGFR3.

En algunos aspectos, los conjugados son capaces de
5 reducir el volumen del tumor como se mide por % de T/C como se define más completamente abajo.

Un método para tratar el crecimiento del tumor en un mamífero administrando al mamífero una dosis eficaz de un conjugado, también se proporciona por la presente invención.
10 Las condiciones adecuadas para tratamiento de conformidad con la presente invención involucran células tumorales que expresan preferencialmente el FGFR3. Mientras no se pretenda ser ligado por cualquier mecanismo particular, los presentes métodos se proporcionan para el tratamiento del crecimiento
15 de células de cáncer que incluyen por ejemplo, aquellas en las cuales el crecimiento neoplásico, metástasis ósea, rechazo al trasplante de órgano o un trastorno inmune tal como una enfermedad autoinmune, las cuales son accionadas por o involucran la expresión del FGFR3.

20 "Tratamiento" o "tratar," en el contexto de la presente invención, se refiere a tratamiento terapéutico que incluye reducir, disminuir o invertir el proceso de la condición fundamental o cambio fisiológico indeseado asociado con una enfermedad o trastorno, o aliviar los síntomas
25 clínicos de una condición. Los resultados clínicos benéficos

o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de una enfermedad o trastorno, estabilización de una enfermedad o trastorno (es decir, donde la enfermedad o trastorno no empeoran), retardo
5 o disminución del progreso de una enfermedad o trastorno, alivio o paliación de la enfermedad o trastorno, y remisión (sea parcial o total) del trastorno o enfermedad, sea detectable o no detectable. El tratamiento también puede significar prolongar la supervivencia ya comparada con la
10 supervivencia esperada si no recibe tratamiento. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con la enfermedad. En un aspecto, la presente invención puede ser usada como un medicamento.

En los métodos de la presente invención, una
15 cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado de la invención se administra a un mamífero o paciente en necesidad del mismo. Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado de la invención. Una "cantidad
20 terapéuticamente efectiva" o "dosis efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a dosificaciones y por periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva del conjugado puede variar de conformidad con los factores tales como el
25 estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la

capacidad del conjugado para provocar una respuesta deseada en el individuo. Otros factores incluyen administración, sitio objetivo, estado fisiológico del paciente, si el paciente es un humano o un animal, y otras medicaciones administradas. Aunque los compuestos de la invención son particularmente útiles para administración a humanos, pueden ser administrados a otros mamíferos también. El término mamífero como se usa en la presente, está propuesto para incluir, pero no se limita a, humanos, animales de laboratorio, mascotas domésticas y animales de granja. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en la cual cualquiera de los efectos tóxicos o perjudiciales del conjugado son compensados por los efectos terapéuticamente benéficos.

Los regímenes de dosificación pueden ser ajustados para proporcionar la respuesta óptima deseada (*por ejemplo*, una respuesta terapéutica). Las dosificaciones de tratamiento pueden ser tituladas usando métodos de rutina conocidos por aquellos de habilidad en la técnica para optimizar la seguridad y eficacia. Los esquemas de dosificación, para administración intravenosa (*i.v.*) o no intravenosa, localizada o sistémica, o combinaciones de las mismas, típicamente variarán desde una dosificación de bolo único o infusión continua hasta múltiples administraciones por día (*por ejemplo*, cada 4-6 horas), o como se indica por el

especialista tratante y las condiciones del paciente. Un intervalo no limitante, ejemplar, para una cantidad terapéuticamente efectiva del Conjugado 1 es 0.1-50 mg/kg, más preferiblemente 3-35 mg/kg, y más preferiblemente 5-20 mg/kg. Las cantidades y frecuencias de dosificación serán determinadas por los especialistas que tratan al paciente y pueden incluir dosis desde menos de 1 mg/kg a más de 100 mg/kg dadas diariamente, tres veces por semana, semanalmente, una vez cada dos semanas o menos frecuente. Se debe de notar, sin embargo, que la presente invención no está limitada a cualquier dosis particular.

El conjugado puede ser administrado en combinación con uno o más de otros tratamientos anti-cancerígenos, que incluyen pero no se limitan a, un agente anti-angiogénico, un agente quimioterapéutico, y un agente anti-neoplásico. Cualquier agente anti-cancerígeno adecuado puede ser usado, tal como un agente quimioterapéutico, radiación, anticuerpo o combinaciones de los mismos.

Los agentes anti-cancerígenos incluyen, pero no se limitan a, agentes anti-neoplásicos, anticuerpos, adyuvantes y profármacos. Los agentes anti-neoplásicos los cuales son actualmente conocidos en la técnica, o son evaluados, pueden ser agrupados en una variedad de clases que incluyen, por ejemplo, inhibidores mitóticos, agentes de alquilación, anti-metabolitos, antibióticos intercalantes, inhibidores del

factor de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de topoisomerasa, agentes anti-supervivencia, modificadores de la respuesta biológica, anti-hormonas y agentes anti-angiogénicos. Ejemplos de agentes de
5 alquilación incluyen, pero no se limitan a, cisplatino, ciclofosfamida, melfalano, y dacarbazina. Ejemplos de anti-metabolitos incluyen, pero no se limitan a, doxorubicina, daunorubicina, paclitaxel, gemcitabina, ALIMTA® e inhibidores de topoisomerasa que incluyen irinotecano (CPT-11),
10 aminocamptotecina, camptotecina, DX-8951f, topotecano (topoisomerasa I), etopósido (VP-16), y tenipósido (VM-26) (topoisomerasa II). Cuando el agente anti-neoplásico es radiación, la fuente de radiación puede ser ya sea externa (terapia de radiación de haz externo - EBRT) o interna
15 (braquiterapia - BT) el paciente siendo tratado. La dosis de agente anti-neoplásico administrada depende de numerosos factores, que incluyen, por ejemplo, el tipo de agente, el tipo y severidad del tumor siendo tratado, y la ruta de administración del agente. Se debe enfatizar, sin embargo,
20 que la presente invención no está limitada a cualquier dosis o régimen de dosificación particular. En un aspecto, el cisplatino es un agente anti-neoplásico preferido de la invención.

El conjugado de la invención podría también ser
25 administrado con inhibidores de anticuerpo y/o molécula

pequeña que inhiben y/o modulan otros receptores de la superficie celular involucrados en el crecimiento tumoral o angiogénesis. El conjugado también puede ser administrado en combinación con uno o más adyuvantes adecuados, tales como, por ejemplo, citocinas (IL-10, IL-4 e IL-13) u otros moduladores inmunes, tales como, pero no limitados a, quimiocina, antígenos y péptidos asociados al tumor.

En la presente invención, cualquier método o ruta adecuada puede ser usado para administrar el conjugado de la invención, y opcionalmente, co-administrar los agentes anti-neoplásicos y/o antagonistas de los otros receptores. En una terapia de combinación de la presente invención, el conjugado puede ser administrado simultáneamente, separadamente o secuencialmente con otro agente, que incluye pero no se limita a cisplatino. Los regímenes del agente anti-neoplásico utilizados de conformidad con la invención incluyen cualquier régimen que se cree es óptimamente adecuado para el tratamiento de la condición neoplásica del paciente. Diferentes males pueden requerir el uso de conjugados anti-tumorales específicos y agentes anti-neoplásicos específicos, los cuales serán determinado en un paciente en base al paciente. Las rutas de administración incluyen, por ejemplo, administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, o intramuscular. La dosis y frecuencia de dosis de antagonista administrado depende de numerosos factores,

que incluyen, por ejemplo, el tipo de antagonistas, el tipo y severidad del tumor a ser tratado y la ruta de administración de los antagonistas. Se debe enfatizar, sin embargo, que la presente invención no está limitada a cualquier método o ruta
5 de administración particular.

El conjugado de la invención, donde se usa en un mamífero para el propósito de tratamiento, es preferiblemente formulado como composiciones farmacéuticas. Tales composiciones farmacéuticas y procesos para preparar las
10 mismas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro A., et al., eds., 19th ed., Mack Publishing Co., 1995).

Los niveles de expresión del FGFR3 del paciente pueden ser comparados con los niveles de expresión umbral del
15 FGFR3. Estos niveles de umbral se pueden tomar a partir de una variedad de fuentes, que incluyen pero no se limitan a, modelos animales de cáncer, datos de microarreglo de tumor del paciente o niveles vistos en una población de control que incluye una población de paciente de control.

20 Los niveles de expresión del FGFR3 pueden ser medidos en una variedad de métodos que incluyen kits comercialmente disponibles. La medición de los niveles de expresión del FGFR3 puede incluir, pero no se limitan a, medición de la proteína o ARNm. En una de tal técnica, los
25 estándares o muestras del FGFR3 se agregan a una placa pre-

cubierta con anticuerpos al ECD FGFR3 humano para permitir la unión del FGFR3 a los anticuerpos. Después del lavado del FGFR3 no unido y otras proteínas, se agrega un anticuerpo anti-FGFR3 etiquetado con peroxidasa de rábano picante que
5 reconoce el ECD del FGFR3. El anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano picante emite un color azulado cuando el sustrato se agrega a las cavidades. La intensidad del color por supuesto se refiere a la cantidad del FGFR3 unido específicamente a la placa.

10 En una segunda de tal técnica usada para medir el FGFR3 en tejidos o células tumorales, los estándares generados a partir de las células diseñadas por ingeniería para expresar establemente un nivel predefinido del FGFR3, las células que son negativas para el FGFR3 y/o muestras del
15 mamífero o paciente, son preparadas a partir de teñido inmunohistoquímico. Los tejidos o células son sumergidos en parafina fijada con formalina. Los tejidos fijados son preparados por teñido inmunohistoquímico en las laminillas. Las laminillas son incubadas con anticuerpos primarios al
20 FGFR3 humano. Después de lavar separado anticuerpos no unidos, un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo primario y es etiquetado con peroxidasa de rábano picante se incuba en la laminilla. El anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano picante emite un color azulado cuando el
25 sustrato es agregado a la laminilla. La intensidad del color

por supuesto se refiere a la cantidad del FGFR3 encontrada en la laminilla del tejido.

Los niveles de fusión total del FGFR3-TACC3 pueden ser medidos de manera similar. Los estándares o muestras del
5 FGFR3-TACC3 son agregados a una placa pre-cubierta con anticuerpos a ECD FGFR3 humano para permitir la unión del FGFR3-TACC3 a los anticuerpos. Después del lavado el FGFR3-TACC3 no unido y otras proteínas, se agrega un anticuerpo secundario que reconoce los dominios de la proteína TACC3 que
10 son translocados a la proteína del FGFR3. El anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano picante emite un color azulado cuando el sustrato se agrega a las cavidades. La intensidad del color por supuesto se refiere a la cantidad del FGFR3-TACC3 encontrada en la placa.

15 La identificación del estado mutacional del FGFR3 del paciente puede ser medida en una variedad de métodos que incluyen kits comercialmente disponibles. En una de tal técnica, las células o muestras de tejido son sometidas a lisis y el ADN es aislado. El ADN aislado es lavado con 70%
20 de etanol, secado y resuspendido en agua. Las muestras de ADN son entonces puestas en una reacción de PCR con cebadores específicamente diseñados para amplificar las regiones del gen del FGFR3 conocido por contener las mutaciones de interés. El producto de PCR resultante es purificado y
25 secuenciado. El FGFR3 también puede ser identificado a través

de la PCR en tiempo real, siguiente generación de secuenciamiento, u otros métodos genómicos o detección.

La identificación del estado de fusión del FGFR3-TACC3 puede ser medida en una variedad de métodos que incluyen kits comercialmente disponibles. En tales técnicas las muestras de células o tejidos son sometidas a lisis y el ARN total es aislado. El ARN total aislado es entonces usado para sintetizar ADNc. Los cebadores de PCR específicos diseñados para amplificar la región que contiene la secuencia de fusión del FGFR3-TACC3 son entonces usados con el ADNc en una reacción de PCR. La reacción de PCR se corre entonces en un gel usado para separar el producto de PCR. El gel se corre con estándares generados a partir de líneas de células transfectadas que albergan la fusión. La fusión FGFR3-TACC3 puede también ser detectada con PCR en tiempo real estándar y ensayos de hibridización *in situ* fluorescente (FISH).

Las mediciones y detección de los niveles de expresión del FGFR3, mutaciones del FGFR3, fusiones del FGFR3, o combinaciones de los mismos, pueden ser completadas simultáneamente, separadamente o secuencialmente. Las mediciones o detección pueden ocurrir en una variedad de técnicas que incluyen PCR de alto rendimiento multimodal.

La presente invención también incluye kits para inhibir el crecimiento tumoral y/o angiogénesis que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un

conjugado. Los kits pueden comprender además el conjugado y un agente anti-cancerígeno adicional, que incluye agentes o tratamientos anti-neoplásicos, que incluyen pero no se limitan a cisplatino. Alternativamente, o además, los kits
5 pueden contener cualquier antagonista adecuado de, por ejemplo, otro receptor del factor de crecimiento involucrado en la tumorigénesis o angiogénesis discutida *abajo* que incluye el EGFR. Los kits de la presente invención pueden comprender además un adyuvante.

10 Por consiguiente, el Conjugado 1 puede ser usado *in vivo* e *in vitro* para métodos investigativos, de diagnóstico o tratamiento, los cuales son bien conocidos en la técnica. Las variaciones en los principios de la invención aquí descrita pueden ser elaboradas por un experto en la técnica y se
15 pretende que tales modificaciones estén siendo incluidas dentro del alcance de la presente invención.

Se entiende y se espera que las variaciones en los principios de la invención aquí descrita puedan ser elaboradas por un experto en la técnica y se pretende que
20 tales modificaciones estén siendo incluidas dentro del alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran además la invención, no se deben construir para limitar el alcance de
25 la invención en cualquier forma. Las descripciones detalladas

de los métodos convencionales, tales como aquellos empleados en la construcción de vectores y plásmidos, la inserción de genes que codifican polipéptidos en tales vectores y plásmidos, la introducción de plásmidos en células hospederas, y la expresión y la determinación de los mismos de genes y productos se puede obtener a partir de numerosas aplicaciones, que incluyen Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) y Coligan, J. et al. Current Protocols in Immunology, Wiley & Sons, Incorporated (2007).

Expresión y Purificación de Anticuerpos Anti-FGFR3 Humanos por el Conjugado 1

Para cada anticuerpo, se diseñó por ingeniería una secuencia de nucleótido de cadena pesada adecuada, por ejemplo la SEQ ID NO. 12 para el Anticuerpo 1 en un plásmido de expresión adecuada, por ejemplo pGSHC, y se diseñó por ingeniería una secuencia de nucleótido de cadena ligera adecuada, por ejemplo SEQ ID NO. 13 para el Anticuerpo 1 en un plásmido de expresión adecuada, tal como pGSLC, por un método adecuado tal como clonación por PCR. Para establecer una línea de células estables, se co-transfectó en una línea de células hospederas estables, tales como células NS0 o CHO, con plásmidos de cadena ligera y pesada linealizados por electroporación y cultivo en medio adecuado tal como Medio Eagle Modificado de Dulbecco libre de glutamina con suero

bovino fetal dializado y suplemento de glutamina sintetasa. Se seleccionaron clones para la expresión del anticuerpo por un ensayo inmunsorbente ligado a la enzima (ELISA) y se seleccionó el productor más alto para cultivo en matraces de 5 centrifugación. Se purificaron los anticuerpos por un método adecuado tal como cromatografía de afinidad de proteína-A.

La Tabla 1 proporciona las secuencias de aminoácido y SEQ ID NOs del Anticuerpo 1 del Conjugado 1 de la presente invención. Todas las secuencias de la CDR son determinadas 10 usando la definición AbM.

15

20

25

TABLA 1: Secuencia de Aminoácido del Anticuerpo 1 del Conjugado 1 de la presente invención

		Cadena pesada	SEQ ID NO.	Cadena ligera	SEQ ID NO.
5	CDR1	GYMFTSYGIS	1	GGNNIGDKSVH	4
	CDR2	WVSTYNGDTNYAQKFQG	2	LDTERPS	5
	CDR3	VLGYYSIDGYYYGMDV	3	QVWDSGSDHVV	6
10	Región variable	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYMFTSYGISWVRQ APGQGLEWMGWVSTYNGD TNYAQKFQGRVTVTDDTSTS TAYMELRSLRSEDATVYYCA RVLGYYSIDGYYYGMDVW GQGTTVTVSS	7	QSVLTQPPSLSVAPGKTATFT CGGNNIGDKSVHWYRQKPGQ APVLVMYLDTERPSGIPERMS GSNFGNTATLTITRVEAGDEAD YYCQVWDSGSDHVVFGGGTK LTVLG	8
	Longitud completa	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYMFTSYGISWVRQ APGQGLEWMGWVSTYNGD TNYAQKFQGRVTVTDDTSTS TAYMELRSLRSEDATVYYCA RVLGYYSIDGYYYGMDVW GQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	9	QSVLTQPPSLSVAPGKTATFT CGGNNIGDKSVHWYRQKPGQ APVLVMYLDTERPSGIPERMS GSNFGNTATLTITRVEAGDEAD YYCQVWDSGSDHVVFGGGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEE LQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPA ECS	10
15					
20					

Método para Conjugación del Conjugado 1

El conjugado de la presente invención se puede preparar por una variedad de métodos conocidos en la técnica, tal como aquellos descritos en las Patentes Estadounidenses Nos. 7,811,572, 8,383,122, 6,441,163, 7,368,565, 8,163,888 y 5 Publicación de Solicitud Estadounidense Nos. 2011/0003969, 2011/0166319, 2012/0253021 y 2012/0259100. Los métodos descritos anteriormente varían en la cantidad de rendimiento, pureza, monómeros, agregados, porcentaje de Maitansinoide 10 libre, fragmentación, etc., de estos resultados. La selección de un método de conjugación apropiado depende de los requerimientos del usuario final.

En un aspecto de la invención, se conjugó el Anticuerpo 1 a DM4 usando el enlazador sulfo-SPDB usando el 15 método general establecido en 2012/0253021 para el proceso de "una etapa". Más específicamente, se concentró el Anticuerpo 1 a 10 mg/ml y se diafiltró en el amortiguador de reacción. Se mezcló el Anticuerpo 1 a 10 mg/ml con DM4 5.6 moles en relación al anticuerpo en el amortiguador con ácido 4-(2- 20 hidroxietil)-1-piperazinpropansulfónico (EPPS) 50 mM, cloruro de sodio 20 mM, EDTA 2 mM a pH 8.2 complementado con 9% de DMA (v/v). Se conjugó el Anticuerpo 1 en esta mezcla agregando 5.1 mol de sulfo-SPDB y se hizo reaccionar a 15°C por 20 horas. Se ajustó el pH de la mezcla de conjugación a 25 5.0 con ácido acético concentrado a 20 mg/ml, se diafiltró

contra 12 diavolúmenes de amortiguador que contiene acetato de sodio 10 mM a pH 5.0. Se formuló el conjugado a 5.0 mg/ml en amortiguador que contiene acetato 10 mM, 9% de sacarosa (p/v), 0.01% (p/v) de polisorbato 20, pH 5.0.

5

Determinación UV de DAR del Conjugado 1

Se evaluó el DAR de DM4 al Anticuerpo 1 en el Conjugado 1, usando el material del Conjugado 1 como se preparó anteriormente usando absorción ultravioleta.

Se calculó DAR midiendo la absorción del conjugado a 252 nm y 280 nm. Usando el coeficiente de extinción para tanto DM4 como para el anticuerpo a estas longitudes de onda, se midió la concentración de DM4 y anticuerpo total en la solución. El DAR se definió por la relación de moles de DM4/moles del anticuerpo.

15

Se determinó la muestra usando un espectrómetro DU800 Beckman Coulter® midiendo la absorción de la solución de conjugado a 280 nm y 252 nm en un tubo de cuarzo de longitud de trayectoria de 1 cm. Se registró una medición en una región no absorbente (320 nm) para asegurar que la dispersión de luz no impacta la lectura de absorción a las longitudes de onda objetivo. Se diluyeron las muestras con amortiguador de tal forma que la absorbancia a 280 nm resulta en el intervalo lineal del instrumento (objetivo de absorbancia 0.7-1.5 (o 0.5 a 0.9 g/l)), y el factor de dilución apropiado se usa en el cálculo de la concentración.

25

Se determinó la concentración por las siguientes ecuaciones:

Ecuación (1) Concentración molar de DM4, $C_{DM4}(M)$:

$$C_{DM4}(M) = \frac{A_{252} - 0.35 \times A_{280}}{24166}$$

5

Ecuación (2) Concentración molar del Conjugado 1,

$C_A(M)$:

$$C_A(M) = \frac{A_{280} - 5323 \times C_{DM4}}{240,360} \text{ o } C_A(M) = \frac{4.89 \times A_{280} - A_{252}}{1,091,234}$$

10

Ecuación (3) Concentración del Conjugado 1

$C_A(\text{mg/ml})$:

$$C_A(\text{mg/mL}) = C_A(M) \times 145,600$$

15

Ecuación (4) Relación Maitansinoide a Anticuerpo,

DAR:

$$\text{DAR} = \frac{C_{DM4}(M)}{C_A(M)}$$

Abreviaturas:

20

C_{DM4} : Concentración de DM4

C_A : Concentración del Anticuerpo 1

DAR: Relación Maitansinoide a anticuerpo

A_{280} : Absorbancia a 280 nm

A_{252} : Absorbancia a 252 nm

25

ϵ_{280} : Coeficiente de extinción a 280 nm

ϵ_{252} : Coeficiente de extinción a 252 nm

Constantes para DM4:

$$\epsilon_{DM4,252}: 26010 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{DM4,280}: 5323 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

5 Relación de Coeficiente de extinción 252nm/280nm,

$$\epsilon_{252}/\epsilon_{280}: 4.89$$

Peso molecular: 780.4 g/mol

Constantes para el anticuerpo D11:

$$\epsilon_{A,280}: 1.7 \text{ mL}/(\text{mg}\cdot\text{cm}) \text{ o } 240,360 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

10 Relación de Coeficiente de extinción 252nm/280nm,

$$\epsilon_{252}/\epsilon_{280}: 0.35$$

Peso Molecular: 145.6 kDa

La ecuación 1 determina la concentración de DM4 en la solución sustrayendo la absorción debido al anticuerpo a
15 252 nm. La ecuación 2 determina la concentración del anticuerpo sustrayendo la absorción debido al DM4. La DAR es determinada calculando la relación de las concentraciones de DM4 y del anticuerpo (ecuación 4).

Se determinó el monómero por HPLC por exclusión de
20 tamaño, en forma isocrática con fosfato de potasio 170 mM, cloruro de potasio 212 mM, pH 7.0, complementado con 15% de isopropanol. Se inyectó 150 μg del conjugado. Se monitoreó la elución a 280 nm. Se calcularon los agregados como el área sumada de todos los picos eluidos antes del pico principal.
25 Se calcularon las especies de peso molecular bajo como el

área sumada de todos los picos resueltos eluidos después del pico principal.

Se midieron los niveles de maitansinoide libre por HPLC de columna SEC doble/fase inversa. Se preparó la solución conjugada con 20% de acetonitrilo, incubada a temperatura ambiente por 30 minutos, y se almacenó a 5°C antes del análisis. Se inyectó el conjugado en una columna de exclusión por tamaño (SEC), en donde el anticuerpo conjugado se lavó a través de la columna. Una vez que el conjugado se eluyó, se redirigió el efluente de la columna a una columna C-18, en donde las moléculas pequeñas restantes se unen, y se eluyen por un programa de gradiente (20% de acetonitrilo con 0.1% de TFA/80% de agua con 0.1% de TFA) durante 35 minutos. Se sumaron las áreas de picos. Se determinó el contenido de DM4 usando el traslape de una curva estándar. El porcentaje de maitansinoide libre es la relación de moles de DM4 libre (determinado por este método HPLC en columna doble) sobre moles de DM4 total (se determinó por el método DAR UV) multiplicado por 100.

20

TABLA 2: DAR

Rendimiento	89.2%
Concentración	4.9
DAR (UV)	3.5
Maitansinoide Libre (% contra DM4 total)	0.7%

25

La DAR del lote representativo del Conjugado 1 fue

3.5 $\pm$ 0.5.

Análisis de Cinéticos de Unión y Afinidad a FGFR3
Humano por Ensayo de Resonancia de Plasmón de Superficie
(Biacore ®)

5 Se determinó la estequiometría de afinidad de unión
y enlace a FGFR3(IIIb) humano, una forma de empalme de FGFR3,
usando un ensayo de resonancia de plasmón de superficie en un
instrumento T200 Biacore® cebado con amortiguador de corrida
y temperatura de análisis establecida a 25°C. Se usó un
10 fragmento CM5 que contiene el receptor huFGFR3(IIIb)
inmovilizado (generado usando acoplamiento de amina NHS-ED
estándar) en células de 2 flujo. Se prepararon muestras del
Conjugado 1 por 2 veces las diluciones seriales partiendo a
60 nM, 6 diluciones totales en amortiguador de corrida. Se
15 inmovilizó el receptor a 2.5 µg/ml (55 RU). Cada ciclo de
análisis consiste de: (1) inyección de muestra a 30 µl/min
con tiempo de contacto a 180 seg., (2) disociación por
inyección del amortiguador por 900 seg., a 30 µl/min, (3)
regeneración en una solución al 0.5% de SDS con tiempo de
20 contacto de 30 seg., a una velocidad de flujo de 40 µl/min.
Se procesaron los datos usando referenciado de doble hebra y
fijado a un modelo de unión 1:1 usando el software Evaluation
2000 Biacore®, versión 4.1, para determinar el índice de
asociación (k_{asoc} , unidades $M^{-1}s^{-1}$), índice de disociación
25 (k_{disoc} , unidades s^{-1}) y R_{max} (unidades RU). Se calculó la

constante de disociación de equilibrio (K_D) de la relación de $K_D = k_{\text{disoc}}/k_{\text{asoc}}$. El K_D está en unidades molares.

El anticuerpo 1 tiene un K_D de 1.3×10^{-10} M. El conjugado 1 se une a huFGFR3(IIIb) con un índice de asociación promedio (k_{asoc}) de $(2.27 \pm 0.001) \times 10^5$ e índice de disociación (k_{disoc}) de $(1.87 \pm 0.13) \times 10^{-4}$. La Tabla 1 muestra un resumen de los resultados experimentales con desviaciones estándar calculados de experimentos independientes $n=3$. El conjugado 1 se une a huFGFR3(IIIb) bajo pH fisiológico y resistencia iónica con un K_D de $(8.23 \pm 0.59) \times 10^{-10}$ M.

TABLA 3: Cinéticas y Afinidad de Unión al Conjugado 1 a FGFR3(IIIb) humano

Antígeno	K_{asoc} (1/Ms)	K_{disoc} (1/s)	K_D (M)
HuFGFR3(IIIb)	$(2.27 \pm 0.001) \times 10^5$	$(1.87 \pm 0.13) \times 10^{-4}$	$(8.23 \pm 0.59) \times 10^{-10}$

Por lo tanto, la conjugación no altera la funcionalidad de unión del ligando del anticuerpo no conjugado, desnudo.

Ensayo Inmuno Sorbente (ELISA) Enlazado a la Enzima **Bloqueo del Conjugado 1 de Unión del Ligando FGF1 a FGFR3(IIIb) Humano**

Se recubrió por mancha una placa Multi-Array® de 96 cavidades (Meso Scale Discovery® (MSD®) #L15Xa-6) con 100 ng per cavidad de FGFR3(IIIb)-Fc humano (5 μ l/cavidad de 20 μ g/ml de solución en PBS), se cubrió e incubó durante la

noche a temperatura ambiente. Para bloquear la unión no específica en las cavidades, se agregó 150 µl de 5% del bloqueador A MSD® (R93BA-1) a cada cavidad y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. En una placa ELISA de 96 cavidades separada, se prepararon diluciones seriales 1:3 de artículos de ensayo partiendo a 1 µg/ml en PBS, 0.05% Tween® 20 (PBS-T), 1% de BSA. Se desechó el bloqueador y se transfirió 30 µl por cavidad de estas diluciones en las cavidades apropiadas de la placa MSD® recubierta y bloqueada y suavemente se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. Se decantó la placa y se lavó dos veces con 200 µl/cavidad de PBS-T. Se agregó 30 µl por cavidad de 1 µg/ml de FGF1 etiquetado con rutenio en PBS-T, 1% de BSA, 10 µg/ml de heparina (Sigma cat #H3149-50KU) a la placa y se agitó suavemente por 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Se decantó la placa nuevamente y se lavó dos veces con 200 µl/cavidad de PBS-T. Después del lavado, se agregó 150 µl de 1X Amortiguador de Lectura MSD® (MSD®, #R92TC-2) a cada cavidad. En la estimulación electroquímica, la etiqueta de rutenio en el FGF-1 unido emite luz luminiscente a 620 nm. Se detectaron las señales ECL por una cámara de dispositivo de carga acoplada en un lector de placa Imager 2400 SECTOR® (MSD®, #1250). Se graficó la luminiscencia, se midió como unidades de luz relativa (RLU), en el software GraphPad Prism®, versión 6.0. Se calcularon los valores IC₅₀ por análisis de

ajuste de curva de regresión ni lineal utilizando el log[inhibidor] del software contra la función de respuesta.

La unión de FGF1 bloquea el conjugado 1 a FGFR3 con un IC₅₀ de 3.6 nM, lo cual soporta que además al FGFR3 unido,
5 el Conjugado 1 también bloquea la función en esta unión de ligando (FGF1) semejante a los bloques a FGFR3.

Unión de FGF1 y FGF9 Bloqueo al Anticuerpo 1 a FGFR3

Se valoró la capacidad del Anticuerpo 1, el
10 componente de anticuerpo del Conjugado 1, para la proliferación inducida por el ligando neutralizado de las líneas celulares que albergan varias formas de FGFR3, que incluyen mutaciones, fusiones y tipo nativo (WT).

La BaF3 es una línea de célula pro-B que es
15 independiente en IL-3 de ratón para supervivencia. Cuando los receptores son inducidos en células BF3, pueden proliferar en respuesta a los ligandos del receptor, sin la necesidad para IL-3 exógeno.

Se prepararon las líneas de célula BaF3 que
20 expresan ya sea FGFR3 humano de tipo nativo o mutante por transducción retroviral. Cada línea es una combinación estable, resistente a puromicina. Se mantienen las líneas celulares en medio de cultivo BaF3 (que contienen IL-3 de ratón y puromicina) a una densidad de célula de 20,000 a
25 1,000,000 células /ml y se diluyeron cada 1-4 días con medio

de cultivo fresco. Se diluyeron las células BaF3+FGFR3 usadas en ensayos de incorporación de Histidina ^3H de 20 a 50,000 células/ml 1 a 3 días antes del ensayo. Para el ensayo, la densidad del cultivo celular está entre 100,000 y 1,000,000 células/ml. Inicialmente, se probó FGF-1 (FGF ácido) y/o FGF-9 para estimulación dependiente de la dosis de incorporación de timidina ^3H en células BaF3+FGFR(IIIb) WT, +FGFR3(IIIc) WT y se comparó a células de control del vector vacío BaF3+MSCV. Se centrifugaron las líneas BaF3 a 1,000 rpm por 3 minutos a TA y se lavaron 3 veces con 20 ml de medio de ensayo BaF3 (centrifugando en la misma forma después de alcanzar cada lavado). Se agregó 100 ml de líneas de célula BaF3+FGFR3(IIIb) WT, +FGFR3(IIIc) WT, o + vector vacío a 200,000 células/ml o 800,000 células/ml (20,000 o 80,000 células/cavidad) a las cavidades 60 interiores de las placas de cultivo de tejido de 96 cavidades (BD FalconTM No. 35-3072). Se agregó 50 μl heparina 4X (concentración final 5 o 10 $\mu\text{g/ml}$) (o medio de ensayo) a las cavidades. Se diluyeron serialmente FGF-1 o FGF-9 (1:2-1:5) en medio de ensayo (en placas de polipropileno). Se agregó 50 μl de FGF-1, 4X, FGF-9 4X, o medio de ensayo solo, a las cavidades (por triplicado). Se agregó 250 ml de medio de ensayo o PBS de Dulbecco a las cavidades del borde para reducir la evaporación. Las células se incubaron por 72 horas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de RH. Se agregó 20 μl de 0.1 mCi/ml de timidina-[metil- ^3H] en D-PBS

(MP Biomedicals No. 2406605) por cavidad durante las 6 horas de incubación. Se congelaron las placas de ensayo a -80°C , se descongelaron a 37°C , y se recolectaron en placas GF/C, UniFilter-96 (Perkin Elmer No. 6005174) usando un Cosechador 5 FiltermateTM (Packard). Se secaron las placas UniFilter y se agregó 20 μl de escintilante Microscint-0 (Perkin Elmer No. 6013611) por cavidad. Se cuantificó la ^3H timidina incorporada en las placas de filtro durante 1 minutos por cavidad en un contador de escintilación líquido 1450-021 10 Microbeta (Wallac). Para evaluar el Anticuerpo 1 para neutralización de actividad FGF-1 o FGF-9 en FGFR3 tipo nativo o FGFR3 mutante, se usaron cantidades constantes de células que expresan FGF-1 humano o FGF-9 humano (FGF-1: 80 ng/ml en FGFR3(IIIc), 800 ng/ml en células que expresan 15 FGFR3(IIIb); FGF-9: 100 ng/ml en células que expresan FGFR3(IIIc), 800 ng/ml en células que expresan FGFR3(IIIb)). Estas concentraciones de FGF-1 o FGF-9 proporcionadas por al menos dos veces incremento en incorporación de ^3H -timidina, comparado al medio de ensayo solo. Para convertir los valores 20 de concentración de $\mu\text{g/ml}$ a nM, se utiliza la siguiente fórmula:

Concentración en $\mu\text{g/ml}$ x factor de conversión =
Concentración en nM en donde el factor de conversión es
inversamente proporcional a MW (peso molecular); 6.667 es el
25 factor de conversión para un anticuerpo monoclonal, asumiendo

que el MW es 150 kD. FGF-1: peso molecular = 15.5 kD, por lo tanto el factor de conversión es 64.45. FGF-9: peso molecular = 23 kD, por lo tanto el factor de conversión es 43.

Se centrifugaron las líneas BaF3 (entre los pasajes 2 y 8 después de la ganancia de resistencia a puromicina) a 1,000 rpm por 3 minutos a TA y lavado 3 veces con 20 ml de medio de ensayo BaF3. Se agregó 50 µl de células BaF3 que expresan FGFR3(IIIb) WT, FGFR3(IIIc), FGFR3(IIIb) mutantes o FGFR3(IIIc) mutantes, a 400,000 células/ml (20,000 células/cavidad) a las 60 paredes interiores de las placas de cultivo de tejido de 96 cavidades (BD FalconTM). En una placa de dilución separada (polipropileno), se diluyó el Anticuerpo 1 o anticuerpo de control del isotipo IgG1 humano (a 4X la concentración de trabajo superior) en medio de ensayo. Además, se diluyeron serialmente (1:3) los anticuerpos en medio de ensayo. Se agregó 50 µl de cada concentración de prueba del anticuerpo a las cavidades que contienen células BaF3. La prueba utilizó cavidades por triplicado por tratamiento. En lugar de los anticuerpos, se agregó 50 µl de medio de ensayo para controles de "solo el medio" y "solo FGF". Se incubaron las placas que contienen mezclas de célula y anticuerpo por 45 minutos a 37°C, 95% RH, 5% CO₂, antes de la adición de heparina y FGF. Se agregó 50 µl de heparina 4X (concentración final 10 µg/ml) a las cavidades. Se agregó 50 µl de FGF-1 4X o FGF-9 4X (diluido en medio de ensayo) medio

de ensayo solo, a las cavidades (por triplicado). Se agregó 250 µl del medio de ensayo a las cavidades del borde para reducir la evaporación. Se incubaron las células por 72 horas (células que expresan FGFR3(IIIc) WT o mutantes) a las 96
5 horas (células que expresan FGFR3(IIIb) WT o mutantes) a 37°C, 5% de CO₂ y 95% RH. Se agregó 20 µl de 0.1 mCi/ml de timidina-[metil-³H] en D-PBS (MP Biomedicals No. 2406605) por
10 cavidad por las últimas 6 horas de incubación. Se recolectó ³H-timidina incorporada y se cuantificó como se describe anteriormente usando un contador de escintilación líquida 1450-021 Microbeta.

15

20

25

Tabla 4: Valores IC_{50} del Anticuerpo 1 para FGF1 o FGF9 neutralizado en FGFR3 Humano Tipo Nativo o Mutante

Receptor Isoforma/Mutación	Ligando (Concentración)	IC_{50} PROM (nM)
FGFR3(IIIb) WT	FGF1 (51.6 nM)	4.20
FGFR3(IIIb) R248C	FGF1 (51.6 nM)	1.32
FGFR3(IIIb) S249C	FGF1 (51.6 nM)	2.17
FGFR3(IIIb) G372C	FGF1 (51.6 nM)	4.81
FGFR3(IIIb) Y375C	FGF1 (51.6 nM)	8.77
FGFR3(IIIc) WT	FGF1 (5.16 nM)	11.86
FGFR3(IIIc) S249C	FGF1 (5.16 nM)	30.4
FGFR3(IIIc) K650E	FGF1 (5.16 nM)	8.11
FGFR3(IIIb) WT	FGF9 (34.72 nM)	0.40
FGFR3(IIIb) R248C	FGF9 (34.72 nM)	ND
FGFR3(IIIb) S249C	FGF9 (34.72 nM)	0.46
FGFR3(IIIb) G372C	FGF9 (34.72 nM)	ND
FGFR3(IIIb) Y375C	FGF9 (34.72 nM)	1.42
FGFR3(IIIc) WT	FGF9 (4.34 nM)	1.41
FGFR3(IIIc) S249C	FGF9 (4.34 nM)	1.50
FGFR3(IIIc) K650E	FGF9 (4.34 nM)	2.07

PROM = promedio; IC_{50} = concentración inhibitoria media máxima; ND = no determinado; WT = tipo nativo.

Nota: los cálculos para el valor IC_{50} para FGF1 que neutraliza el Anticuerpo 1 o incorporación de ^3H -timidina que induce FGF9 en células BaF3 que expresan FGFR3(IIIb) WT, FGFR3(IIIc) WT o FGFR3 mutaciones.

En la Tabla 4, el Anticuerpo 1, el componente de anticuerpo del Conjugado 1, efectivamente neutraliza la proliferación que induce ligando FGF1 y FGF9 de líneas de

células contienen el receptor FGFR3 WT y mutado.

Estudios de Citotoxicidad

Citotoxicidad del Conjugado 1 en Líneas de Célula del Tumor que sobreexpresan FGFR3

5 Para determinar la citotoxicidad del Conjugado 1, establece la densidad de superficie de la célula FGFR3 relativa para líneas de célula del tumor de vejiga y mieloma múltiple que expresan FGFR3.

Se cultivaron las líneas de célula por 48 horas, se
10 cosecharon con Amortiguador de Disociación Celular Gibco® (enzima libre) (Gibco®, #13151-014), y se cuantificaron las células. Se centrifugaron las células a 1000 rpm por 5 minutos, se lavó una vez con PBS frío, pH 7.4, y se resuspendió a 2×10^6 células/ml en PBS frío, pH 7.4. Se
15 bloquearon las células con 30 µg/ml de IgG humano en FACS (clasificación de la célula de fluorescencia activada) amortiguador de teñido (PBS, pH 7.4, 3% de BSA) en una placa de fondo redondo de 96 cavidades por 1 hora en hielo. Después del bloqueo, se centrifugaron las células a 1200 rpm por 5
20 minutos y se removió lo sobrenadante. Se agregó 1000 µl de amortiguador de teñido FACS a las cavidades de control sin teñir. Se agregó 100 µl del Anticuerpo 1 etiquetado con Alexa488 15 µg/ml (usado para monitorear la internalización de FGFR3), anti-KLH (conjugado de control no objetivo) o
25 anticuerpo chLTI (conjugado de control no objetivo) en

amortiguador de teñido FACS a las cavidades de prueba apropiadas que contienen células. Se agregó el amortiguador y los anticuerpos a las cavidades vacías, y después se agregaron 2 gotas de cada una de las soluciones de perlillas estándar del Kit de Perlillas Simply Cellular® QuantumTM (Bangs Labs, #816B) a las cavidades apropiadas. Se incubó la placa en la oscuridad sobre hielo por 1 hora. Se lavaron las células y las perlillas dos veces con Amortiguador de Lavado FACS (PBS, pH 7.4, 0.5% BSA). Se resuspendieron las células en 50 µl de 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) a 5 µg/ml en Amortiguador de Lavado FACS, y se resuspendieron las perlillas en 50 µl de Amortiguador de Lavado FACS. Se leyeron las cavidades en HTFC IntelliCyt® y se analizaron usando el software FlowJo. Se insertaron los valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) generados por FlowJo en la hoja de cálculo Excel proporcionada por Bangs Lab para determinación de Capacidad de Unión del Anticuerpo (ABC). Los valores reportados son un resultado de sustracción de los valores ABC no específicos determinados usando el anticuerpo anti-KLH o chKTI de los valores ABC específicos determinados usando el Anticuerpo 1 desnudo (véase la columna etiquetada "expresión de superficie celular FGFR3 (ABC)" en la Tabla 5). Se nota que se usó la metodología anterior para determinar el ABC de otras líneas de célula discutidas en la presente que no son explícitamente listadas en la Tabla 5.

TABLA 5: Citotoxicidad del Conjugado 1 en Líneas de Célula de Tumor

Línea de célula de tumor	Estado de FGFR3	Expresión de superficie de célula FGFR3 (ABC)	Citotoxicidad del Conjugado 1 IC ₅₀	Citotoxicidad del control Isotipo IC ₅₀
BFTC-905 (vejiga)	WT	11,000	2.7 nM	NS
UMUC-14 (vejiga)	S249C	27,000	0.5 nM	NS
RT-112 (vejiga)	WT, TACC3 fusion	16,000	1.3 nM	NS
KU-19-19 (vejiga)	WT	≤ 4,000	NS	NS
KMS-11 (mieloma múltiple)	T(4;14) + Y373C	120,000	0.04 nM	NS

NS = no significativo

Se observó una tendencia de citotoxicidad incrementada con expresión incrementada de FGFR3 en la superficie de la célula. Estos datos también soportan la sensibilidad incrementada al Conjugado 1 en la presencia de mutaciones y/o fusiones de FGFR3 lo cual resulta en citotoxicidad de la célula mejorada.

Prueba de Citotoxicidad: Anticuerpo 1, el Componente del Anticuerpo 1 de la Presente Invención, puede Selectivamente Suministrar una Carga útil Citotóxica

Anticuerpo 1, el componente del anticuerpo de la
5 presente invención, puede selectivamente suministrar una
carga útil citotóxica a células del tumor.

Se colocaron células en placas de cultivo de tejido
de 96 cavidades a 2500 células por placa en 90 μ l de medio
completo y se incubaron por 4 horas a 37°C en una atmósfera
10 humidificada que contiene 5% de CO₂. Justo antes del final de
esta incubación, se diluyeron los artículos de prueba con el
medio completo en series de diluciones 3 veces en placas de
96 cavidades de fondo redondo. Después de las 4 horas de
incubación, se mezcló 10 μ l de los anticuerpos diluidos con
15 una cantidad constante del Fab conjugado (10 nM), se agregó a
las cavidades correspondientes en la placa de la célula, y se
incubó por 96 horas a 37°C en una atmósfera humidificada que
contiene 5% de CO₂. Después de esta incubación, se removieron
las placas de la incubadora y se dejaron llegar a temperatura
20 ambiente para todas las etapas subsecuentes. Se agregó 100 μ l
del reactivo Cell Titer-Glo® (Promega #TB288) a cada cavidad
y se incubaron las placas por 2 horas, protegidas de la luz.
Se detectaron señales de luminiscencia en un lector de
microplaca M5e Multi-Mode Espectra Max®. Se calcularon las
25 cavidades experimentales como un porcentaje de cavidades

control sin tratar. Se graficaron los datos usando GraphPad Prism® 6 y se determinaron los IC_{50} usando el inhibidor log contra respuesta normalizada, traslape variable, análisis.

La citotoxicidad significativa se observa con línea
 5 de célula de mieloma múltiple KMS-11 [t(4; 14), Y373C] (IC_{50} = 0.11 nM) que expresa 120,000 antígenos que proporcionan validación al Anticuerpo 1, el componente de anticuerpo del Conjugado 1, puede suministrar carga útil mediante vínculo con FGFR3. Estos datos sugieren que la potencia citotóxica se
 10 incrementa con el incremento de la densidad del antígeno FGFR3 y el estado mutacional se puede observar cuando se compara a través de las numerosas líneas de célula de tumor de la vejiga (RT-112 (TACC3)) expresan ~16,000 antígenos contra BFTC-905 (tipo nativo) expresa ~11,000 antígenos) y
 15 líneas de célula de tumor de Mieloma Múltiple (KMS-11 [t(4; 14), Y373C] expresa ~120,000 antígenos contra OPM-2 [t(4; 14), K650E] expresa ~51,000 antígenos contra LP-1[t(4; 14) (tipo nativo) expresa ~9,000 antígenos) evaluados. Mientras un importante componente de la actividad citotóxica conjugada
 20 es la densidad del antígeno, la densidad del antígeno se acompaña con el estado mutacional FGFR3 también puede ser importante en algunas líneas de célula.

Superficie FGFR3 y estado mutacional FGFR3

	Líneas Celulares (Expresión de superficie de célula FGFR3 (ABC))	IC₅₀ (nM)		
		Anticuerpo 1	Conjugado 1	KLH-sulfo- SPDB-DM4
5	RT112 (11,000)	NA	2.1	10.0
	Cal-29 (16,000)	NA	10.5	NA
	KMS-11 (120,000)	NA	0.24	NA
10	OPM-2 (51,000)	NA	1.8	20.5
	LP-1 (9,000)	NA	NA	15.7
	Kato-III (142,000)	NA	5.4	19.4
15	OE-33 (25,000)	NA	15.0	16.8
	Baf3-FGFR3 (IIIb) (48,000)	NA	2.5	NA
	Baf3-FGFR3 (IIIc) (20,000)	NA	5.0	NA

20 NA= IC₅₀ no conseguido a la concentración máxima de 30nM

Líneas Celulares: RT112 (TACC3), Cal-29 de Vejiga, KMS-11[t5(4:14, Y373 C], OPM-2, LP-1 de Mieloma Múltiple, Kato-III Gástrico, OE-33 SCHNN, Baf3-FGFR3(IIIb), Baf3-FGFR3(IIIc) transfectada.

25 Vejiga (RT112-TACC3), MM (KMS-11 [t(4;14) Y373C],

OPM-2 [t(4;14), K650E]), Kato-III Gástrico y líneas celulares Baf3-FGFR3(IIIb), Baf3-FGFR3(IIIc) transfectadas son sensibles a la acción de eliminación citotóxica selectiva del Conjugado 1. Esta potencia se correlaciona con la expresión de superficie de FGFR3 y estado mutacional FGFR3.

Pruebas de Citotoxicidad de las Líneas de Célula de Tumor de Vejiga con el Conjugado 1

El conjugado 1 es citotóxico en numerosas líneas de célula de tumor de vejiga *in vitro* que sobreexpresan varias formas de FGFR3.

Se colocaron células en placas de cultivo de tejido de 96 cavidades a 2500 células por cavidad en 90 µl de medio completo y se incubaron por 4 horas a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. Justo antes del final de esta incubación, se diluyeron los artículos de prueba con el medio completo en series de diluciones 3 veces en placas de 96 cavidades de fondo redondo. Después de las 4 horas de incubación, se agregó 10 µl de los anticuerpos diluidos a las cavidades correspondientes en la placa de la célula y se incubó por 96 horas a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. Después de esta incubación, se removieron las placas de la incubadora y se dejaron llegar a temperatura ambiente para todas las etapas subsecuentes. Se agregó 100 µl del reactivo Cell Titer-Glo® (Promega #TB288) a cada cavidad y se incubaron las placas por 2 horas, protegidas de la luz.

Se detectaron señales de luminiscencia en un lector de microplaca M5e Multi-Mode Espectra Max®. Se calcularon las cavidades experimentales como un porcentaje de cavidades control sin tratar. Se graficaron los datos usando GraphPad Prism® 6 y se determinaron los IC₅₀ usando el inhibidor log contra respuesta normalizada, traslape variable, análisis.

Los resultados muestran citotoxicidad significativa del Conjugado 1 cuando se usa la molécula para tratar cada una de las líneas de célula de tumor de vejiga que sobreexpresan FGFR3 (véase Tabla 5). El compuesto es ligeramente más potente en la línea de célula de tumor UMUC-14, la cual sobreexpresa FGFR3 que contiene una mutación en el ECCD, lo cual hace al receptor constitutivamente activo. El conjugado apareado con el isotipo de control negativo no muestra citotoxicidad en los intervalos de concentración observados con el Conjugado 1 en cualquiera de las líneas. Las líneas de célula del tumor de vejiga KU-19-19, la cual no sobreexpresa FGFR3, es incluida en el experimento para valorar citotoxicidad no específica. El conjugado 1 no es citotóxico para la línea KU-19-19. Los resultados muestran que la citotoxicidad *in vitro* específica puede ser inducida por el Conjugado 1 en las líneas de célula que sobreexpresan FGFR3 WT, FGFR3 mutantes S249C o Y373C, en la ausencia o presencia de receptores de fusión FGFR3-TACC3.

Se realizaron estudios *in vitro* empleando formación de imagen de la célula viva, citometría FLOW, y varios análisis bioquímicos, para entender la relación entre el estado mutacional de FGFR3, expresión de superficie e internalización del anticuerpo mediado por el receptor. Se determinó cómo estos factores se combinan para por último influenciar en la citotoxicidad del conjugado.

Los datos en la presente demuestran que los índices incrementados de internalización de FGFR3 asociados con conductores mutacionales de FGFR3, que incluyen mutaciones S249C y fusiones FGFR3-TACC3, y que estas anormalidades se correlacionan con sensibilidad mejorada al Conjugado 1. Se realizaron análisis cuantitativo de la internalización del anticuerpo en un panel de líneas de célula que albergan una variedad de mutaciones y expresan niveles variados de FGFR3 de superficie. Estas líneas de célula incluyen: RT-4 (TACC3 exon-4, capacidad de unión del anticuerpo de densidad de superficie (ABC) de ~ 29,000), UMUC-14 (S249C, ABC ~27,000), RT-112 (TACC3 exon-10, ABC ~16,000), BFTC-905 (WT, ABC ~11,000), KU-19-19 (WT, ABC $\leq$ 4,000), y UMUC-3 (WT, ABC $\leq$ 4,000) (véase en parte las Tablas 5 y 6).

Se inició la caracterización de estas líneas por microscopio confocal de célula viva y los anticuerpos etiquetados fluorescentemente con Alexa488 demostraron internalización específica del anticuerpo anti-FGFR3, el

Anticuerpo 1, se compara a un control IgG humano (chLTI), en un panel de líneas de célula de vejiga.

La internalización mediada por el receptor del Anticuerpo 1-Alexa488 (67 nM) en células RT-112 fue evidente a las 24 horas después de la adición del anticuerpo. En el experimento de célula viva, el Anticuerpo 1 se observa por internalizarse en la célula.

En experimentos de célula viva paralelos, se cuantificó el suministro de complejos anticuerpo-receptor al lisosoma con el uso de un tinte activado por pH (pHrodoTM), el cual exhibe fluorescencia mínima a pH neutral e intensidad de fluorescencia incrementada como las gotas de pH. Se observan incrementos significantes en la acumulación de la señal del tinte a pH en el Anticuerpo 1 además, como se compara con el anticuerpo IgG control, y este efecto es mediado por el receptor, como las células de control que no expresan FGFR3 (Baf3R2) no proporcionan una señal apreciable encima del antecedente.

El anticuerpo 1 fluorescentemente etiquetado y el anticuerpo de control chKTI (Anticuerpo 1-Alexa488 o chKIT-Alexa488), se incubó este con el mismo panel de las líneas de célula y se permitió a los anticuerpos etiquetados internalizarse durante un periodo de tiempo de 48 horas. Se recolectaron las muestras a 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 y 48 horas y se cuantificó la fluorescencia asociada a la célula por

Citometría de Flujo.

Los resultados destacan las diferencias significantes en el grado de internalización del Anticuerpo 1-Alexa488 a través del panel de las líneas de célula. Las células UMUC-14 que albergan la mutación S249C internalizan la mayoría del anticuerpo FGFR3, más de 9 veces sobre el control en términos tanto de cantidad como de índice, mientras que las líneas de célula que contienen fusiones TACC3, RT-112 y RT-4, internalizan el Anticuerpo 1-Alexa488 a aproximadamente 7 veces sobre el antecedente. BFTC-905, KU-1919 y UMUC-3, los cuales representan las líneas de célula de tipo nativo de expresión baja, demuestran poca o nada de internalización apreciable del Anticuerpo 1. Estos datos ilustran que la densidad del receptor de superficie es solamente un determinante de la internalización del anticuerpo; los datos enfatizan que la activación de mutaciones FGFR3 y/o proteínas de fusión FGFR3-TACC3 en el tráfico del receptor y la citotoxicidad inducida por el conjugado puede jugar un papel clave en la internalización.

Modelos de Eficacia

Se evaluó la actividad anti-tumor del Conjugado 1 en múltiples modelos de injerto heterólogo de tumor, que incluyen tanto línea de célula como modelos derivados del paciente, y se comparan al anticuerpo desnudo no conjugado, Anticuerpo 1. Los controles consisten de controles tratados

con vehículo o anticuerpo no específico; chKTI o KLH y controles no objetivo, chKTI-sulfo-SPDB-DM4 o KLH-sulfo-SPDB-DM4.

El tratamiento con el Conjugado 1 exhibe actividad anti-tumor resultando en regresión o estasis de tumor en un número de injertos heterólogos de vejiga o mieloma múltiple humano con un diverso patrón de expresión del antígeno FGFR3. En cada estudio, el Conjugado 1 muestra eficacia antitumoral superior comparado al Anticuerpo 1 desnudo. El tratamiento inhibe el crecimiento del tumor por inducción de apoptosis de célula del tumor monitoreado por inducción de caspasa 3 desdoblada.

Se utilizan métodos de investigación animal aprobados por el Comité de Cuidado y Uso Animal Institucional, y se realizan de conformidad con las regulaciones y estándares actuales del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y el Instituto Nacional de la Salud.

Se generaron modelos de injerto heterólogo después del implante de líneas de célula de carcinoma de vejiga o mieloma múltiple humano ya sea en HBSS o como una mezcla con 50% de Matrigel, o después del implante de fragmentos de tumor de 3-4 mm frescos en un costado de los ratones inmunodeficientes (atímicos) o NOD/SCID Gamma (NSG) hembras. Se realizó la preparación e implantes de fragmento del tumor

usando técnicas asépticas de conformidad con la guía del protocolo IACUC aprobado.

Cuando los tumores alcanzaron un tamaño específico (típicamente 200-300 mm³), se aleatorizaron los ratones que portan el tumor por volumen de tumor y se dividieron en uno de los grupos de tratamiento, típicamente que incluye vehículo, control de anticuerpo chKTI o KLH, Anticuerpo 1 (control mAb desnudo), KLH-sulfo-SPDB-DM4 o chKTI-sulfo-SPDB-DM4 (control conjugado no objetivo) y Conjugado 1. Los artículos de prueba se administraron intravenosamente (i.v.) a través de inyección del bolo por la vena de la cola ya sea en un esquema de dosificación única o repetida (típicamente cada semana o cada dos semanas). En la mayoría de los estudios, se recolectó plasma de EDTA y tejidos de tumor en puntos de tiempo específicos para medir la exposición al compuesto y marcadores de apoptosis, respectivamente. Se determinaron las concentraciones de plasma del Conjugado 1 usando tres diferentes ELISA: uno que es específico para la porción del anticuerpo del conjugado (Ensayo Total), uno que reconoce tanto la porción del anticuerpo y carga útil de maitansina (Ensayo Conjugado), y uno que detecta maitansina libre (Ensayo Libre). En resumen, para el Ensayo Total, se capturó de la molécula con FGFR3(IIIb) y se detectó usando una molécula IgG anti-humano. Para el Ensayo Conjugado, se capturó la molécula con FGFR3(IIIb). Se detectó el conjugado

usando un anticuerpo anti-maitansina, por lo tanto este ensayo es sensible a la relación carga útil:anticuerpo. En el Ensayo Libre, primero se precipitó toda la proteína de la muestra usando acetona mientras la maitansina libre
5 permaneció en lo sobrenadante. Se removió lo sobrenadante y se analizó en una ELISA de competición.

Se analizaron los tejidos de tumor recolectados para caspasa-3 desdoblada usando MSD®. Se lisaron fragmentos de tumor congelados al instante (aproximadamente 100-200 mm³)
10 usando TissueLyser II Qiagen. Se normalizaron los lisados clarificados para concentración de proteína usando el controlador líquido STAR Hamilton y se selló en las placas MSD® para análisis. Se realizó el CC3 MSD® de conformidad con el protocolo del fabricante usando placas de 34 cavidades
15 separadas para Caspasa-3 Desdoblada, así como también Caspasa-3 total (resultados expresados como una relación de desdoblada/total). Después de las etapas de bloqueo e incubación, se lavaron las placas usando el lavador de placa EL406™ BioTek y se analizaron usando el formador de imagen
20 Sector® Mesoscale. Para el análisis de datos, incluyendo análisis estadístico ANOVA de 1 vía, se usó en software Prism® Graphpad.

Se midieron los volúmenes de tumor con calibradores y se registraron los pesos corporales al menos dos veces por
25 semana, inicialmente, y después seguido por mediciones

semanales. Los volúmenes de tumor se calcularon por la fórmula de Volumen = $[(\pi/6) \times l \times W^2]$, en donde π igual a 3.14, w representa al ancho y l representa el largo. Se determinó la duración del tratamiento por: 1) pre-determinado
 5 (por ejemplo, terminación para análisis histológico en mecanismos de estudios de acción), 2) se alcanzó un punto final del estudio (es decir, se logró la inhibición estadísticamente significativa de crecimiento del tumor, o no es aparente el efecto anti-tumor), o 3) se alcanzó un punto
 10 final clínico (por ejemplo, la carga tumoral está afectando el bienestar o supervivencia animal).

Se expresó la eficacia antitumoral de los tratamientos experimentales como la relación T/C (en porcentaje y se calculó como se resumen abajo.

15
$$\%T/C = 100 \times \Delta T / \Delta C, \text{ si } \Delta T > 0$$

en donde ΔT = significa volumen de tumor del grupo tratado con el fármaco en el día final del estudio menos el volumen de tumor medio del grupo tratado con el fármaco en el día inicial de dosificación; ΔC = volumen de tumor medio del
 20 grupo de control (especificado en cada estudio) en el día final del estudio menos el volumen de tumor del grupo control en el día inicial de la dosificación. Si $\Delta T < 0$, se calculó la Regresión (% Reg) en lugar del %T/C usando la fórmula = $100 \times \Delta T / T \text{ inicial}$. Si se logra un tumor a $\geq 50\%$ de
 25 regresión, es una respuesta parcial (PR). Si es indetectable,

entonces el tumor tiene una respuesta completa (CR). Para comparar el crecimiento de tumor entre los grupos, se usó un análisis de mediciones repetidas de varianza (RM ANOVA) a través del día final para determinar el valor P (P) usando el
 5 Paquete de Descubrimiento Estadístico JMP (V.9., SAS Institute Inc. Cary, NC).

La tabla 7 resumen los modelos de injerto heterólogo del tumor probados en la presente. La Densidad del Receptor FGFR3 (ABCs) reproducido abajo se reportaron en la
 10 Tabla 5.

TABLA 7: Resumen de Modelos de Injerto Heterólogo Probados

Modelo	Tipo/Patología de Tumor	Estado genético	Densidad del Receptor FGFR3 (ABCs)
RT-112	Conductor UCC/R3 de vejiga	FGFR3-TACC3, NRAS	16,000
UMUC-14	UCC de vejiga	S249C	27,000
BFTC-905	UCC de vejiga/papilar	WT, NRAS, TP53	11,000
KU-19-19	UCC de vejiga	WT	$\leq 4,000$
KMS11	Mieloma Múltiple	T(4;14)+Y373C	120,000

Eficacia del Conjugado 1 en un Modelo de Injerto Heterólogo de Vejiga
 25

Se realizaron tres estudios independientes en el modelo de injerto heterólogo de vejiga humana RT-112 (FGFR3-TACC3) para evaluar la eficacia antitumoral y durabilidad de la respuesta después de la dosificación i.v. repetida del
5 Conjugado 1. La RT-112 (FGFR3-TACC3) es una línea de célula de carcinoma de vejiga humana que expresa 16,000 receptores como se determinó por el análisis FACS/BANGS, los cuales albergan la fusión del gen FGFR3-TACC3 recientemente reportada.

Se aleatorizaron los ratones por volumen de tumor
10 cuando lograron un volumen de tumor promedio que varía de 220 -270 mm³. Después de la aleatorización, se dosificó a los animales con injertos heterólogos de tumor (n = 6) a 12/grupo) con ya sea control de vehículo (10 µl/g; Tris 10 mM, NaCl 80 mM, 3.5% de sacarosa, 0.01% de Tween-20, pH 7.5),
15 KHL, Anticuerpo de control 1, KHL-sulfo-SPDB-DM4 o Conjugado 1.

En estos estudios, incluye un grupo separado de animales de cohorte PK/PD (n = 4) para estudiar el mecanismo de acción. En estos estudios, se administra una dosis i.v.
20 única de KHL-sulfo-SPDB-DM4 dosificado a 5 mg/kg o Conjugado 1 dosificado a 2.5 y 5 mg/kg y animales sacrificados a 24 y 96 horas para plasma y tejido de tumor. Se evaluaron las muestras de plasma para las concentraciones de plasma del compuesto, y se analizaron los tejidos de tumor por
25 marcadores de apoptosis.

En el estudio 1 de RT-112, los animales con injertos heterólogos de fragmento del tumor (n = 6/grupo) recibieron un total de 2 dosis i.v. separadas por un intervalo de 14 días de ya sea control de Vehículo (10 µl/g; 5 Tris 10 mM, NaCl 80 mM, 3.5% de sacarosa, 0.01% de Tween-20, pH 7.5), KLH-sulfo-SPDB-DM4 (5 mg/kg), o Conjugado 1 (5 mg/kg) después de la aleatorización.

Como se muestra en la Tabla 8, el Conjugado 1, a una dosis de 5 mg/kg inhibe el crecimiento de tumores RT-112 resultando en una respuesta completa (CR) en 6 de 6 (100%) de 10 animales para el día 99 y 86% de regresión en el día 154 (5 de 6 regresiones completas) después de dos dosis i.v. De estos 6 animales, 4 de 5 ratones sobrevivientes permanecieron libres de tumor hasta el día 21 mientras se observa un nuevo 15 crecimiento del tumor en un solo animal. Una dosis de 5 mg/kg de KLH-sulfo-SPDB-DM4 resulta en un CR en 2 de 6 animales.

En el estudio 2 de RT-112, se repitió el estudio de eficacia de la dosificación, los ratones que portan el tumor generados después del implante de célula (n = 12/grupo) 20 recibieron un total de 3 dosis i.v. (días 13, 35 y 49) de salina USP (10 µg/g), Anticuerpo 1 (10 mg/kg), KLH-sulfo-SPDB-DM4 (5 mg/kg) o Conjugado 1 (5 mg/kg). En este estudio, el Conjugado 1 se dosificó a 5 mg/kg resultó en 44% de regresión del tumor comparado a los controles del vehículo (p 25 <0.0001) en el día 47 después de 2 dosis. La respuesta es

mantenida a más de 100 días después de la dosis final en donde 9 de 12 animales lograron una respuesta completa (CR). La dosificación de KLH-sulfo-SPDB-DM4 a 5 mg/kg resultó en un T/C de 46% comparado al control de salina ($p = 0.02$). El

5 Conjugado 1 es significativamente más eficaz que el Anticuerpo 1 desnudo en donde el Anticuerpo 1 desnudo comparador dosificado a 10 mg/kg resulta en un T/C de 55%.

En el estudio 3 de RT-112, un estudio de respuesta a la dosis ($n = 8$) en el cual la eficacia antitumoral del

10 Conjugado 1 se evalúa a 1.25, 2.5 y 5 mg/kg después de un total de 5 dosis i.v. (días 21 y 35 seguido por 3 dosis semanales). Los controles en el estudio son KLH a 10 mg/kg, Anticuerpo 1 a 10 mg/kg y KLH-sulfo-SPDB-DM4 a 5 mg/kg. Un grupo de animales PK/PD ($n = 4$) recibieron una dosis i.v.

15 única de KLH-sulfo-SPDB-DM4 a 5 mg/kg o Conjugado 1 a 2.5 y 5 mg/kg.

El Conjugado 1 dosificado a 2.5 o 5 mg/kg resultó en una regresión de tumor que corresponde a 93% y 100% (al día 82) respectivamente. Los resultados muestran una

20 respuesta completa en 2/5 a 1.25 mg/kg, y 8/8 animales cada uno después de la dosificación a 2.5 y 5 mg/kg respectivamente, hasta el día 166. El Conjugado 1 dosificado a 1.25 mg/kg resultó en estasis de tumor. El KLH-sulfo-SPDB-DM4 dosificado a 5 mg/kg resultó en estasis de tumor con

25 regresión completa en 2/7 animales y el efecto es

estadísticamente significativa comparado a los controles del vehículo ($p = 0.02$). Los tumores de regresión no volvieron a crecer durante el periodo de observación (>160 días).

TABLA 8: Resumen de Modelo de Injerto Heterólogo de

5 Vejiga de RT-112 Humano

Modelo	N	Tratamiento	Total Dosis/ Esquema	%T/C	Reg. (%)	CR/PR	Valor P
RT-112 (TF) (Estudio 1 de RT-112)	6	Vehículo	2 (días 56 y 70)	NA	NA	NA	NA
		KLH- sulfo-SPDB- DM4 (5 mg/kg)		25	NA	2/6 CR	0.37*
		Conjugado 1 (5 mg/kg)		NA	86	5/6 CR	0.055*
RT-112 (Matrigel+) (Estudio 2 de RT-112)	12	Salina USP	3 (días 13, 35, 49)	NA	NA	NA	NA
		Anticuerpo 1 (10 mg/kg)		55	NA	NA	0.08*
		KLH- sulfo-SPDB- DM4 (5 mg/kg)		46	NA	2/12 CR, 3/12 PR	0.02*
		Conjugado 1 (5 mg/kg)		NA	44	9/12 CR, 2/12 PR	<0.0001*
RT-112 (Matrigel+) (Estudio 3 de RT-112)	8	KLH (10 mg/kg)	5 (días 21 y 35 seguido por 3 dosis semanales)	NA	NA	NA	NA
		Anticuerpo 1 (10 mg/kg)		83	NA	NA	0.86*
		KLH- sulfo-SPDB- DM4 (5 mg/kg)		6	NA	2/7 CR	0.02*
		Conjugado 1 (1.25 mg/kg)		5	NA	2/5 CR	0.03*
		Conjugado 1 (2.5 mg/kg)		NA	93	8/8 CR	0.004*
		Conjugado 1 (5.0 mg/kg)		NA	100	8/8 CR	0.008*

*: Comparación al vehículo, Salina USP o control
KLH

NA: No aplicable

Se evaluaron las muestras de plasma para las
5 concentraciones de plasma del compuesto y se analizaron los
tejidos de tumor para marcadores de apoptosis. El perfil de
concentración-tiempo de plasma para el Conjugado 1 muestra
concentraciones dependientes de la dosis con administración
de bolo i.v. a 2.5 y 5.0 mg/kg (12.6 y 32.5 µg/ml,
10 respectivamente a 24 horas) durante el lapso de tiempo de
muestreo (96 horas) como se determina por ELISA para el
Conjugado 1 e IgG total. Adicionalmente, la respuesta de RT-
112 al Conjugado 1 el tratamiento es detectable en tejido de
tumor que muestra un incremento dependiente a la dosis en
15 niveles de caspasa-3 desdoblada indicando la posible forma de
acción del compuesto.

En los estudios de RT-112, el Conjugado 1 resultó
en una eficacia significativa dependiente de la dosis
resultando en respuesta completa en la mayoría de los
20 animales y el efecto fue durable (más de 100 días). El
Conjugado 1 es significativamente más eficaz que el
Anticuerpo 1, el anticuerpo desnudo.

Eficacia del Conjugado 1 en un Modelo de Injerto Heterólogo de Vejiga de UMUC-14 Humano

25 La eficacia *in vivo* del Conjugado 1 comparado con

el Anticuerpo 1 desnudo en injertos heterólogos de carcinoma de vejiga humano de UMUC-14 es genéticamente distinta del modelo RT-112 (FGFR3-TACC3). Las líneas de célula UMUC-14 expresan aproximadamente 27,000 de densidad del receptor como se determina por el análisis FACS y BANGS y es constitutivamente activo dado que alberga la mutación S249C.

Se inocularon ratones Gamma NOD/SCID (NSG) (hembras, 5-6 semanas de edad) subcutáneamente con 5×10^6 células UMUC-14 en HBSS. Los animales se asignaron aleatoriamente en grupos de tratamiento, de forma que el volumen de tumor medio para cada grupo es $240-250 \text{ mm}^3$. Se administraron el Anticuerpo 1 y el Conjugado 1 i.v. ya sea 2 dosis separadas por un intervalo de 14 días o 4 dosis semanales. El control utiliza ya sea el amortiguador de formulación del conjugado (Tris 10 mM, NaCl 80 mM, 3.5% de sacarosa, 0.01% de Tween-20, pH 7.5) o anticuerpos chKTI no objetivo, chKTI-sulfo-SPDB-DM4 o KLH-sulfo-SPDB-DM4 a 5 mg/kg.

En el primer estudio en el modelo UMUC-14, el Conjugado 1, a una dosis de 5 mg/kg con una dosis en el día 17 y 31 después del implante del tumor, resulta en una regresión completa en 10/10 animales en el injerto heterólogo de UMUC-14. Los resultados muestran que el estado libre de tumor es mantenido por ~15 días. Aproximadamente 30 días después de la interrupción del tratamiento, se observó

nuevamente crecimiento del tumor. En el retratamiento de estos tumores en los días 78 y 81, el Conjugado 1 dosificado a 5 mg/kg no disminuyó el tamaño de tumor lo que sugiere el desarrollo de resistencia al tumor.

5 Tanto el Anticuerpo 1 desnudo dosificado a 10 mg/kg como el K_{LH}-sulfo-SPDB-DM4 dosificado a 5 mg/kg no afectan significativamente el crecimiento del tumor. Los niveles del Conjugado 1 de plasma alcanzaron ~87 µg/ml a 48 horas después de la dosis, y se observó incremento significativo en niveles
10 de caspasa-3 desdoblada tan pronto como 48 horas después de la administración.

 En un segundo estudio en el modelo UMUC-14, el estado libre de tumor se prolonga significativamente después de 4 dosis semanales del Conjugado 1. El Conjugado 1 inhibe
15 el crecimiento de tumor UMUC-14 en una manera dependiente de la dosis, con 5 mg/kg logrando regresión de tumor completa en 8 de 8 animales, 2.5 mg/kg alcanzando estasis de tumor y no afectado a 1.25 mg/kg. Los animales permanecieron libres de
20 tumor por ~30 días después de los cuales los tumores iniciaron a crecer nuevamente.

TABLA 9: Resumen de Modelo de Injerto Heterólogo de Vejiga de UMUC-14 Humano

Modelo	N	Tratamiento	Total Dosis/ Esquema	%T/C	Reg. (%)	CR/PR	Valor P
5 UMUC-14 (Estudio 1 de UMUC)	10	Vehículo	2 (días 17 y 31)	NA	NA	NA	NA
		Anticuerpo 1 (10 mg/kg)		65	NA	NA	0.15*
		KLH- sulfo-SPDB- DM4 (5 mg/kg)		89	NA	NA	0.76*
		Conjugado 1 (5 mg/kg)		NA	100	10/10 CR	<0.0001*
10 UMUC-14 (Estudio 2 de UMUC)	8	chKTI (5 mg/kg)	4 (4 dosis semanales)	NA	NA	NA	NA
		Anticuerpo 1 (5 mg/kg)		71	NA	NA	0.28*
		chKTI- sulfo-SPDB- DM4 (5 mg/kg)		99	NA	NA	0.86*
		Conjugado 1 (1.25 mg/kg)		77	NA	NA	0.31*
		Conjugado 1 (2.5 mg/kg)		13	NA	2/8 CR	<0.0001*
		Conjugado 1 (5.0 mg/kg)		NA	100	8/8 CR	<0.0001*

*: Comparación al Vehículo o control chKTI

NA: No aplicable

En el estudio de vejiga de UMUC-14 humano, se logró afectar significativamente 100% de CR después de dosificación i.v. repetida fue seguido por el crecimiento nuevamente del tumor.

Eficacia del Conjugado 1 en Modelos de Injerto Heterólogo de Vejiga de BFTC-905 FGFR3 Humano de Tipo Nativo (WT)

Se determinó la eficacia del Conjugado 1 en la presencia de la expresión FGFR3 de tipo nativo. Se inoculó NOD/SCID Gamma (NSG) con 2×10^6 de BFTC-905 suspendido en HBSS. Después de la aleatorización, se administró el Anticuerpo y el Conjugado 1 i.v. en un esquema semanal. El control utiliza ya sea anticuerpos KLH o chKTI y KLH-sulfo-SPDB-DM4 o chKTI-sulfo-SPDB-DM4. En un estudio de combinación, se administró cisplatina i.p. semanalmente.

El tratamiento del Conjugado 1 exhibe eficacia anti-tumor dependiente de la dosis en injerto heterólogo de BFTC-905 logrando estasis de tumor a 5 mg/kg, mientras significativamente se inhibe el crecimiento del tumor a 1.25 y 2.5 mg/kg. La combinación del Conjugado 1 y cisplatina resulta en regresión del tumor con 10/10PR, y el efecto es significativamente mayor que cada monoterapia. El Conjugado 1 muestra una tendencia para incrementar los niveles de capasa-3 desdoblados de tejido.

TABLA 10. Resumen del Modelo de Injerto Heterólogo de Vejiga de BFTC-905 Humano Tipo Nativo

	Modelo	N	Tratamiento	Total Dosis/ Esquema	%T/C	Reg. (%)	CR/PR	Valor P
5	BFTC-905 (Estudio 1 de FGFR3 WT)	12	KLH (10 mg/kg)	4 (4 dosis semanal mente)	NA	NA	NA	NA
			Anticuerpo 1 (10 mg/kg)		83	NA	NA	0.37*
			KLH- sulfo-SPDB-DM4 (5 mg/kg)	5 (5 dosis semanal mente)	18	NA	NA	<0.0001*
			Conjugado 1 (5 mg/kg)		NA	16	NA	<0.0001*
10	BFTC-905 (estudio 2 de FGFR3 WT)	8	chKTI (5 mg/kg)	4 (4 dosis semanal mente)	NA	NA	NA	NA
			Anticuerpo 1 (5 mg/kg)		95	NA	NA	0.71*
			chKTI- sulfo-SPDB- DM4 (5 mg/kg)		2	NA	NA	<0.0001*
			Conjugado 1 (1.25 mg/kg)		58	NA	NA	0.005*
			Conjugado 1 (2.5 mg/kg)		21	NA	NA	<0.0001*
			Conjugado 1 (5.0 mg/kg)		NA	-23	1/8 CR, 1/8 PR	<0.0001*
20	BFTC-905 (estudio 3 de FGFR3 WT)		chKTI (5 mg/kg)	4 (4 dosis semanal mente)	NA	NA	NA	NA
			Conjugado 1 (5.0 mg/kg)		7	NA	1/10PR	<0.0001*
			Cisplatina (4 mg/kg)		69	NA	0/10	0.05*
			Conjugado 1 + Cisplatina		NA	67	10/10	<0.0001* <0.0001**

*: Comparación al control chKTI o KLH

**: Comparación a cisplatina y Conjugado 1

NA: No aplicable

En BFTC-905, las líneas de célula de injerto heterólogo de vejiga de FGFR3 de tipo nativo humano expresan aproximadamente 11,00 receptores de densidad como se determina por el análisis FACS y BANGS. El Conjugado 1 solamente logra estasis de tumor en la dosis más alta probada. En combinación con cisplatina, la terapia de combinación del Conjugado 1 y cisplatina significativamente mejora los efectos del Conjugado 1 solo, resultando en regresión del tumor con 10/10PR. El efecto de la combinación es mayor que el del aditivo como se define por el Método de Independencia Bliss.

15 **Eficacia del Conjugado 1 en Modelos de Injerto Heterólogo de Vejiga de KU-19-19 FGFR3 Negativo Humano**

Se evaluó el Conjugado 1 en un modelo de injerto heterólogo de carcinoma de vejiga de FGFR3 negativo, KU-19-19 para establecer la especificidad del Conjugado 1. De manera breve, se inoculó Nu/nu (hembras, 5-6 semanas de edad) subcutáneamente con células KU-19-19 a 2×10^6 células/ratón suspendidas en HBSS. Después de la aleatorización, se administró el Anticuerpo 1 y el Conjugado 1 i.v. en un esquema semanal. El control utiliza los anticuerpos chKTI y chKTI-sulfo-SPDB-DM4 no objetivo.

TABLA 11. Resumen de Modelo de Injerto Heterólogo de Vejiga en HU-19-19 FGFR3 Negativo Humano

Modelo	N	Tratamiento	Total Dosis/ Esquema	%T/C	Reg. (%)	CR/PR	Valor P
KU-19-19	8	chKTI (5 mg/kg)	2 (2 dosis semanal mente)	NA	NA	NA	NA
		Anticuerpo 1 (5 mg/kg)		79	NA	NA	>0.05*
		chKTI- sulfo-SPDB- DM4 (5 mg/kg)		91	NA	NA	>0.05*
		Conjugado 1 (5 mg/kg)		89	NA	NA	>0.05*

*: Comparación al control chKTI

NA: No aplicable

Como se espera, el Conjugado 1 dosificado a 5 mg/kg en un esquema semanal no exhibe efecto anti-tumor contra tumores KU-19-19, indicando la especificidad del artículo de prueba hacia el antígeno FGFR3. Igualmente, el anticuerpo desnudo (Anticuerpo 1) y chKTI-sulfoSDPD-DM4, ambos dosificados semanalmente a 5 mg/kg, no exhiben actividad anti-tumor.

Eficacia del Conjugado 1 en un Modelo de Injerto Heterólogo de Mieloma Múltiple de KMS-11 humano

Se evaluó la eficacia *in vivo* del Conjugado 1 en modelos de injerto heterólogo de mieloma múltiple (MM) de KMS-11 y KMS-11LP (luciferasa positiva). El KMS-11 expresa

altos niveles de GFGR3 (~120,000) y se lleva a cabo tanto una traslocación cromosómica (t(4; 14)) como una mutación de punto único, Y373C. El KMS-11LP es un derivado de una línea de KMS-11 parenteral que es luciferasa positiva y expresa
5 altos niveles del antígeno FGFR3 (~159,000).

Se inocularon ratones NOD/SCID Gamma (NSG) (hembras, 5-6 semanas de edad) subcutáneamente con 10×10^6 de células KMS-11 o KMS-11LP suspendidas en HBSS. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de tumor medio de $\sim 300 \text{ mm}^3$, se
10 asignaron aleatoriamente los animales en grupos de tratamiento. Se administró el Anticuerpo 1 y el Conjugado 1 i.v. ya sea una vez, semanalmente o cada dos semanas. El control utiliza ya sea amortiguador de formación del conjugado (Tris 10 mM, NaCl 80 mM, 3.5% de sacarosa, 0,01% de
15 Tween-20, pH 7.5) o anticuerpo KLH no objetivo y KLH-sulfo-SPDB-DM4.

En el estudio KMS-11, el tratamiento con una dosis única del Conjugado 1 inhibe significativamente el crecimiento de tumores KMS-11 con estasis tumoral inicial seguida por
20 recrecimiento del tumor. Los análisis de tejidos de tumor recolectados indican incremento significativo en los niveles de caspasa-3 desdoblados que inician 12 horas posteriores a la dosis y picos a 24 horas.

La eficacia del Conjugado 1 mejora
25 significativamente con un esquema de dosificación más

agresivo. En el estudio 3 de KMS-11, un total de 5 dosis semanales del Conjugado 1 resultan en respuesta completa en 2 de 7 animales mientras 5 de 7 animales logran respuesta parcial. Existe sin embargo, efecto significativo con el control de conjugado no objetivo con este esquema de dosificación.

TABLA 12. Resumen de Modelo de Injerto Heterólogo de Mieloma Múltiple en Humano KMS-11

Modelo	N	Tratamiento	Total Dosis/ Esquema	%T/C	Reg. (%)	CR/PR	Valor P
KMS-11 (MM) (Estudio 1 KMS-11)	10	Vehículo	1 (día 19)	NA	NA	NA	NA
		Anticuerpo 1 (10 mg/kg)		75	NA	NA	0.02*
		KLH-sulfo-SPDB-DM4 (5 mg/kg)		70	NA	NA	0.002*
		Conjugado 1 (5 mg/kg)		30	NA	NA	<0.0001*
KMS-11 (MM) (Estudio 2 KMS-11)	10	Vehículo	2 (días 20 y 34)	NA	NA	NA	NA
		Anticuerpo 1 (10 mg/kg)		63	NA	NA	0.03*
		KLH-sulfo-SPDB-DM4 (5 mg/kg)		25	NA	NA	<0.0001*
		Conjugado 1 (5 mg/kg)	3 (días 20, 30 y 48)	NA	39	10/10 CR	<0.0001*
KMS-11 (MM) (Estudio 3 KMS-11)	12	KHL (10 mg/kg)	3 (3 dosis semanales)	NA	NA	NA	NA
		Anticuerpo 1 (10 mg/kg)		52	NA	NA	0.01*
		KLH-sulfo-SPDB-DM4 (5 mg/kg)	5 (5 dosis semanales)	12	NA	1/7 PR	<0.0001*
		Conjugado 1 (5 mg/kg)		NA	40	NA	<0.0001*

*: Comparación al Vehículo o control KHL

NA: No aplicable

Los estudios mostraron eficacia robusta
significante en injertos heterólogos de KMS-HLP tratados con
5 el Conjugado 1 que expresan densidad de antígeno ligeramente
superior (152,000) comparado con KMS-11 (119,000) parenteral.
El tratamiento del Conjugado 1 resulta en respuesta completa
en 10 de 10 animales después de un total de 3 dosis
administradas cada 14 días y el estado libre del tumor se
10 mantiene durante el periodo de observación del Día 70.

SECUENCIAS ADICIONALES

SEQ ID NO 11

MGAPACALALCVAVAIVAGASSESLGTEQRVVGRAAEVPGPEPGQELVFGS
GDAVELSCPPPGGGPMGPTVWVKDGTGLVPSERVLVGPQRLVLNASHEDSGAYSCRQRLTR
15 VLCHF SVRVTDAPSSGDDDEGEDEAEDTGVDTGAPYWTRPERMDKKLLAVPAANTVRFRC
AAGNPTPSISWLKNGREFRGEHRIGGIKLRQQWSLVMESVVPSDRGNYTCVVENKFGSIRQ
TYTLDV LERSPHRPILQAGLPANQTAVLGSDVEFHCKVYSDAPHIQWLKHVEVNGSKVGPD
GTPYVTVLKTAGANTTDKELEVLSLHNVT FEDAGEYTCLAGNSIGFSHHS AWLVVLP AEEE
LVEADEAGSVYAGILSYGVGFFLFILVVA AVTLCLRLRSPPKGLGSPTVHKISFPLKRQVS
20 LESNASNSSNTPLVRIARLSSGEGPTLANVSELELPADPKWELSRARLT LGKPLGEGCFGQ
VVM AE AIGIDKDRAAKPVT VAVKMLKDDATDKDLSDLVSEMEMMKMIGKHKNI INLLGACT
QGGPLYVLVEYAAKGNLREFLRARRPPGLDYSFDTCKPPEEQ LTFKDLVSCAYQVARGMEY
LASKCIHRDLAARVLVTEDNVMKIADFG LARDVHNLDYYKKT TNGRLPVKWM APEALFDRV
YTHSDVSFGVLLWEIFTLGGSPYPGIPVEELFKLLKEGHRMDK PANCTHDLYMIMREC WHA
25 APSRPTFKLVEDLDRVLTVTSTDEYLDLSAPFEYSPGGQDTPSSSSSGDDSVFAHDLLPPA

PPSSGGSRT

SEQ ID NO 12

gaggtccagctggtacagtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctca
gtgaaagtctcctgcaaggcttctggctacatgtttaccagctatgggatcagttgggtgc
5 gacaggccccctggacaagggttgagtggatgggatgggtcagcacttacaatggtgacac
aaactatgcgcagaagttccagggcagagtcaccgtgaccacagacacatccacgagcaca
gcctacatggagctgaggagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgcgagag
tcttgggatactatgatagtatagatggctactactacggtatggacgtctggggccaagg
gaccacggtcacggtctcaagcgctagcaccaaggggcccatcggtcttccccctggcaccc
10 tcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttcc
ccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccc
ggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagc
agcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgg
acaagagagttgagcccaaactcttgtagacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacc
15 tgaactcctggggggaccgtcagtccttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatg
atctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgagg
tcaagttcaactggtatgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcggga
ggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacggtcctgcaccaagactgg
ctgaatggcaaggagtacaagtgcaagggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgaga
20 aaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatc
ccgggaggagatgaccaagaaccaagtacgctgacctgcctggtcaaaggcttctatccc
agcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgc
ctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctattccaagctcacggtggacaagag
caggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccac
25 tacacgcagaagagcctctccctgtctccgggcaaa

SEQ ID NO 13

Cagtctgtgctgactcagccaccctcactgtcagtggccccaggaaagacg
gccacctttacctgtgggggaaacaacattggagacaagagtgttcactggtaccggcaga
agccaggccaggccccctgtcctggtcatgtatcttgataccgaacggccctcagggatccc
5 tgagcgaatgtctggctccaactttgggaacacggccaccctgacgatcaccagggtcgaa
gccgggggatgaggccgactattactgtcaggtgtgggatagtggtagtgatcatgtggtct
tcggcggaggggaccaagctgaccgtcctaggtcagcctaaggctgccccctcggtcactct
gttcccgccctcctctgaggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcataagt
gacttctacccgggagccgtgacagtggcctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgg
10 gagtggagaccaccacaccctccaaacaaagcaacaacaagtacgcggccagcagctacct
gagcctgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaa
gggagcaccgtggagaagacagtggccccctgcagaatgctct.

15

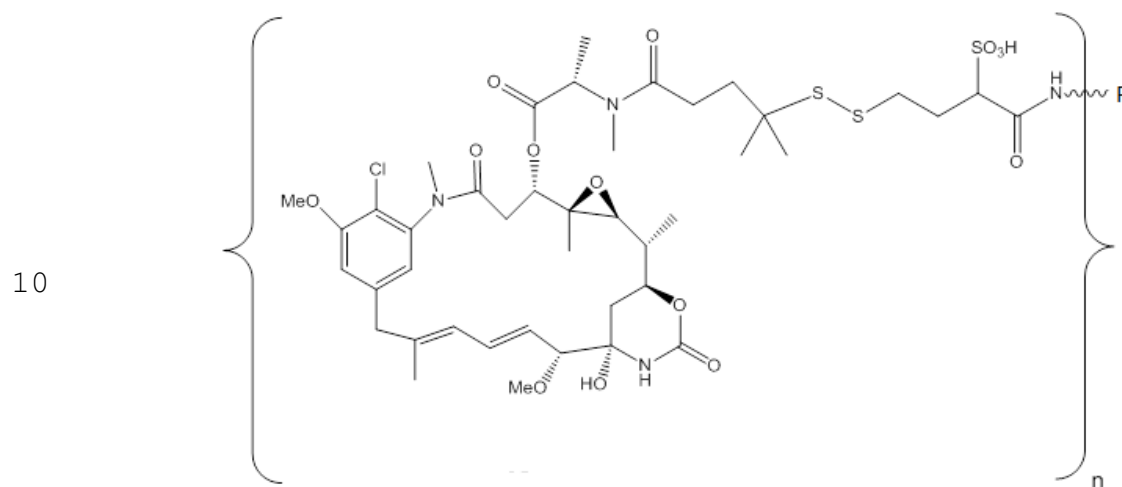
20

25

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes.

5 1. Un compuesto de Fórmula I:



caracterizado porque n es un número entero desde 1
 15 - 10 y R es un agente de unión celular que se une a FGFR3 humano (SEQ ID NO 11) y comprende una CDRH1 que tiene la secuencia GYMFTSYGIS (SEQ ID NO 1), una CDRH2 que tiene la secuencia WVSTYNGDTNYAQKFQG (SEQ ID NO 2), una CDRH3 que tiene la secuencia VLGYYDSIDGYYYGMDV (SEQ ID NO 3), una CDRL1
 20 que tiene la secuencia GGNIGDKSVH (SEQ ID NO 4), una CDRL2 que tiene la secuencia LDTERPS (SEQ ID NO 5), y una CDRL3 que tiene la secuencia QVWDSGSDHV (SEQ ID NO 6).

2. El compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque el agente de unión
 25 celular comprende además: una secuencia de aminoácido pesada

variable de:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYMFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWV
STYNGDTNYAQKFQGRVTVTDTSTSTAYMELRSLRSEDVAVYYCARVLGGYDSIDGYYYG
MDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO 7); y

5 una secuencia de aminoácido ligera variable de:

QSVLTQPPSLSVAPGKTATFTCGGNNIGDKSVHWYRQKPGQAPVLMYLDV
ERPSGIPERMSGSNFGNTATLTITRVEAGDEADYYCQVWDSGSDHVVFGGGTKLTVLG
(SEQ ID NO 8).

3. El compuesto de conformidad con la
10 Reivindicación 2, caracterizado porque el agente de unión
celular comprende además: una cadena ligera que comprende la
secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 10; y una cadena
pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID
NO: 9.

15 4. El compuesto de conformidad con la
Reivindicación 3, caracterizado porque el agente de unión
celular comprende además: dos cadenas ligeras que comprende
cada una la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 10; y
dos cadenas pesadas que comprende cada una la secuencia de
20 aminoácido de la SEQ ID NO: 9.

5. El compuesto de conformidad con las
Reivindicaciones 1-4, caracterizado porque tiene una relación
de fármaco a anticuerpo de 2.0 a 5.0.

6. El compuesto de conformidad con las
25 Reivindicaciones 1-4, caracterizado porque tiene una relación

de fármaco a anticuerpo de 3.5 ± 0.5 .

7. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende el compuesto de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, junto con un portador, diluyente
5 o excipiente farmacéuticamente aceptable.

8. La composición farmacéutica de conformidad con la Reivindicación 7, caracterizada porque comprende además, un agente farmacéutico adicional.

9. El compuesto de conformidad con cualquiera de
10 las Reivindicaciones 1-6, para uso en terapia.

10. El compuesto de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, para uso en el tratamiento de cáncer.

11. El compuesto de conformidad con cualquiera de
15 las Reivindicaciones 1-6, para uso en el tratamiento de cáncer en un paciente que tiene un nivel de expresión de FGFR3 que es mayor que el nivel de expresión de FGFR3 en una población de control.

12. El compuesto de conformidad con cualquiera de
20 las Reivindicaciones 1-6, para uso de conformidad con la Reivindicación 11, en donde la población de control comprende al menos un individuo que no sufre de cáncer.

13. El compuesto de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, para uso en el tratamiento de
25 cáncer en un paciente que tiene:

(a) una mutación de FGFR3 (SEQ ID NO 11), en donde la mutación se selecciona a partir del grupo que consiste de S249C, R248C, Y373C, Y375C, y combinaciones de los mismos;

(b) una fusión de FGFR3-TACC3; o

5 (c) una combinación de (a) y (b).

14. El compuesto de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, para uso en el tratamiento de cáncer en un paciente que tiene:

(a) una mutación de FGFR3 (SEQ ID NO 11), en donde
10 la mutación se selecciona a partir del grupo que consiste de S249C, R248C, Y373C, Y375C, y combinaciones de los mismos;

(b) una fusión de FGFR3-TACC3; o

(c) una combinación de (a) y (b),

en donde el tratamiento comprende determinar si o
15 no el paciente tiene (a) una mutación de FGFR3 (SEQ ID NO 11), en donde la mutación se selecciona a partir del grupo que consiste de S249C, R248C, Y373C, Y375C, y combinaciones de los mismos; (b) una fusión de FGFR3-TACC3; o (c) una combinación de (a) y (b), determinando *ex vivo* o *in vitro* la
20 presencia de (i) una o más de las mutaciones S249C, R248C, Y373C, Y375C; (ii) una fusión de FGFR3-TACC3; o (iii) una combinación de (1) y (2) en una muestra biológica del paciente.

15. El compuesto de conformidad con cualquiera de
25 las Reivindicaciones 1-6, para uso de conformidad con

cualquiera de las Reivindicaciones 10-14, en donde el cáncer es cáncer de vejiga o mieloma múltiple.

16. El compuesto de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, para uso de conformidad con
5 cualquiera de las Reivindicaciones 10-15, en donde tal compuesto es administrado simultáneamente, separadamente o secuencialmente con otro tratamiento anti-cancerígeno.

17. El compuesto de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, para uso de conformidad con la
10 Reivindicación 16, en donde tal tratamiento anti-cancerígeno se selecciona a partir del grupo que consiste de un agente anti-angiogénico, un agente quimioterapéutico, y un agente anti-neoplásico.

18. El compuesto de conformidad con cualquiera de
15 las Reivindicaciones 1-6, para uso de conformidad con la Reivindicación 17, en donde tal agente anti-neoplásico es cisplatino.

19. Un método para tratar cáncer en un mamífero, caracterizado porque comprende administrar a tal mamífero en
20 necesidad del mismo el compuesto de conformidad con las Reivindicaciones 1-6, en donde el cáncer se selecciona a partir del grupo que consiste de cáncer de vejiga o mieloma múltiple.

20. El método de conformidad con la Reivindicación
25 19, caracterizado porque comprende además, administrar otro

tratamiento anti-cancerígeno a tal mamífero en donde tal tratamiento anti-cancerígeno se selecciona a partir del grupo que consiste de un agente anti-angiogénico, un agente quimioterapéutico, y un agente anti-neoplásico.

5 21. El método de conformidad con la Reivindicación 20, caracterizado porque tal agente anti-neoplásico es cisplatino.

22. Un método para tratar cáncer en un paciente, caracterizado porque comprende las etapas:

10 (a) medir el nivel de expresión de FGFR3 (SEQ ID NO 11) en una muestra tomada del paciente en donde la muestra se selecciona a partir del grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, y tejido; y

 (b) administrar al paciente el compuesto de
15 conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, si el nivel de expresión de FGFR3 está arriba del nivel de expresión de FGFR3 encontrado en una población de control.

23. Un método para tratar cáncer en un paciente, caracterizado porque comprende las etapas:

20 (a) determinar la presencia de una anomalía en una muestra tomada del paciente, en donde la anomalía es:

 (1) una mutación de FGFR3 (SEQ ID NO 11), en donde la mutación se selecciona a partir del grupo que consiste de S249C, R248C, Y373C, Y375C, y combinaciones de los mismos;

25 (2) una fusión de FGFR3-TACC3; o

(3) una combinación de (1) y (2),

y en donde la muestra se selecciona a partir del grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, tejido, células tumorales, muestras de tejido tumoral, células de tumor de circulación, y ADN de circulación, y

(b) administrar al paciente el compuesto de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-6 si la anomalía está presente.

24. Un método para determinar si un sujeto que tiene un cáncer es un candidato para el compuesto de conformidad con las Reivindicaciones 1-6, caracterizado porque comprende: determinar *ex vivo* o *in vivo* el nivel de expresión de FGFR3 (SEQ ID NO 11) en una muestra del sujeto, en donde la muestra se selecciona a partir del grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, y tejido, en donde un incremento en el nivel de expresión de FGFR3, comparado con el nivel de expresión de FGFR3 en un individuo que no sufre de cáncer, es indicativo de que el sujeto es un candidato para el compuesto.

25. Un método para determinar si un sujeto que tiene un cáncer es un candidato para el compuesto de conformidad con las Reivindicaciones 1-6, caracterizado porque comprende:

(a) determinar *ex vivo* o *in vitro* la presencia de una anomalía en una muestra tomada de un paciente, en donde

la anomalía es:

(1) una mutación de FGFR3 (SEQ ID NO 11) en donde la mutación se selecciona a partir del grupo que consiste de S249C, R248C, Y373C, Y375C, y combinaciones de los mismos;

5 (2) una fusión de FGFR3-TACC3; o

(3) una combinación de (a) o (b); y

(b) en donde la muestra se selecciona a partir del grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, tejido, células de tumor, muestras de tejido de tumor, células de
10 tumor de circulación, y ADN de circulación.

15

20

25

Listado de secuencias
SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company

<120> COMPOUNDS TO FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR-3 (FGFR3) AND METHODS OF TREATMENT

<130> X20104

<150> 61/917457
<151> 2013-12-18

<150> 61/928025
<151> 2014-01-16

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 1

Gly Tyr Met Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5 10

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 2

Trp Val Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 3

Val Leu Gly Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15

Listado de secuencias

Val

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 4

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Asp Lys Ser Val His
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 5

Leu Asp Thr Glu Arg Pro Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 6

Gln Val Trp Asp Ser Gly Ser Asp His Val Val
 1 5 10

<210> 7
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 7

Glu 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 Met Phe Thr Ser Tyr
 Página 2

Listado de secuencias

20

25

30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Val Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 8
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 8

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

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

His Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
35 40 45

Leu Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Met Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Phe Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Gly Ser Asp His
85 90 95

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

Listado de secuencias

<210> 9
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 9

Glu 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 Met Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Val Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205

Listado de secuencias

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
 210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 355 360 365
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

Listado de secuencias

<210> 10
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 10

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

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

His Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
 35 40 45

Leu Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Met Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Phe Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Gly Ser Asp His
 85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
 100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
 115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
 130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
 165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
 180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
 195 200 205

Listado de secuencias

Ala Pro Ala Glu Cys Ser
210

<210> 11
<211> 795
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Gly Ala Pro Ala Cys Ala Leu Ala Leu Cys Val Ala Val Ala Ile
1 5 10 15

Val Ala Gly Ala Ser Ser Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val
20 25 30

Gly Arg Ala Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Glu Leu Val
35 40 45

Phe Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Gly
50 55 60

Gly Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val
65 70 75 80

Pro Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Val Leu Asn Ala
85 90 95

Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Arg
100 105 110

Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser Gly
115 120 125

Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp Thr
130 135 140

Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu
145 150 155 160

Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly
165 170 175

Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg
180 185 190

Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser
195 200 205

Listado de secuencias

Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys
 210 215 220
 Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp
 225 230 235 240
 Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro
 245 250 255
 Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys
 260 265 270
 Val Tyr Ser Asp Ala Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu Val
 275 280 285
 Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val Leu
 290 295 300
 Lys Thr Ala Gly Ala Asn Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val Leu Ser
 305 310 315 320
 Leu His Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala
 325 330 335
 Gly Asn Ser Ile Gly Phe Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val Leu
 340 345 350
 Pro Ala Glu Glu Glu Leu Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr
 355 360 365
 Ala Gly Ile Leu Ser Tyr Gly Val Gly Phe Phe Leu Phe Ile Leu Val
 370 375 380
 Val Ala Ala Val Thr Leu Cys Arg Leu Arg Ser Pro Pro Lys Lys Gly
 385 390 395 400
 Leu Gly Ser Pro Thr Val His Lys Ile Ser Arg Phe Pro Leu Lys Arg
 405 410 415
 Gln Val Ser Leu Glu Ser Asn Ala Ser Asn Ser Ser Asn Thr Pro Leu
 420 425 430
 Val Arg Ile Ala Arg Leu Ser Ser Gly Glu Gly Pro Thr Leu Ala Asn
 435 440 445
 Val Ser Glu Leu Glu Leu Pro Ala Asp Pro Lys Trp Glu Leu Ser Arg
 450 455 460

Listado de secuencias

Ala Arg Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln
465 470 475 480

Val Val Met Ala Glu Ala Ile Gly Ile Asp Lys Asp Arg Ala Ala Lys
485 490 495

Pro Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Asp Lys
500 505 510

Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly
515 520 525

Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Gly Gly
530 535 540

Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala Ala Lys Gly Asn Leu Arg Glu
545 550 555 560

Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Leu Asp Tyr Ser Phe Asp Thr
565 570 575

Cys Lys Pro Pro Glu Glu Gln Leu Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys
580 585 590

Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Lys Cys Ile
595 600 605

His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asn Val
610 615 620

Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Val His Asn Leu Asp
625 630 635 640

Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala
645 650 655

Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Ser Asp Val Ser Phe
660 665 670

Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro
675 680 685

Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg
690 695 700

Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr His Asp Leu Tyr Met Ile Met Arg
Página 9

Listado de secuencias

705 710 715 720

Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser Arg Pro Thr Phe Lys Leu Val Glu
725 730 735

Asp Leu Asp Arg Val Leu Thr Val Thr Ser Thr Asp Glu Tyr Leu Asp
740 745 750

Leu Ser Ala Pro Phe Glu Tyr Ser Pro Gly Gly Gln Asp Thr Pro Ser
755 760 765

Ser Ser Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ala His Asp Leu Leu Pro
770 775 780

Pro Ala Pro Pro Ser Ser Gly Gly Ser Arg Thr
785 790 795

<210> 12
<211> 1368
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 12
gagggtccagc tgggtacagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaagtc 60
tcctgcaagg cttctggcta catgtttacc agctatggga tcagttgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg gtcagcactt acaatgggtga cacaaactat 180
gcgcagaagt tccagggcag agtcaccgtg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagtcttg 300
ggatactatg atagtataga tggctactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
acgggtcaccg tctcaagcgc tagcaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc 420
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc 480
gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg 540
gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc 600
agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg 660
gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 720
cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 780
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 840
gagggtcaagt tcaactggta tgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 900
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccaa 960

Listado de secuencias

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc	1020
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg	1080
ccccatccc gggaggagat gaccaagaac caagtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc	1140
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac	1200
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctattc caagctcacc	1260
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct	1320
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggcaaa	1368

<210> 13
 <211> 642
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 13 cagtctgtgc tgactcagcc accctcactg tcagtggccc caggaaagac ggccaccttt	60
acctgtggggg gaaacaacat tggagacaag agtggtcact ggtaccggca gaagccaggc	120
caggccccctg tcctgggtcat gtatcttgat accgaacggc cctcagggat ccctgagcga	180
atgtctggct ccaactttgg gaacacggcc accctgacga tcaccagggt cgaagccggg	240
gatgaggccg actattactg tcagggtgtgg gatagtggta gtgatcatgt ggtcttcggc	300
ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cctaaggctg cccctcggt cactctgttc	360
ccgccctcct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tgggtgtgtct cataagtgac	420
ttctacccgg gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagccccgt caaggcggga	480
gtggagacca ccacaccctc caaacaagc aacaacaagt acgcggccag cagctacctg	540
agcctgacgc ctgagcagt gaagtccac agaagctaca gctgccagggt cacgcatgaa	600
gggagcaccg tggagaagac agtggcccct gcagaatgct ct	642

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/US2014/069720	International filing date (day/month/year) 11.12.2014	Priority date (day/month/year) 18.12.2013
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC INV. A61K47/48 A61P35/00 G01N33/574 ADD. A61K31/559 C07K16/28		
Applicant IMCLONE LLC		

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 and 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.

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 Fax: +31 70 340 - 3016	Date of completion of this opinion see form PCT/ISA/210	Authorized Officer Telephone No. +31 70 340-0 
---	--	---

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, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ 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 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:

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-25</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-25</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-25</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)
and / or
2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)
see form 210

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 2013/083817 A1 (BIOTEST AG [DE]; IMMUNOGEN INC [US] ET AL)
 13 June 2013
- D2 K. ELKINS ET AL: "FcRL5 as a Target of Antibody-Drug Conjugates for
 the Treatment of Multiple Myeloma",
 MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 11, no. 10, 17 July 2012,
 pages 2222-2232, XP055141107, ISSN: 1535-7163, DOI:
 10.1158/1535-7163.MCT-12-0087
- D3 US 2010/098696 A1 (SUN HAIJUN [US] ET AL) 22 April 2010

The present invention is related to the conjugate of formula I of present claim 1, in which DM4 is covalently linked to an anti-FGFR3 antibody through the sulfo-SPDB linker. This conjugate is proposed for the treatment of cancers, in particular bladder cancers and multiple myeloma, wherein FGFR3 is overexpressed, or wherein FGFR3 comprises one of the mutations S249C, R248C, Y373C, Y375C and/or is fused to TACC3.

D1 and D2 may both be regarded as being the prior art closest to the subject-matter of claims 1-25.

D1 (cf. page 125, "nBT062-DM4"; pages 130-131: examples 3,5; page 132, paragraphs 2, 3; pages 144-145: example 4) discloses a DM4 immunoconjugate for the treatment of a bladder tumour and multiple myeloma. The antibody of the described immunoconjugate targets CD138 and not FGFR3 as in the present claims.

D2 (cf. abstract; page 2223, left-hand column, paragraph 2) discloses the anti-FcRL5-SPDB-DM4 immunoconjugate for the treatment of multiple myeloma.

The subject-matter of claims 1-25 differs from D1 and D2 in that the antibody of the DM4 immunoconjugate targets a different receptor, namely FGFR3. The subject-matter of claims 1-25 is therefore new (Article 33(2) PCT).

The technical effect, which may be derived from this technical difference, is the different type of bladder tumour and multiple myeloma, which may be subjected to treatment.

The problem to be solved by the present invention may be regarded as the provision of alternative DM4 immunoconjugates, for the treatment of alternative cancers, in particular alternative bladder tumours and multiple myeloma.

The solution to this problem proposed in claims 1-25 of the present application is considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT), for the following reasons:

The anti-FGFR3 antibody referred to in the present claims is described in D3 (cf. paragraphs [0010], [0022], [0074]. This document also reports the use of this antibody for the treatment of bladder tumours and multiple myeloma expressing FGFR3 receptors (cf. paragraphs 0094] - [0096], [0106] - [0110]).

In order to arrive at the subject-matter of claims 1-25, the skilled would a priori need to replace the antibody of D1 and D2 by the one of D3.

However, the skilled person could not have anticipated the in vitro and in vivo results shown in the examples of the present application. The simple combination of D1 or D2 with D3 does not indeed give any hint regarding the good antitumoral activity of the claimed anti-FGFR3-DM4 immunoconjugate.

Consequently, the solution provided in claims 1-25 cannot be derived in an obvious manner from the prior art, illustrated by D1, D2 and D3.

V.3 Remark concerning claims 19-23:

For the assessment of present claims 19-23 on the question whether they are patentable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for instance, does not recognize as patentable the subject-matter of claims to methods of therapeutic treatment but may allow, however, claims to a known compound for a first use in a medical treatment and/or for a further use in a new medical treatment.

Re Item VI

Certain documents cited

Reference is made to the following documents:

D4 WO 2014/055842 A1 (IMMUNOGEN INC [US]) 10 April 2014

D5 WO 2014/163714 A2 (BATT DAVID BRYANT [US] ET AL) 9 October 2014

D6 WO 2014/160160 A2 (NOVARTIS AG [CH] ET AL) 2 October 2014

These documents have been cited in the International search report as P-documents. They disclose DM4 immunoconjugates, not however targeting FGFR3 (cf. D4: last sentence of paragraph [0056], paragraph [0076], last sentence of paragraph [0105]; D5: paragraph [0341], claim 1; D6: paragraphs [0024], [0346]). Without considering the validity of the priority of the present application, the documents D4-D6 will not be relevant for the question of novelty or inventive step in the national/regional phase, for the same reasons as discussed in item V.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference X20104	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2014/069720	International filing date (<i>day/month/year</i>) 11 December 2014 (11-12-2014)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 18 December 2013 (18-12-2013)
Applicant IMCLONE LLC		

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 4 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 43.6**bis**(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:

COMPOUNDS TO FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR-3 (FGFR3) AND THERAPEUTIC USES

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, 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/US2014/069720

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48 A61P35/00 G01N33/574
ADD. A61K31/559 C07K16/28

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)

A61K G01N A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/083817 A1 (BIOTEST AG [DE]; IMMUNOGEN INC [US]; SCHULZ GREGOR [DE]; OSTERROTH FRA) 13 June 2013 (2013-06-13) page 125, "nBT062-DM4" pages 130-131; examples 3,5 page 132, paragraphs 2,3 pages 144-145; example 4 -----	1-25
A	K. ELKINS ET AL: "FcRL5 as a Target of Antibody-Drug Conjugates for the Treatment of Multiple Myeloma", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 11, no. 10, 17 July 2012 (2012-07-17) , pages 2222-2232, XP055141107, ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0087 abstract page 2223, left-hand column, paragraph 2 ----- -/-	1-25



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 application or patent 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 March 2015

Date of mailing of the international search report

13/03/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Villard, Anne-Laure

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/069720

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010/098696 A1 (SUN HAIJUN [US] ET AL) 22 April 2010 (2010-04-22) paragraphs [0010], [0022], [0074], [0094] - [0096], [0106] - [0110] -----	1-25
A,P	WO 2014/055842 A1 (IMMUNOGEN INC [US]) 10 April 2014 (2014-04-10) last sentence, paragraph 56 paragraph [0076] last sentence, paragraph 105 -----	1-25
A,P	WO 2014/163714 A2 (BATT DAVID BRYANT [US]; ETTENBERG SETH ALEXANDER [US]; HAUBST NICOLE []) 9 October 2014 (2014-10-09) paragraph [0341] claim 1 -----	1-25
A,P	WO 2014/160160 A2 (NOVARTIS AG [CH]; BATT JULIE LYNN [US]; ETTENBERG SETH [US]; HAUBST NI) 2 October 2014 (2014-10-02) paragraphs [0024], [0346] -----	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/069720

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013083817	A1	13-06-2013	
		AU 2012372140 A1	26-09-2013
		CA 2858133 A1	13-06-2013
		CN 104302324 A	21-01-2015
		EP 2788030 A1	15-10-2014
		JP 2015500822 A	08-01-2015
		KR 20140100571 A	14-08-2014
		US 2014010828 A1	09-01-2014
		WO 2013083817 A1	13-06-2013

US 2010098696	A1	22-04-2010	
		AR 073770 A1	01-12-2010
		AU 2009307841 A1	29-04-2010
		CA 2741127 A1	29-04-2010
		CN 102186884 A	14-09-2011
		CN 103524620 A	22-01-2014
		EA 201170590 A1	31-10-2011
		EP 2342232 A2	13-07-2011
		JP 5577345 B2	20-08-2014
		JP 2012505912 A	08-03-2012
		KR 20110056554 A	30-05-2011
		NZ 592369 A	22-02-2013
		TW 201026325 A	16-07-2010
		UA 101681 C2	25-04-2013
		US 2010098696 A1	22-04-2010
		US 2012009200 A1	12-01-2012
		US 2012219563 A1	30-08-2012
		WO 2010048026 A2	29-04-2010

WO 2014055842	A1	10-04-2014	NONE

WO 2014163714	A2	09-10-2014	
		US 2014308201 A1	16-10-2014
		WO 2014163714 A2	09-10-2014

WO 2014160160	A2	02-10-2014	
		US 2014301946 A1	09-10-2014
		UY 35399 A	31-10-2014
		WO 2014160160 A2	02-10-2014

X20104

5/12

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application IMCLONE LLC is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i)		IMCLONE LLC is entitled as employer of the inventor, BALDERES, Paul J.
VIII-2-1(i)		IMCLONE LLC is entitled as employer of the inventor, EASTMAN, Scott W.
VIII-2-1(i)		IMCLONE LLC is entitled as employer of the inventor, LUGWIG, Dale L.
VIII-2-1(i)		IMCLONE LLC is entitled as employer of the inventor, MOXHAM, Christopher M.
VIII-2-1(i)		IMCLONE LLC is entitled as employer of the inventor, PLOWMAN, Gregory D.
VIII-2-1(i)		IMCLONE LLC is entitled as employer of the inventor, RIGBY, Alan C.

X20104

6/12

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-2-2	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application IMMUNOGEN INC. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-2(i)		IMMUNOGEN INC. is entitled as employer of the inventor, ERICKSON, Hans K.

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2014/069720

Paul J. BALDERES

P. O. Box 6288
Indianapolis, Indiana 46206-6288,
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

Scott W. EASTMAN

P. O. Box 6288
Indianapolis, Indiana 46206-6288
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

Hans K. ERICKSON

830 Winter Street Waltham,
Massachusetts 02451
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

Dale L. LUDWIG

P. O. Box 6288 Indianapolis,
Indiana 46206-6288
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

Christopher M. MOXHAM

P. O. Box 6288 Indianapolis,
Indiana 46206-6288
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

Gregory D. PLOWMAN

P. O. Box 6288 Indianapolis,
Indiana 46206-6288
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

Alan C. RIGBY

P. O. Box 6288 Indianapolis,
Indiana 46206-6288
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

La certificación notarial en el documento adjunto lleva el siguiente sello:

(Firmado) Debra E. Smith, Notario Público. Nombramiento No. 600394. Mi nombramiento vence el 18 de enero de 2017. Residente en el Condado de Marion.

Sello redondo: "Notario Público – Indiana"

DELEGACIÓN DE AUTORIDAD

con respecto a

CIERTOS ASUNTOS SOBRE PATENTES

De acuerdo con la que me ha sido otorgada por John Johnson, Presidente y Director General de ImClone, LLC. en un documento fechado el 5 de febrero de 2009 (una copia del cual se adjunta como Apéndice A), delego a cada una de las siguientes personas:

Arvie J. Anderson	45,263	Paul J. Koivuniemi	31,533
Lynn D. Apelgren	45,341	Robert E. Lee	27,919
Robert A. Armitage	27,417	James P. Leeds	35,241
Brian P. Barrett	39,597	Nelsen L. Lentz	38,537
Gary M. Birch	48,881	Alejandro Martinez	58,163
Steven P. Caltrider	36,467	Elizabeth A. McGraw	44,646
Paul R. Cantrell	36,470	James B. Myers	42,021
John A. Cleveland, Jr.	50,697	Douglas K. Norman	33,267
Charles E. Cohen	34,565	Arleen Palmberg	40,422
Tonya L. Combs	57,909	Thomas G. Plant	35,784


Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 276-1993 Multistado

Donald L. Corneglio	30,741	Edward J. Prein	37,212
Gregory A. Cox	47,504	Robert L. Sharp	45,609
Paula K. Davis	47,517	Mark J. Stewart	43,936
John C. Demeter	30,167	Robert D. Titus	40,206
Manisha A. Desai	43,585	R. Craig Tucker	45,165
Ted Ebersole	51,641	Tina M. Tucker	47,145
Paul J. Gaylo	36,808	MaCharri Vorndran-Jones	36,711
Caren D. Geppert	54,117	Gilbert T. Voy	43,972
Francis O. Ginah	44,712	Lawrence T. Welch	29,487
Amy E. Hamilton	33,894	Alexander Wilson	45,782
Averie Hason	57,722	Mark A. Winter	53,782
Danica Hostettler	51,820	MaryAnn Wiskerchen	45,511
Thomas E. Jackson	33,064	Dan L. Wood	48,613
Sanjay M. Jivraj	61,806	Nicole Woods	56,579
Gerald P. Keleher	46,707	Congping Xie	57,817
James J. Kelley	41,888		

todos ellos registrados para ejercer ante la Oficina de Patentes y Marcas Registradas de los Estados Unidos y empleados de Eli Lilly and Company, la autoridad para aprobar y ejecutar en nombre de la compañía, documentos con respecto a asuntos de patentes en relación con:

- (i) la institución, seguimiento y completa realización de acciones dirigidas a la expedición de patentes;
- (ii) la enmienda, restricción, renovación, reexpedición, reactivación, mantenimiento, restauración cancelación, prórroga y abandono de patentes y solicitud de patentes;



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA RIVES
 Licencia S/4-1993 Ministerio

- (iii) la institución, seguimiento y completa realización de acciones de interferencia, oposición, revocación y anulación, incluyendo la radicación de declaraciones preliminares, concesiones de prioridad, renunciamentos, renuncia de concursos y abandonos del invento;
- (iv) las acciones de interferencia, oposición, revocatoria y anulación de los acuerdos de patente, con sujeción a la aprobación previa por parte del Vicepresidente y el Asesor Jurídico de la Compañía;
- (v) la radicación de los renunciamentos estatutarios;
- (vi) la institución, seguimiento y completa realización de acciones de apelación; y
- (vii) el otorgamiento y revocatoria de los poderes con respecto a cualquiera de los anteriores, excepto que no habrá autoridad para revocar ninguno de los poderes poseídos por el Vicepresidente y Asesor Jurídico de Patentes de Lilly Research Laboratories (una división de la Compañía).

Fechado el 6 de febrero de 2009.

(Firmado) /Douglas K. Norman/

Vicepresidente y Asesor Jurídico de Patentes.



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 876-1993 M.H.J.

DELEGACIÓN DE AUTORIDAD

con respecto a

CIERTOS ASUNTOS SOBRE PATENTES

En nombre de ImClone, LLC. (ImClone), una compañía de responsabilidad limitada con sede comercial principal en 180 Varick Street, New York City, New York, subsidiaria de Eli Lilly and Company, una compañía de Indiana con sede comercial en Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, delego en Douglas K. Norman, Vicepresidente y Asesor Jurídico de Patentes de Eli Lilly and Company; Amy E. Hamilton, Sub Asesor Jurídico de Patentes de Eli Lilly and Company; y James J. Kelley, Asesor Jurídico Asistente de Patentes de Eli Lilly and Company, la autoridad para aprobar y ejecutar en nombre de ImClone documentos relacionados con asuntos de patentes concernientes a:

- (i) la institución, seguimiento y completa realización de acciones dirigidas a la expedición de patentes;
- (ii) la enmienda, restricción, renovación, reexpedición, reactivación, mantenimiento, restauración cancelación, prórroga y abandono de patentes y solicitudes de patentes;
- (iii) la institución, seguimiento y completa realización de acciones de interferencia, oposición, revocatoria y anulación, incluyendo la radicación de declaraciones preliminares, concesiones de prioridad, renunciamentos, renuncia de concursos y abandonos del invento;



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia No. 4 - 1983 Ministerio

- (iv) las acciones de interferencia, oposición, revocatoria y anulación de los acuerdos de patente, con sujeción a la aprobación previa por parte del Vicepresidente y el Asesor Jurídico de la Compañía;
- (v) la radicación de los renunciamentos estatutarios;
- (vi) la institución, seguimiento y completa realización de acciones de apelación; y
- (vii) el otorgamiento y revocatoria de los poderes con respecto a cualquiera de los anteriores,

Fechado el 5 de febrero de 2009.

(Firmado) /John Johnson/

Presidente y Director General de ImClone LLC



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 276 - 1993 Miami

DELAWARE

El Primer Estado

Yo, Harriet Smith Windsor, Secretario de Estado del Estado de Delaware, certifico por medio del presente documento que el adjunto es una copia auténtica y correcta del Certificado de Conversión de de una compañía de Delaware con el nombre de "IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED" a compañía de responsabilidad limitada de Delaware, cambiando su nombre "IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED" a "IMCLONE LLC", radicado en esta Oficina el día 2 de diciembre de 2008, a las 11:33 a.m.

(Firmado) Harriet Smith Windsor, Secretario de Estado

Autenticación: 6999614

Fecha: 3 de diciembre de 2008.

Sello: "Oficina del Secretario – Delaware 1793 - 1855"

2033904 8100V

081156341



Treductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 346-1993 Alabaster

Estado de Delaware
Secretario de Estado
División de Compañías
Entregado 11:33 a.m 2 de diciembre de 2008
Radicado 11:33 a.m. 2 de diciembre de 2008
SRV 081156341 – 2033904 Archivo.

CERTIFICADO DE CONVERSIÓN DE UNA SOCIEDAD A UNA COMPAÑÍA DE
RESPONSABILIDAD LIMITADA

De acuerdo con la Sección 18-214 de la Ley de Compañías de Responsabilidad Limitada de Delaware y la Sección 266 de la Ley General de Compañías del Estado de Delaware.

1. Nombre de la Compañía inmediatamente antes de la radicación del Certificado de Conversión es ImClone Systems Incorporated.
2. La compañía fue constituida originalmente el 26 de abril de 1984, según las leyes del Estado de Delaware. La jurisdicción de la Constitución de la Compañía inmediatamente antes de la radicación de este Certificado de Conversión es el Estado de Delaware.
3. El nombre de la compañía de Responsabilidad Limitada al cual se convertirá la compañía, conforme se establece en el Certificado de Constitución, es ImClone LLC.
4. La Conversión ha sido aprobada de acuerdo con las disposiciones de la Sección 266 de la Ley General de Compañías del Estado de Delaware.

(Sigue la página de firmas)



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

En constancia de lo anterior, la compañía ha hecho que este Certificado de Conversión sea ejecutado en su nombre este 2 de diciembre de 2008.

IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED

Por: (Firmado) Thomas W. Grein

Cargo: Vicepresidente y Tesorero.



Traductor Oficial
JORGE E. SURRA REYES
Licencia 346 - 1993 Municipal

DELAWARE

El Primer Estado

Yo, Harriet Smith Windsor, Secretario de Estado del Estado de Delaware, certifico por medio del presente documento que el adjunto es una copia auténtica y correcta del Certificado de Constitución de de una compañía de Delaware con el nombre de "IMCLONE LLC" radicado en esta Oficina el día 2 de diciembre de 2008, a las 11:33 a.m.

(Firmado) Harriet Smith Windsor, Secretario de Estado

Autenticación: 6999614

Fecha: 3 de diciembre de 2008.

Sello: "Oficina del Secretario – Delaware 1793 - 1855"

2033904 8100V

081156341



Treasury Official
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 3076 - 1983 Minuteman

Estado de Delaware
Secretario de Estado
División de Compañías
Entregado 11:33 a.m 2 de diciembre de 2008
Radicado 11:33 a.m. 2 de diciembre de 2008
SRV 081156341 – 2033904 Archivo.

CERTIFICADO DE CONSTITUCIÓN DE
IMCLONE LLC

1. Nombre de la Compañía de Responsabilidad Limitada es ImClone LLC.
2. La dirección de su sede registrada en el Estado de Delaware es 160 Greentree Drive, Suite 101, en la ciudad de Dover, Condado de Kent. El nombre de su agente registrado en dicha dirección es National Registered Agents, inc.

En constancia de lo anterior, el suscrito ha ejecutado este Certificado de Constitución este 2 de diciembre de 2008.

IMCLONE LLC

Por: (Firmado) Bronwen Mantlo

Cargo: Subsecretario



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA RAYES
Licencia 826 - 1993 Multistado

Oficina del Secretario de Estado
Estado de Indiana
Todd Rokita, Secretario de Estado

APOSTILLA:

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América
 2. El presente documento público ha sido firmado por: Debra E. Smith
 3. Actuando en calidad de Notario Público de y para el Condado de Marion
 4. Lleva el sello/estampilla de: Notario Público de y para el Estado de Indiana
- CERTIFICADO
5. En: Indianápolis, Indiana
 6. El: Once de agosto de 2009
 7. Por: Secretario del Estado de Indiana
 8. Bajo el No.: A2009-10729
 9. Sello / estampilla: Sello del Estado de Indiana – 1816
 10. Firma: Todd Rokita, Secretario del Estado de Indiana

A partir de Mayo 1º de 2003 todas las Apostillas del Secretario de Estado de Indiana tendrán un sello impreso electrónicamente.

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción auténtica y completa del inglés al español del documento adjunto, la cual he elaborado según mi leal saber y entender.

Documento: "Imclone LLC – Delegación de Autoridad"

Fecha: 4 de Septiembre de 2009.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes (Sello y firma digital debidamente registrados ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia)

Licencia # 376 de 1993, expedida por el Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 # 99-13 Of. 411, Bogotá, D.C.

Teléfonos: (571) 218 2308, (571) 623 2925.

E-mail: treseser1@yahoo.com

Traducción # 13-648

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjust

OLARTE RAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

IMCLONE LLC

domiciled in

domiciliado en

180 Varick Street 6th floor New York, NY 10014 E.U.A.

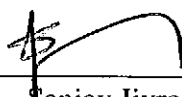
by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications, collect refunds, desist, settle, conciliate or negotiate. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir, transigir, y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Alexander Agudelo
Catalina Barbastefano
Ángela Correa
Erika Rico
Carlos A. Parra
Andrés Alvarado
Gina Arias
Juan Felipe Acosta
Andrés Rincón
Grace García
Mariana Franco

Of Counsel
Guillermo Chahín
Graciela Melo
Jacqueline Chaparro
Cruz E. de Moncaleano

Signature/Firma: _____



Sanjay Jivraj
Patent Attorney

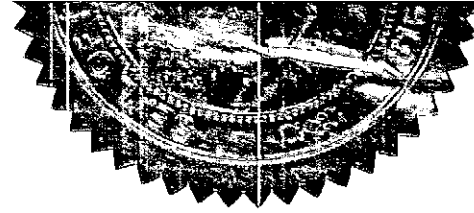
Date/Fecha: August 11, 2009

City/Country/Ciudad,País: Indianapolis, IN



Todd Rokita
Secretary of State

SECRETARY OF STATE
STATE OF INDIANA



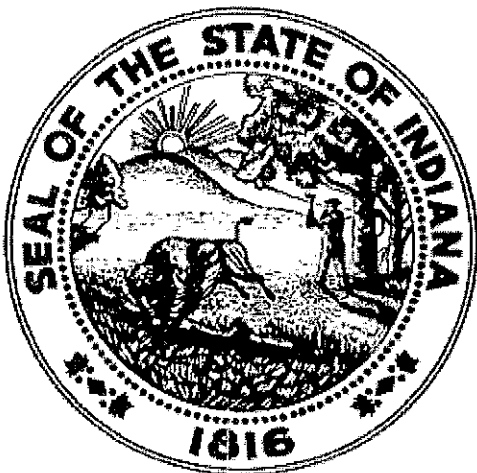
APOSTILLE

(Convention de la Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by *Debra E. Smith*
3. acting in the capacity of notary public in & for *Marion* County
4. and bears the seal/stamp of notary public in & for the State of Indiana

CERTIFIED

5. at Indianapolis, Indiana
6. this the *Twelfth* day of *August, 2009*
7. by Secretary of State of Indiana
8. No. A2009 - 10729
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



Todd Rokita

Todd Rokita
Indiana Secretary of State

Effective May 1, 2003 all apostilles from the Indiana Secretary of State will have an electronically printed seal.

Iwiseman



MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date,
August 11, 2009

The undersigned Notary Public certifies:

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. That

of legal age and domiciled in

1. Que
Sanjay M. Jivraj

mayor de edad y domiciliado

Lilly Corporate Center
Indianapolis, Indiana 46285

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Patent Attorney of ELI LILLY AND COMPANY.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de de

3. That IMCLONE LLC, having its principal place of business located in New York, New York, United States is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

3. Que
con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

Delegation of Authority Concerning Certain Patent Matters, Dated: February 2, 2009, PCT General Power of Attorney, Dated: March 11, 2009, Certificate Of Conversion, Dated: December 2, 2008, Certificate of Formation, Dated: December 2, 2008.

NOTARY PUBLIC (Signature):

SEAL (optional)




Debra E. Smith, Notary Public
Commission No. 600394
My Comm. Expires: January 18, 2017
Resident of Marion County

Delegation of Authority Concerning
Certain Patent Matters

Pursuant to the authority granted to me by John Johnson, President and CEO, ImClone, LLC in a document dated February 5, 2009 (a copy which is attached as Appendix A), I delegate to each of the following persons:

Arvie J. Anderson	45,263	Paul J. Koivuniemi	31,533
Lynn D. Apelgren	45,341	Robert E. Lee	27,919
Robert A. Armitage	27,417	James P. Leeds	35,241
Brian P. Barrett	39,597	Nelsen L. Lentz	38,537
Gary M. Birch	48,881	Alejandro Martinez	58,163
Steven P. Caltrider	36,467	Elizabeth A. McGraw	44,646
Paul R. Cantrell	36,470	James B. Myers	42,021
John A. Cleveland, Jr.	50,697	Douglas K. Norman	33,267
Charles E. Cohen	34,565	Arleen Palmberg	40,422
Tonya L. Combs	57,909	Thomas G. Plant	35,784
Donald L. Corneglio	30,741	Edward J. Prein	37,212
Gregory A. Cox	47,504	Robert L. Sharp	45,609
Paula K. Davis	47,517	Mark J. Stewart	43,936
John C. Demeter	30,167	Robert D. Titus	40,206
Manisha A. Desai	43,585	R. Craig Tucker	45,165
Ted Ebersole	51,641	Tina M. Tucker	47,145
Paul J. Gaylo	36,808	MaCharri Vorndran-Jones	36,711
Caren D. Geppert	54,117	Gilbert T. Voy	43,972
Francis O. Ginah	44,712	Lawrence T. Welch	29,487
Amy E. Hamilton	33,894	Alexander Wilson	45,782
Averie Hason	57,722	Mark A. Winter	53,782
Danica Hostettler	51,820	MaryAnn Wiskerchen	45,511
Thomas E. Jackson	33,064	Dan L. Wood	48,613
Sanjay M. Jivraj	61,806	Nicole Woods	56,579
Gerald P. Keleher	43,707	Congping Xie	57,817
James J. Kelley	41,888		

all of whom are registered to practice before the United States Patent and Trademark Office and are employees of Eli Lilly and Company, the authority to approve and execute for and on behalf of the Company, documents in connection with patent matters relating to:

- (i) the institution, prosecution, and completion of proceedings directed towards the issuance of patents;
- (ii) the amendment, restriction, renewal, reissue, revival, maintenance, restoration, cancellation, extension, and abandonment of patents and of applications for patents;
- (iii) the institution, prosecution, and termination of proceedings of interference, opposition, revocation, and nullification, including the filing of preliminary statements, concessions of priority, disclaimers, abandonments of contests, and abandonments of the invention;

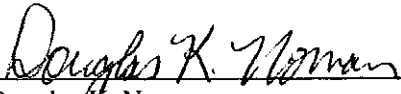
(iv) the settlement of patent proceedings of interference, opposition, revocation, and nullification, subject to prior approval by the Senior Vice President and General Counsel of the Company;

(v) the filing of statutory disclaimers;

(vi) the institution, prosecution, and termination of appellate proceedings; and

(vii) the granting and the revocation of powers of attorney in connection with any of the foregoing, except there shall be no authority to revoke any power of attorney held by the Vice President and General Patent Counsel, Lilly Research Laboratories (a division of the Company).

Dated: 6 February 2009



Douglas K. Norman
Vice President and General Patent Counsel

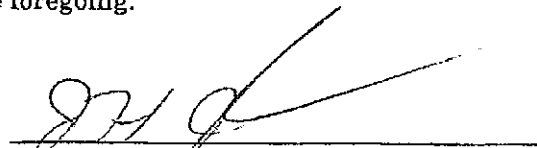
**Delegation of Authority Concerning
Certain Patent Matters**

On behalf of ImClone, LLC (ImClone), a Delaware limited liability company with a principal place of business at 180 Varick Street, New York City, New York, a wholly-owned subsidiary of Eli Lilly and Company, an Indiana corporation with a principal place of business at Lilly Corporate Center, Indianapolis Indiana 46285, I delegate to Douglas K. Norman, Vice President and General Patent Counsel of Eli Lilly and Company; Amy E. Hamilton, Deputy General Patent Counsel of Eli Lilly and Company; and James J. Kelley, Assistant General Patent Counsel of Eli Lilly and Company:

Authority to approve and execute for and on behalf of ImClone, documents in connection with patent matters relating to:

- (i) the institution, prosecution, and completion of proceedings directed towards the issuance of patents;
- (ii) the amendment, restriction, renewal, reissue, revival, maintenance, restoration, cancellation, extension, and abandonment of patents and of applications for patents;
- (iii) the institution, prosecution, and termination of proceedings of interference, opposition, revocation, and nullification, including the filing of preliminary statements, concessions of priority, disclaimers, abandonments of the contents, and abandonments of the invention;
- (iv) the settlement of patent proceedings of interference, opposition, revocation, and nullification, subject to prior approval by the Senior Vice President and General Counsel of Eli Lilly and Company;
- (v) the filing of statutory disclaimers;
- (vi) the institution, prosecution, and termination of appellate proceedings; and
- (vii) the granting and the revocation of powers of attorney in connection with any of the foregoing.

Dated: 2/5/09



John Johnson
President and CEO, ImClone LLC

Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE DO HEREBY CERTIFY THAT THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF CONVERSION OF A DELAWARE CORPORATION UNDER THE NAME OF "IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED" TO A DELAWARE LIMITED LIABILITY COMPANY, CHANGING ITS NAME FROM "IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED" TO "IMCLONE LLC", FILED IN THIS OFFICE ON THE SECOND DAY OF DECEMBER, A.D. 2008, AT 11:33 O'CLOCK A.M.



2033904 8100V

081156341

You may verify this certificate online
at corp.delaware.gov/authver.shtml

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 6999614

DATE: 12-03-08

State of Delaware
Secretary of State
Division of Corporations
Delivered 11:33 AM 12/02/2008
FILED 11:33 AM 12/02/2008
SRV 081156341 - 2033904 FILE

**CERTIFICATE OF CONVERSION
FROM A CORPORATION
TO LIMITED LIABILITY COMPANY**

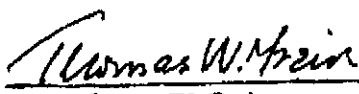
Pursuant to Section 18-214 of the
Delaware Limited Liability Company Act
and Section 266 of the
General Corporation Law of the State of Delaware

1. The name of the Corporation immediately prior to the filing of this Certificate of Conversion is ImClone Systems Incorporated.
2. The Corporation was originally incorporated on the 26th day of April, 1984, under the laws of the State of Delaware. The Corporation's jurisdiction of incorporation immediately prior to the filing of this Certificate of Conversion is the State of Delaware.
3. The name of the limited liability company into which the Corporation shall be converted, as set forth in its Certificate of Formation, is ImClone LLC.
4. The Conversion has been approved in accordance with the provisions of Section 266 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

[SIGNATURE PAGE FOLLOWS]

IN WITNESS WHEREOF, the Corporation has caused this Certificate of Conversion to be executed in its name this 2nd day of December, 2008.

IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED

By: 

Name: Thomas W. Grein

Title: Vice President & Treasurer

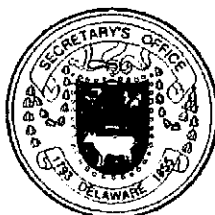
Certificate of Conversion

Delaware

PAGE 2

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE DO HEREBY CERTIFY THAT THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF CERTIFICATE OF FORMATION OF "IMCLONE LLC" FILED IN THIS OFFICE ON THE SECOND DAY OF DECEMBER, A.D. 2008, AT 11:33 O'CLOCK A.M.



2033904 8100V

081156341

You may verify this certificate online
at corp.delaware.gov/authver.shtml

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 6999614

DATE: 12-03-08

State of Delaware
Secretary of State
Division of Corporations
Delivered 11:33 AM 12/02/2008
FILED 11:33 AM 12/02/2008
SRV 081156341 - 2033904 FILE

CERTIFICATE OF FORMATION
OF
IMCLONE LLC

1. The name of the limited liability company is ImClone LLC.
2. The address of its registered office in the State of Delaware is 160 Greentree Drive, Suite 101, in the City of Dover, County of Kent. The name of its registered agent at such address is National Registered Agents, Inc.

IN WITNESS WHEREOF, the undersigned has executed this Certificate of Formation this 2nd day of December, 2008.

IMCLONE LLC

By: Bronwen Mantlo
Name: Bronwen Mantlo
Title: Assistant Secretary

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a conjugados que consisten de un agente de porción de fármaco y un agente de unión celular que dirige el receptor 3 del factor de crecimiento del fibroblasto humano (FGFR3, por sus siglas en inglés). Estos conjugados tienen uso terapéutico ya que son diseñados y adaptados para dirigir una población celular específica y suministrar una citotoxina potente dentro de la célula. El conjugado de la presente invención tiene ventajas significantes sobre los otros conjugados conocidos en la técnica proporcionando una terapia tumoral de objetivo así como también actividad transeúnte a células vecinas en un receptor de oncología importante que es solamente expresado de manera moderada.